



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

**Aproximaciones metabólicas para el estudio de la
enfermedad del hígado graso no alcohólico. Búsqueda de
marcadores para su diagnóstico**

AITOR CARRETERO MARTÍNEZ

DIRECTORES:

Dr. AGUSTÍN LAHOZ RODRÍGUEZ

Dra. MARÍA TERESA DONATO MARTÍN

PROGRAMA DE DOCTORADO: BIOQUÍMICA Y BIOMEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultat de Ciències Biològiques

2017

La presente tesis doctoral ha sido realizada dentro del programa PFIS (ayudas predoctorales de formación en investigación en salud) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) de Madrid, en la Unidad Mixta de Hepatología Experimental, adscrita al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y al Instituto de Investigación Sanitaria La Fe bajo la dirección de los doctores Agustín Lahoz Rodríguez y María Teresa Donato Martín.



D. AGUSTÍN LAHOZ RODRÍGUEZ, Doctor en Farmacia e Investigador Principal en el Instituto para la Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia,

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada "**Aproximaciones metabólicas para el estudio de la enfermedad del hígado graso no. Búsqueda de marcadores para su diagnóstico**", realizada por el licenciado en Química **Aitor Carretero Martínez**, bajo su dirección, en la Unidad Mixta de Hepatología Experimental de la Universidad de Valencia y del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, corresponde a su Tesis Doctoral y autoriza mediante este escrito la presentación de la misma para la obtención del grado de Doctor.

Fdo. Dr. Agustín Lahoz Rodríguez

Dña. MARÍA TERESA DONATO MARTÍN, Doctora en Farmacia y Profesora Contratada Doctora adscrita al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada "**Aproximaciones metabólicas para el estudio de la enfermedad del hígado graso no alcohólico. Búsqueda de marcadores para su diagnóstico**", realizada por el licenciado en química **Aitor Carretero Martínez**, bajo su dirección, en la Unidad Mixta de Hepatología Experimental de la Universidad de Valencia y del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, corresponde a su Tesis Doctoral y autoriza mediante este escrito la presentación de la misma para la obtención del grado de Doctor.

Fdo. Dra. María Teresa Donato Martín

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se la dedico a todos los que me han ayudado y han estado a mi lado durante este largo trayecto de aprendizaje e investigación.

A los doctores Amparo Salvador y Alberto Chisvert por dejarme forma parte de su grupo en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia. Aquí es donde empecé a darme cuenta de lo que era en realidad un laboratorio de investigación por dentro, las alegrías que podía darte y también las decepciones que podías encontrar. Gracias por acogerme durante los más de dos años que estuve allí y tratarme siempre con tanto cariño.

A los doctores M^a José Gómez-Lechón y José Vicente Castell por haberme dado la oportunidad de formar parte del grupo de Hepatología Experimental. Agradecimiento especial a a mis directores de tesis Teresa Donato y Agustín Lahoz por aceptarme como su doctorando y permitirme descubrir este nuevo mundo de la metabolómica, algo de lo que no tenía ni idea pero que hoy en día, gracias a ellos, ya forma parte de mí. Gracias por confiar en en todo mi trabajo y por guiarme durante estos más de 4 años. A todos mis compañeros del grupo de Hepatología Experimental por hacerme la estancia tan amena, por acogerme y hacer que tantos días el ir a trabajar fuese realmente divertido. A mi grupo de “*las supernenas*” Nuri, Silvia y Laia, por integrarme y ayudarme desde el primer día y hacerme recordar con cariño y nostalgia esos días en los cubículos en los que les prometí que cuando tuviese oportunidad les agradecería todo lo que habían hecho por mí. A mis compañeros de la Unidad Analítica. A Juan Carlos, porque a pesar de ser siempre un poquito “especial”, fue un ejemplo a seguir y me enseñó y guió desde el principio cuando tan perdido me encontraba. Por su puesto a Sandra, gracias por estar siempre dispuesta a ayudar, colaborar, darme consejos y vigilar que todo se hiciese como se tenía que hacer.

A mis amigos, por hacer que los momentos de risas ocupasen la mayor parte de mi tiempo. A Dani, Eva, Laura, Raquel y Sara por formar parte de *la minipandi* y estar ahí desde hace tantos años. A los *Antonios*, en especial a Charles, María y Sandra, por ser tan frikis o más que yo y por esas tardes y noches de juegos hasta las tantas. A mis compañeros de carrera y máster que tantos momentos buenos me hicieron pasar. Esas cosas son las que no se olvidan.

A mi familia, porque a pesar de la distancia, siempre he contado con su apoyo y he sabido lo orgullosos que se sentían de mí. Por dejar que siguiese el camino que quería y por ser siempre tan tolerantes.

A Alex. Por ser mi pilar y mi mayor apoyo. Por animarme siempre a conseguir todo lo que me proponía y por confiar más en mí que a veces yo mismo. Por estar a mi lado en los momentos duros y hacerme vivir también los mejores. Por vivir con tanta pasión su profesión, contagiando de ilusión a los que le tenemos cerca. Por aparecer por casualidad en mi vida haciendo que ese momento marcara un antes y un después para mí. Por todo ello GRACIAS.

Índice

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	17
LISTADO DE FIGURAS	21
LISTADO DE TABLAS	29
RESUMEN	33
1.INTRODUCCIÓN	37
1.1 Aspectos generales de la estructura del hígado y su funcionalidad	39
1.2 Las células del hígado	41
1.3 La esteatosis hepática	45
1.3.1 Prevalencia	47
1.3.2 Historia natural de la enfermedad	48
1.3.3 Etiopatogenia	50
1.3.4 Evaluación diagnóstica y pronóstica	52
1.4 Alteración de especies ROS y su relación con la EHGNA	55
1.5 Modelos experimentales para el estudio de la EHGNA	57
1.5.1 Modelos experimentales <i>in vivo</i>	58
1.5.2 Modelos experimentales <i>in vitro</i>	60
1.5.2.1. Hepatocitos	62
1.5.2.2. Líneas celulares del hepatoma	63
1.6 Aspectos generales de la metabolómica	65
1.6.1 Estructura básica del estudio metabolómico	68
1.6.2 Técnicas para el estudio del metaboloma	70
1.6.3 Aproximaciones metabolómicas dirigidas y no dirigidas	71
1.6.4 Análisis de datos en metabolómica	76
1.6.5 Estado de la metabolómica en el estudio de la	83

Índice

esteatosis	
1.7 Hipótesis del trabajo y objetivos	84
2. METODOLOGÍA	87
2.1 Procedimiento general, equipamiento y reactivos	89
2.2 Instrumentación basada en MS usada en el análisis metabolómico	90
2.2.1 Sistema Waters Acquity UPLC	91
2.2.2 Sistema Agilent 7890A GC	92
2.2.3 Espectrómetro de masas Waters Synapt HDMS QToF	94
2.2.4 Espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S	95
2.2.5 Espectrómetro de masas Agilent 7200 QToF	95
2.3 Condiciones analíticas para el análisis no dirigido LC-MS	96
2.3.1 Genérico RP	97
2.3.2 Lipidómico RP	97
2.3.3 HILIC	98
2.4 Condiciones analíticas para el análisis no dirigido GC-MS	99
2.5 Procesamiento de datos en crudo e identificación de metabolitos en el análisis metabolómico no dirigido	100
2.5.1 LC-MS	100
2.5.2 GC-MS	102
2.6 Análisis de datos	103
2.6.1 Revisión de los datos generados en el análisis por MS	103
2.6.2 Identificación de alteraciones metabolómicas	106
2.6.3 Desarrollo de modelos predictivos	109
2.7 Validación de un método de análisis dirigido LC-MS/MS de biomarcadores de estrés oxidativo	118
2.7.1 Metabolitos analizados	119
2.7.2 Análisis UPLC-MS	119
2.7.3 Optimización de los reactivos derivatizantes	121
2.7.4 Procesamiento de muestras	121
2.8 Estudios <i>in vitro</i> celulares en cultivo	125

Índice

2.8.1	Cultivo y tratamiento de líneas celulares con compuestos esteatósicos y no esteatósicos	125
2.8.1.1	Células HepG2	125
2.8.1.2	Células HepaRG	126
2.8.1.3	Hepatocitos humanos	130
2.8.1.4	Hepatocitos de rata	131
2.8.2	Procesamiento de muestras	132
2.8.2.1	Análisis no dirigido LC-MS	132
2.8.2.2	Análisis no dirigido GC-MS	133
2.9	Estudios <i>in vivo</i> de hepatotoxicidad en ratas	134
2.9.1	Tratamiento de los animales y diseño experimental	134
2.9.2	Procesamiento de muestras	136
2.9.2.1	Análisis no dirigido LC-MS	137
2.9.2.2	Análisis no dirigido GC-MS	139
2.10	Estudios en muestras humanas	140
2.10.1	Análisis no dirigido GC-MS	140
2.10.2	Análisis no dirigido LC-MS	141
2.10.3	Análisis dirigido de biomarcadores de estrés oxidativo	142
2.10.4	Estudio del ácido oftálmico como nuevo biomarcador sérico para el diagnóstico de EHNA	143
3.	RESULTADOS	145
3.1	Estrategias para asegurar la calidad del análisis metabolómico no dirigido	147
3.2	Estudios <i>In Vitro</i>. Esteatosis inducida por fármacos en modelos celulares	152
3.2.1	Células HepaRG	152
3.2.2	Células HepG2	160
3.2.3	Hepatocitos humanos	173
3.3	Estudios <i>in vivo</i>. Efecto de la tetraciclina y de la dieta en ratas	181
3.4	Estudios metabolómicos en pacientes diagnosticados con	204

Índice

EHNA

3.5 Desarrollo y validación de un método dirigido para evaluar marcadores de estrés oxidativo	216
3.5.1 Desarrollo del método UPLC-MS/MS	216
3.5.2 Optimización de la detección de MDA y GSH	219
3.5.3 Validación del método UPLC-MS/MS	220
3.5.4 Aplicación del método UPLC-MS/MS desarrollado a sistemas biológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	225
3.5.4.1 Inducción de estrés oxidativo en cultivo de hepatocitos de rata	225
3.5.4.2 Inducción de estrés oxidativo en ratas tratadas con paracetamol	227
3.5.5 Aplicación del método de EO desarrollado a muestras de tejido hepático y suero en pacientes con EHNA	227
3.6 Uso del ácido oftálmico como potencial marcador sérico para el diagnóstico de la EHGNA	230
4. DISCUSIÓN	235
4.1 Búsqueda de biomarcadores de la EHGNA mediante análisis metabolómico no dirigido	237
4.1.1 Alteraciones metabólicas más importantes detectadas en los modelos <i>in vitro</i>	237
4.1.2 Cambios metabólicos más importantes detectados en el modelo <i>in vivo</i> de rata	245
4.1.3 Búsqueda de la firma metabólica de la EHNA en humanos	249
4.2 Búsqueda de biomarcadores de la EHGNA mediante análisis dirigido	252
4.2.1 Inducción de EO en modelos experimentales <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	252
4.2.2 Aplicación del método de EO en muestras humanas de tejido y suero	254

Índice

4.2.3	Ácido oftálmico como nuevo biomarcador sérico de EHGNA	256
	5. CONCLUSIONES	259
	BIBLIOGRAFÍA	263

Listado de abreviaturas

LISTADO DE ABREVIATURAS

2AB	2-aminobutarato
2CV	Doble validación cruzada (double cross validation)
2-dG	2-deoxiguanosina
8-ISO-PGF	8-isoprostaglandina-F2 α
8-ISO-PGF-d4	8-isoprostaglandina-F2 α deuterada
8-OH-dG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
AASLD	Asociación americana para el estudio del hígado
AcOft	Ácido oftálmico
AG	Ácido graso
ALT	Alanina aminotransferasa
ANOVA	Análisis de la varianza
AST	Aspartato aminotransferasa
AUROC	Área bajo la curva del operador característico
BA	Ácido biliar (bile acid)
CA	Ácido cólico (cholic acid)
CE	Electroforesis capilar (capillary electrophoresis)
Cer	Ceramidas
ChE	Éster de colesterol (cholesterol ester)
Cl-Tyr	3-cloro-L-tirosina
CP	Componentes principales
CV	Validación cruzada (cross validation)
DG	Diglicéridos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EHGNA	Enfermedad del hígado graso no alcohólica
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
EI	Impacto electrónico
EO	Estrés oxidativo
ESI	Ionización por electrospray (electro spray ionization)
FA	Fosfatasa alcalina
FDA	Administración de alimentos y fármacos

Listado de abreviaturas

	(food and drug administration)
FWHM	Anchura de pico total a media altura (full width at half maximum)
GC	Cromatografía de gases (gas chromatography)
GCA	Ácido glicocólico
GCS	γ -glutamylcisteína sintetasa
GGT	γ -glutamyl transpeptidasa
GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n oxidado
HCA	Análisis de conglomerados jerárquico (hierarchical cluster analysis)
HCC	Hepatocarcinoma
HCS	Rastreo de alto contenido (high content screening)
HDL	Lipoproteína de alta densidad (high density lipoprotein)
HMDB	Base de datos del metaboloma humano (human metabolome database)
HGNA	Hígado graso no alcohólico
HILIC	Cromatografía de interacci3n hidrofílica (hydrophilic interaction chromatography)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resoluci3n (high performance liquid chromatography)
IMC	Índice de masa corporal
I-Tyr	3-iodo-L-tirosina
LC	Cromatografía líquida (liquid chromatography)
LisoPA	Ácido lisofosfatídico
LisoPC	Lisofosfatidilcolina
LisoPE	Lisofosfaditiletanolamina
LLOQ	Límite inferior de cuantificaci3n (lower limit of quantification)
LOD	Límite de detecci3n
LV	Variable latente (latent variable)
m/z	Relaci3n masa/carga
MDA	Malondialdehido
MG	Monoglicéridos
MRM	Monitorizaci3n de reacciones múltiples
MS	Espectrometría de masas (mass spectrometry)

Listado de abreviaturas

MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
m-Tyr	DL-m-tirosina
MVDA	Análisis de datos multivariante (multivariate data analysis)
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NAS	Puntuación de la actividad de la EHGNA (NAFLD activity score)
NEM	N-etilmaleimida
N-Tyr	3-nitro-tirosina
OPLS-DA	Análisis discriminante por proyección ortogonal en las estructuras latentes (orthogonal projection to latent structures -discriminant analysis)
o-Tyr	DL-o-tirosina
PA	Ácido fosfatídico
PBS	Tampón fosfato salino (phosphate buffer saline)
PC	Fosfatidilcolinas
PCA	Análisis de componentes principales (principal component analysis)
PE	Fosfatidiletanolaminas
Phe	Fenilalanina
Phe-d5	Fenilalanina deuterada
PI	Patrón interno
PKC	Proteína quinasa C
PL	Fosfolípidos
PLS-DA	Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (partial least squares-discriminant analysis)
ppm	Partes por millón
PS	Fosfatidilserinas
p-Tyr	L-tirosina
Q²	Varianza predecida de Y
QC	Control de calidad (quality control)
QTOF	Cuadrupolo de tiempo de vuelo (quadrupole time of flight)
R²	Varianza explicada total de Y
RME	Error de medida relativo (relative measurement error)
RMN	Resonancia magnética nuclear

Listado de abreviaturas

ROS	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
RP	Fase reversa (reversed phase)
RSD	Desviación estándar relativa (relative standard deviation)
RT	Tiempo de retención (retention time)
SAH	S-(5-adenosil)-L-homocisteína
SAM	S-(5-adenosil)-L-metionina
SIMCA	Modelado suave independiente por analogía de clases (soft independent modeling of class analogy)
SM	Esfingomielinas
SNW	Lavado fuerte de la aguja (strong needle wash)
SRM	Monitorización de reacción seleccionada (single reaction monitoring)
TCA	Ácido taurocólico
TG	Triglicéridos
TMCS	Trimetilclorosilano
TQ	Triple cuadrupolo
ULOQ	Límite superior de cuantificación (upper limit of quantification)
UPLC	Cromatografía líquida de ultra-alta resolución (ultra performance liquid chromatography)
VIP	Importancia de la variable en la proyección (variable importance in the projection)
WNW	Lavado débil de la aguja (weak needle wash)

Listado de figuras

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema del sistema hepatobiliar.

Figura 1.2. Esquema del lóbulo hepático.

Figura 1.3. Esquema de la distribución de distintos tipos de células hepáticas.

Figura 1.4. **A1)** Aspecto de un hígado normal visto a ojo; **A2)** Aspecto de un hígado normal visto al microscopio; **B1)** Aspecto de un hígado graso visto a ojo; **B2)** Aspecto de un hígado graso visto al microscopio.

Figura 1.5. Espectro de la EHGNA.

Figura 1.6. Evolución morfológica de las lesiones del hígado graso no alcohólico hacia patologías más severas.

Figura 1.7. Etiopatogenia de la EHGNA. **A)** Teoría del doble impacto; **B)** Teoría multiimpacto.

Figura 1.8. Sistema de Kleiner para puntuación histológica de la Red de Investigación Clínica sobre EHNA.

Figura 1.9. Modelos animales no roedores usados para el estudio de la EHGNA: **A)** *Caenorhabditis elegans*; **B)** *Zarigüeya*; **C)** Cerdo de Ossabaw.

Figura 1.10. Representación de la " cascada de -ómicas ", junto con las cifras de la estimación del número de componentes que pertenecen a cada uno de los niveles.

Figura 1.11. Diagrama de flujo del esquema general del estudio metabólico.

Figura 1.12. Esquema de la estrategia propuesta para el perfilado metabólico global.

Figura 1.13. Ejemplo de modelo HCA obtenido para un conjunto de muestras pertenecientes a dos clases distintas.

Figura 1.14. Ejemplo de diagrama de puntuaciones y pesos obtenido al realizar un PCA a un conjunto de muestras pertenecientes a tres clases distintas.

Listado de figuras

Figura 1.15. Ejemplo de diagrama de puntuaciones obtenido al realizar un PLS-DA a un conjunto de muestras pertenecientes a dos clases distintas.

Figura 1.16. Ejemplo de test de permutación.

Figura 2.1. A) Precellys 24 Dual equipado con un refrigerador Cryolys. B) Savant SpeedVac conectado a una bomba de vacío y a una trampa de vapor refrigerada. C) Thermomixer

Figura 2.2. Plataforma metabolómica LC-MS usada. A) Equipo usado para estudios metabolómicos no dirigidos. B) Equipo usado para estudios metabolómicos dirigidos.

Figura 2.3. Plataforma metabolómica GC-MS usada.

Figura 2.4. Representación esquemática de los pasos más importantes llevados a cabo durante el procesamiento de datos.

Figura 2.5. Diagrama de flujo para la estrategia llevada a cabo en el análisis de los datos.

Figura 2.6. A) Ejemplo simulado de la aplicación del diagrama de densidad de distribución de caja de bigotes, B) PCA y C) HCA para la detección de valores atípicos.

Figura 2.7. A) 7-fold CV, los datos se dividen en 7 subgrupos diferentes. B) Los datos se dividen en dos subgrupos, 2/3 de los datos se utilizan como sistema para construir el modelo y el resto como prueba. C) En la prueba de permutación las clases (Y) son asignadas al azar (Y_p) y el modelo se desarrolla y valida utilizando las clases permutadas.

Figura 2.8. Ecuaciones fundamentales del PLS-DA.

Figura 2.9. Valores de R^2 , Q^2 y de error de clasificación en función del número de las LVs empleadas para construir el modelo PLS-DA.

Figura 2.10. Valores obtenidos para el AUROC (verde) y error de clasificación (rojo) frente al número de variables retenidas utilizando los datos simulados descritos en la Sección 2.6.2 basados en el remuestreo *bootstrap* acoplado a la estrategia de clasificación del VIP.

Listado de figuras

Figura 2.11. Gráficos de puntuaciones (A) y cargas (B) correspondientes al modelo PLS-DA desarrollado usando las 4 variables mejor clasificadas y 1LV, utilizando la simulación de datos descritos en la Sección 2.6.2 y un *bootstrapping* acoplado a la clasificación basada en VIP y a una estrategia de selección de variables.

Figura 2.12. Test de permutación ($n = 1.000$) para R^2 (A), Q^2 (B), error de clasificación (C) y AUROC (D) correspondiente al modelo PLS-DA desarrollado usando las 4 variables mejor clasificadas y 1LV, utilizando la simulación de datos descritos en la Sección 2.6.2 y un *bootstrapping* acoplado a la clasificación basada en VIP y a una estrategia de selección de variables.

Figura 2.13. A) Reacciones de derivatización del MDA con DNPH y B) GSH con NEM.

Figura 2.14. Diagrama de flujo de la preparación de la muestra para el método de estrés oxidativo antes del análisis UPLC-MS/MS.

Figura 2.15. A) Cultivo de células HepG2 a baja densidad. B) Cultivo de células HepG2 a alta densidad.

Figura 2.16. A) Células HepaRG sin diferenciar. B) Células HepaRG diferenciadas.

Figura 2.17. Hepatocitos humanos en cultivo primario.

Figura 2.18. Rata OFA

Figura 2.19. Clasificación de Kleiner para el grado de NAS obtenido como suma de los valores de esteatosis, inflamación lobulillar y balonización.

Figura 3.1. Ejemplo de una cola de análisis de muestras para el estudio metabolómico no dirigido en LC-MS y GC-MS.

Figura 3.2. A) Área de pico, B) error de masa y C) tiempo de retención para los PI sulfadimetoxina y reserpina añadidos en las muestra problema.

Figura 3.3. Diagrama de scores del PCA. Muestra la relación natural entre las diferentes clases de muestras (muestras problema, QC y blancos) incluidos en un análisis de ejemplo.

Figura 3.4. A) Diagrama de scores con dos componentes principales y B) con tres componentes principales del análisis PLS-DA realizado sobre

Listado de figuras

las muestras de células HepaRG con recarga lipídica (superior) y sin recarga lipídica (inferior) analizadas por GC-MS.

Figura 3.5. *Heatmap* realizado sobre las muestras de células HepaRG con recarga lipídica analizadas por GC-MS.

Figura 3.6. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con fármacos esteatósicos en células HepaRG con recarga lipídica analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma GC-MS.

Figura 3.7. A) Diagrama de scores con dos componentes principales y B) con tres componentes principales del análisis PLS-DA realizado sobre las muestras de células HepG2 analizadas por GC-MS.

Figura 3.8. *Heatmap* realizado sobre las muestras de células HepG2 analizadas por GC-MS.

Figura 3.9. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con fármacos esteatósicos en células HepG2 analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma GC-MS.

Figura 3.10. Diagrama de scores con dos componentes principales del análisis PLS-DA realizado sobre las muestras de células HepG2 analizadas por UPLC-MS de análisis lipídómico.

Figura 3.11. *Heatmap* realizado sobre las muestras de células HepG2 analizadas por UPLC-MS de análisis lipídómico.

Figura 3.12. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con fármacos esteatósicos en células HepG2 analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma UPLC-MS y condiciones de análisis lipídómico.

Figura 3.13. Diagrama de scores con dos componentes principales del análisis PLS-DA realizado sobre las muestras de hepatocitos humanos analizadas por UPLC-MS de análisis lipídómico.

Figura 3.14. *Heatmap* realizado sobre las muestras de hepatocitos humanos analizadas por UPLC-MS de análisis lipídómico.

Figura 3.15. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con fármacos esteatósicos en hepatocitos humanos analizadas mediante la estrategia de análisis

Listado de figuras

metabolómico no dirigido usando la plataforma UPLC-MS y condiciones de análisis lipidómico.

Figura 3.16. A) Diagrama de scores con dos componentes principales y B) con tres componentes principales del análisis PLS-DA realizado sobre las muestras de hígado y suero de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por UPLC-MS con condiciones de análisis lipidómico, general e HILIC.

Figura 3.17. *Heatmap* realizado sobre las muestras de hígado de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por UPLC-MS con condiciones de análisis lipidómico, general e HILIC.

Figura 3.18. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con tetraciclina de las muestras de hígado de ratas analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma UPLC-MS y condiciones de análisis lipidómico, general e HILIC.

Figura 3.19. *Heatmap* realizado sobre las muestras de suero de ratas tratadas con tetraciclina analizadas por UPLC-MS de análisis lipidómico y general.

Figura 3.20. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con tetraciclina de las muestras de suero de ratas analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma UPLC-MS y condiciones de análisis lipidómico y general.

Figura 3.21. A) Diagrama de scores con dos componentes principales y B) con tres componentes principales del análisis PLS-DA realizado sobre las muestras de hígado y suero de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por GC-MS.

Figura 3.22. *Heatmap* realizado sobre las muestras de hígado de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por GC-MS.

Figura 3.23. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con tetraciclina de las muestras de hígado de ratas analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma GC-MS.

Figura 3.24. *Heatmap* realizado sobre las muestras de suero de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por GC-MS.

Listado de figuras

Figura 3.25. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con tetraciclina de las muestras de suero de ratas analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma GC-MS.

Figura 3.26. Diagrama de scores con dos componentes principales del análisis PLS-DA realizado sobre las muestras de suero humano de pacientes diagnosticados con EHNA analizadas por GC-MS.

Figura 3.27. *Heatmap* realizado sobre las muestras de suero humano de pacientes diagnosticados con EHNA analizadas por GC-MS.

Figura 3.28. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes a las muestras de suero humano de pacientes diagnosticados con EHNA analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma GC-MS.

Figura 3.29. A) Diagrama de scores con dos componentes principales y B) diagrama de scores con tres componentes principales del PLS-DA realizado sobre las muestras de suero humano de pacientes diagnosticados con EHGNA analizadas por HILIC y RP por LC-MS.

Figura 3.30. Volcano plots de los metabolitos alterados significativamente en las muestras de suero humano de pacientes diagnosticados con EHGNA analizadas por HILIC y RP por LC-MS.

Figura 3.31. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes en las muestras de suero humano de pacientes diagnosticados con EHGNA analizadas mediante HILIC y RP por LC-MS.

Figura 3.32. Cromatogramas SRM obtenidos a partir una disolución patrón mixta que contenía todos los biomarcadores de estudio y los patrones internos (1 µg/mL) aplicando el método UPLC-MS/MS descrito.

Figura 3.33. A) Efecto de la concentración de DNPH en la derivatización de la disolución de MDA preparada en PBS a 1 µg/mL. B) Efecto de la concentración de NEM en la derivatización de la disolución de GSH preparada en PBS a 1 µg/mL.

Figura 3.34. A) Efecto de la DNPH 1 mM y NEM 10 mM en la respuesta de los analitos en estudio preparados en PBS a una concentración de 1 µg/mL, B) 0.5 µg/mL, C) 0.25 µg/mL y D) 0.125 µg/mL.

Figura 3.35. Biomarcadores de EO detectados en cultivo de hepatocitos de rata expuestos a cumene hidroperóxido 500 µM durante 24 h. A) Monocapa celular; B) Medio de cultivo.

Listado de figuras

Figura 3.36. Biomarcadores de EO detectados en ratas tratadas con paracetamol durante una semana. **A)** Tejido hepático de ratas tratadas con vehículo control (n=8) y ratas tratadas con paracetamol (n=8); **B)** Muestras de suero de ratas tratadas con vehículo control (n=8) y ratas tratadas con paracetamol (n=8).

Figura 3.37. Biomarcadores de EO detectados en pacientes diagnosticados con EHNA. **A)** Tejido hepático humano de pacientes control (n=16) y pacientes con EHNA (n=17); **B)** Muestras de suero de pacientes control (n=7) y pacientes con EHNA (n=10).

Figura 3.38. Niveles de AcOft (arriba) y del ratio GSH/GSSG (abajo) detectados en muestras de suero humano clasificadas según distintos estadios de EHNA. **A)** Cohorte 1: control (n=14), NAS < 5 (n=19), NAS ≥ 5 (n=21); **B)** Cohorte 2: control (n=19), NAS < 5 (n=51), NAS ≥ 5 (n=15).

Figura 3.39. Niveles de AcOft detectados en muestras de suero humano clasificadas según distintos grados de fibrosis. **A)** Cohorte 1: control (n=14), Fibrosis 0-1 (n=20) y Fibrosis 2-4 (n=20); **B)** Cohorte 2: control (n=19), Fibrosis 0-1 (n=53) y Fibrosis 2-4 (n=13).

Figura 4.1. Principales rutas lipídicas.

Figura 4.2. Alteraciones metabólicas en el tejido hepático esteatósico humano.

Figura 4.3. Mecanismo de la biosíntesis del ácido oftálmico.

Listado de tablas

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. Resumen de los distintos modelos *in vitro* y líneas celulares disponibles para el estudio de la EHGNA.

Tabla 1.2. Ventajas y desventajas de la espectrometría de masas (MS) y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).

Tabla 2.1. Datos de las diferentes estrategias empleadas para la selección de variables en los datos simulados que se describen en la Sección 2.6.2.

Tabla 2.2. Condiciones MS para la cuantificación de los marcadores de estrés oxidativo seleccionados.

Tabla 2.3. Compuestos y concentraciones utilizadas en el estudio no dirigido de hepatotoxicidad con células HepG2.

Tabla 2.4. Hepatotoxinas y concentraciones incluidas en el estudio no dirigido de hepatotoxicidad con células HepaRG.

Tabla 2.5. Compuestos y concentraciones utilizadas en el estudio no dirigido de hepatotoxicidad con hepatocitos humanos.

Tabla 2.6. Muestras de suero humano analizadas para la determinación de ácido oftálmico en la cohorte 1 y cohorte 2.

Tabla 3.1. Validación cruzada del modelo PLS-DA obtenido para las muestras de células HepaRG con recarga (2CP) y sin recarga lipídica (3CP) analizadas por GC-MS.

Tabla 3.2. Variables identificadas con un $VIP > 1$ en el análisis de muestras de células HepaRG con recarga y sin recarga lipídica analizadas por GC-MS.

Tabla 3.3. Variables comunes identificadas con un $VIP > 1$ en el análisis de muestras de células HepaRG con recarga y sin recarga lipídica analizadas por GC-MS.

Listado de tablas

Tabla 3.4. Rutas metabólicas alteradas obtenidas mediante un análisis de enriquecimiento funcional de las células HepaRG analizadas por GC-MS.

Tabla 3.5. Validación cruzada del modelo PLS-DA con 3 CP obtenido para las muestras de células HepG2 analizadas por GC-MS.

Tabla 3.6. Variables identificadas con un $VIP > 1$ en el análisis de muestras de células HepG2 por GC-MS.

Tabla 3.7. Variables comunes identificadas con un $VIP > 1$ en el análisis de muestras de células HepG2 y HepaRG por GC-MS.

Tabla 3.8. Rutas metabólicas alteradas obtenidas mediante un análisis de enriquecimiento funcional de las células HepG2 analizadas por GC-MS.

Tabla 3.9. Validación cruzada del modelo PLS-DA con 2 CP obtenido para las muestras de células HepG2 analizadas por UPLC-MS.

Tabla 3.10. Variables identificadas con un $VIP > 1$ en el análisis de muestras de células HepG2 por LC-MS de análisis lipidómico.

Tabla 3.11. Validación cruzada del modelo PLS-DA con 2 CP obtenido para las muestras de hepatocitos humanos analizadas por UPLC-MS.

Tabla 3.12. Variables identificadas con un $VIP > 1$ en el análisis de muestras de hepatocitos humanos por LC-MS de análisis lipidómico.

Tabla 3.13. Variables comunes identificadas con un $VIP > 1$ en el análisis de muestras de hepatocitos humanos y HepG2 por LC-MS de análisis lipidómico.

Tabla 3.14. Análisis clínico de las muestras de suero de ratas tratadas con tetraciclina.

Tabla 3.15. Validación cruzada del modelo PLS-DA obtenido para las muestras de tejido hepático y suero de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por UPLC-MS con condiciones de análisis lipidómico, general e HILIC.

Tabla 3.16. Variables identificadas con un $VIP > 1$ en el análisis de muestras de tejido hepático de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por UPLC-MS con condiciones de análisis lipidómico, general e HILIC.

Listado de tablas

Tabla 3.17. Variables identificadas con un $VIP > 1$ en el análisis de muestras de suero de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por UPLC-MS con condiciones de análisis lipidómico y general.

Tabla 3.18. Validación cruzada del modelo PLS-DA obtenido para las muestras de tejido hepático y suero de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por GC-MS.

Tabla 3.19. Variables identificadas con un $VIP > 1$ en el análisis de muestras de tejido hepático de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por GC-MS.

Tabla 3.20. Rutas metabólicas alteradas obtenidas mediante un análisis de enriquecimiento funcional de las muestras de hígado de ratas analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma GC-MS.

Tabla 3.21. Variables identificadas con un $VIP > 1$ en el análisis de muestras de suero de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por GC-MS.

Tabla 3.22. Rutas metabólicas alteradas obtenidas mediante un análisis de enriquecimiento funcional de las muestras de suero de ratas analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma GC-MS.

Tabla 3.23. Validación cruzada del modelo PLS-DA con 2 CP obtenido para las muestras de suero humano analizadas por GC-MS.

Tabla 3.24. Variables identificadas con un $VIP > 1$ en el análisis de muestras de suero humano, analizadas por GC-MS.

Tabla 3.25. Rutas metabólicas alteradas obtenidas mediante un análisis de enriquecimiento funcional de las muestras de suero humano analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma GC-MS.

Tabla 3.26. Descripción de la cohorte en estudio.

Tabla 3.27. Validación cruzada del modelo PLS-DA con 3 CP obtenido para las muestras de suero humano analizadas por LC-MS.

Tabla 3.28. Variables identificadas con un $VIP > 1$ en el análisis de muestras de suero humano, analizadas por LC-MS.

Listado de tablas

Tabla 3.29. Parámetros MRM seleccionados para la determinación de los 16 biomarcadores de EO y los 2 PIs.

Tabla 3.30. Resultados obtenidos al evaluar el efecto matriz del método UPLC-MS/MS desarrollado cuando se analizan diferentes matrices biológicas.

Tabla 3.31. Resultados obtenidos al evaluar la exactitud del método UPLC-MS/MS desarrollado.

Tabla 3.32. Resultados obtenidos al evaluar la precisión del método UPLC-MS/MS desarrollado.

Tabla 3.33. Parámetros de ajuste del método UPLC-MS/MS desarrollado.

Tabla 3.34. Descripción de la cohorte 1.

Tabla 3.35. Descripción de la cohorte 2.

Tabla 4.1. Resumen de los estudios de análisis no dirigidos en modelos *in vitro/in vivo*.

Resumen

RESUMEN

La esteatosis o hígado graso es la acumulación de lípidos, principalmente triglicéridos, en los hepatocitos en una proporción superior al 5% del peso del órgano. La esteatosis simple se considera una condición benigna que aparentemente no afecta a la función hepática, sin embargo se acepta como un paso previo al desarrollo de patologías más severas como esteatohepatitis no alcohólica (EHNA, caracterizada por inflamación, infiltración y daño celular), fibrosis y cirrosis (conocidas en conjunto como “enfermedad del hígado graso no alcohólico” o EHGNA). La EHGNA, considerada como la enfermedad hepática más común en los países occidentales (25% de prevalencia), es un fenómeno complejo tanto en la diversidad de mecanismos implicados en su etiología como en su evolución clínico-patológica. Por todo ello, existe un creciente interés en profundizar en los eventos que conducen a su evolución hacia patologías más severas (EHNA, fibrosis, cirrosis), así como su diagnóstico precoz.

La metabolómica ha surgido como una estrategia prometedora para realizar investigaciones en diversas áreas relacionadas con la salud humana (farmacología, toxicología, oncología...). Esta disciplina completa la información aportada por otras “-ómicas” (genómica, proteómica) mediante la medida cuantitativa de los metabolitos endógenos presentes en muestras biológicas de distinto origen (orina, plasma, células, tejidos). Los metabolitos son productos finales de la función de genes y proteínas, por lo que los perfiles metabolómicos son como “huellas dactilares” que reflejan el estado fisiológico en el que se encuentra un sistema biológico (célula, tejido, organismo).

Hasta el momento los estudios metabolómicos aplicados al estudio de la esteatosis hepática se han centrado en la búsqueda de biomarcadores

Resumen

de diagnóstico prestando una menor atención a los cambios metabólicos relacionados con el desarrollo y progresión de la enfermedad. Por ello, en la presente tesis se propuso la aplicación de esta herramienta para dilucidar las alteraciones metabólicas, bioquímicas y de la homeostasis celular que son claves en el desarrollo de la esteatosis y su potencial progresión a patologías más severas. Para ello, se emplearon modelos *in vitro* de células hepáticas expuestas a fármacos esteatogénicos, modelos animales *in vivo* y muestras de origen humano. La aplicación de estrategias metabólicas permitió identificar perfiles metabólicos que representan la “huella dactilar” de la EHGNA inducida por diferentes mecanismos y proponer nuevos biomarcadores de diagnóstico y prognosis. Se encontró que la huella metabólica característica de la enfermedad estaba compuesta fundamentalmente por aminoácidos, marcadores de EO y marcadores de origen lipídico, entre los que encontramos ácidos biliares y fosfolípidos entre otros. Además se apuntó al AcOft como un candidato a biomarcador sérico de la EHGNA. En definitiva, hemos ahondado en los cambios metabólicos asociados a la EHGNA con el objetivo de desarrollar estrategias para su diagnóstico y seguimiento basadas en los perfiles metabólicos que puedan ser aplicadas en la rutina clínica.

“El todo es más que la suma de sus partes”

Aristóteles

“El experimentador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo que encuentra”

Claude Bernard

“Si no quieres perderte en el olvido tan pronto como estés muerto, escribe cosas dignas de leerse, o haz cosas dignas de escribirse”

Benjamin Franklin

1. Introducción

Introducción

1.1 Aspectos generales de la estructura del hígado y su funcionalidad

El hígado juega un papel esencial en una gran variedad de funciones para mantener la homeostasis en el organismo. Este órgano es capaz de sintetizar, degradar o almacenar una amplia variedad de moléculas de forma regulada. Está implicado en el metabolismo de sustancias tan diferentes como los hidratos de carbono, lípidos, aminoácidos, ácidos biliares (BAs), vitaminas, esteroides o hierro. El hígado también produce la mayor parte de las proteínas plasmáticas circulantes, incluyendo el componente más abundante, la albúmina. Además, es el órgano principal en la detoxificación de xenobióticos [1-3].

El hígado es el órgano sólido más grande en el cuerpo humano (de 1.300 a 1.700 g en adultos) y se encuentra en la cavidad abdominal. El suministro de sangre al hígado se realiza por dos vasos sanguíneos diferentes: i) la vena porta hepática, que representa alrededor del 80% del suministro sanguíneo hepático y que lleva sangre que, después de haber circulado a través del intestino, el páncreas y el bazo, es pobre en oxígeno y enriquecida en nutrientes, xenobióticos, hormonas y factores de crecimiento; y ii) la arteria hepática, que suministra sangre rica en oxígeno desde la arteria aorta. El patrón inusual de suministro de sangre en el hígado es esencial para comprender su papel en el metabolismo tanto de nutrientes como de xenobióticos [2,4]. Dos vasos eferentes diferentes salen del hígado. Por un lado, la sangre se drena en las venas centrales y sale del hígado a través de una serie de venas hepáticas, que entran en la vena cava inferior. Por otro lado, la bilis producida en el hígado se recoge en canalículos biliares, que se fusionan para formar conductos biliares (**Figura 1.1**).

Introducción

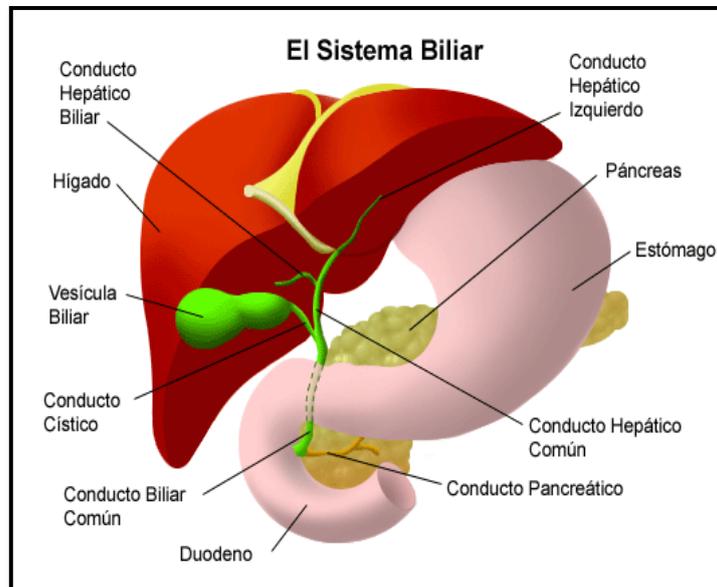


Figura 1.1. Esquema del sistema hepatobiliar.
(Fuente: [https:// hepatitis2000.org/que-es-la-hepatitis-c](https://hepatitis2000.org/que-es-la-hepatitis-c))

La unidad estructural básica del hígado es el lóbulo hepático. Tiene la forma de un polígono, por lo general un hexágono. Cada esquina del lóbulo hepático poligonal está ocupada por una tríada portal, que consiste en la arteria hepática, vía biliar y la vena portal. En el centro de cada lóbulo hepático se encuentra la vena central. El área definida por este hexágono está ocupada por placas de hepatocitos que adoptan una distribución radial de la vena central en el perímetro del lóbulo (**Figura 1.2**). Las placas o cordones hepáticos son generalmente de un hepatocito de espesor y están separadas una de otra por los sinusoides hepáticos (los capilares del hígado) que se alinean por el endotelio sinusoidal [3,5].

La unidad funcional del hígado, conocido como el acino, está delimitada por el espacio elíptico o en forma de diamante que comprende dos venas centrales adyacentes, conectadas por el eje largo, y de tríadas portales adyacentes, conectadas por el eje corto [5,6]. A lo largo de este eje tienen lugar dos flujos de fluidos diferentes. La sangre entra en el hígado por la vena porta y las arterias hepáticas hasta las

Introducción

triadas portales, fluye a través de los sinusoides y sale por la vena central. Por otro lado, la bilis fluye en la dirección opuesta, pasando así a través de los canalículos de las placas de hepatocitos a los conductos biliares situados en la triada portal [3,5] (**Figura 1.2**).

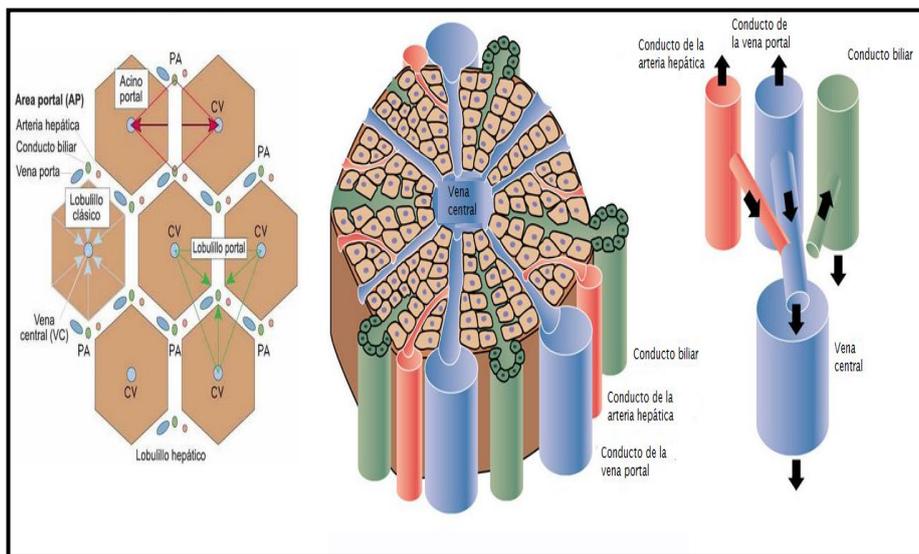


Figura 1.2. Esquema del lóbulo hepático
(Fuente: <https://www.flickr.com/photos/29991960@N00/34590654>)

1.2 Las células del hígado

El hígado está compuesto por una gran variedad de células. Los hepatocitos, el tipo de células más abundante, llevan a cabo la mayoría de las funciones asociadas con el hígado [5]. Son responsables de la síntesis y la excreción de proteínas plasmáticas, factores de coagulación, lipoproteína, etc. Por otra parte, controlan la homeostasis de la glucosa/glucógeno, triacilglicéridos (TG), colesterol, BAs, vitaminas A y D, y metabolizan los aminoácidos, metales, bilirrubina, y xenobióticos [1]. Sin embargo, los hepatocitos por sí solos no son competentes para llevar a cabo todas las funciones hepáticas, y la cohorte de las células no parenquimatosas es esencial para el mantenimiento de la estructura del

Introducción

hígado, contribuyendo a diversas funciones que apoyan y regulan el crecimiento y la función hepática. Las células no parenquimatosas principales son las células epiteliales de los conductos biliares (o colangiocitos), células endoteliales sinusoidales hepáticas, células estrelladas hepáticas, células de Kupffer y células progenitoras hepáticas [5,7] (**Figura 1.3**). El hígado también contiene una población grande y diversa de inmunocitos residentes que, junto a las células de Kupffer y las células endoteliales sinusoidales hepáticas, son componentes esenciales del sistema inmune centrado en el hígado [2,5,8].

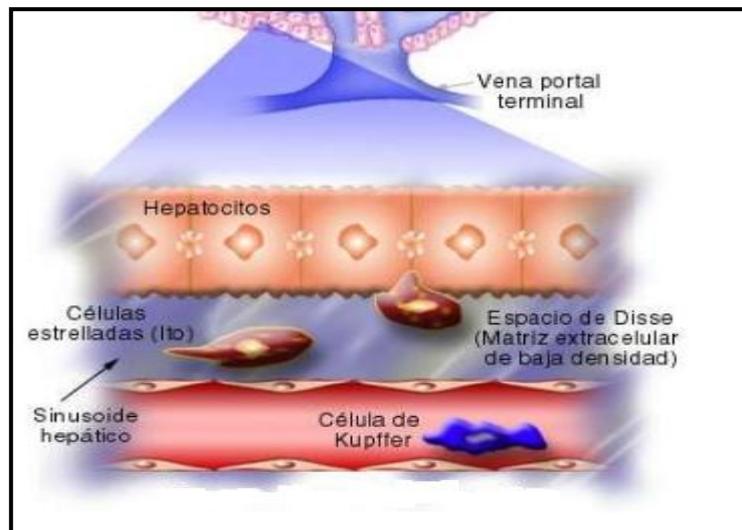


Figura 1.3. Esquema de la distribución de distintos tipos de células hepáticas.
(Fuente: <https://es.slideshare.net/mauriciovelasquezp/cirrosis-hepatica>)

Los hepatocitos son células grandes y representan aproximadamente el 60% de la población total de células y aproximadamente 80% de la relación masa hepática/volumen [2,3,5,7]. Los hepatocitos poseen uno o más núcleos, como resultado de la división mitótica del núcleo sin la citocinesis, con nucléolos prominentes, indicativos de una actividad transcripcional intensa. Debido a sus numerosas y variadas funciones (metabólicas, de almacenamiento y secretoras), los hepatocitos

Introducción

contienen abundantes mitocondrias, lisosomas, peroxisomas y complejos de Golgi, principalmente adyacentes a los canalículos biliares. El citoplasma es rico en retículo endoplasmático rugoso, indicativo de la naturaleza secretora del hepatocito y también en retículo endoplasmático liso, donde se localizan muchas de las enzimas que participan en la fase I y fase II de biotransformación de compuestos endógenos y exógenos [2,5].

Debido a la configuración particular de las células en los cordones hepáticos, cada hepatocito es adyacente a dos hepatocitos vecinos y posee dos dominios basolaterales que se interconectan con los sinusoides en lados opuestos de las placas celulares [5,9]. El dominio basolateral está formado por la membrana plasmática sinusoidal y lateral. En el lado sinusoidal, los hepatocitos están directamente en contacto con la mayoría de las sustancias de la sangre gracias a las fenestraciones presentes en las membranas de la célula endotelial sinusoidal hepática. En la membrana lateral, los hepatocitos vecinos están conectados a través de uniones, permitiendo así la comunicación de los hepatocitos adyacentes mediante la transferencia de pequeñas moléculas [2,10]. El dominio apical del hepatocito representa una pequeña porción de la membrana plasmática y se encuentra entre las células, partiendo la membrana plasmática basolateral mediante uniones estrechas y formando el canalículo biliar [9]. Estos dominios de membrana muestran diferencias estructurales, de composición y funcionales y son esenciales para la función de los hepatocitos en la absorción, en el metabolismo y en la eliminación biliar de sustratos, tanto endógenos como exógenos [5]. En general, la membrana plasmática basolateral tiene transportadores que eliminan las sustancias (por ejemplo, sales biliares, fármacos) de la sangre venosa portal por difusión facilitada a lo largo de un gradiente de concentración, mientras que la membrana apical tiene transportadores que bombean sustancias

Introducción

contra un gradiente de concentración desde el interior de la célula al canalículo biliar [9].

El hígado es un órgano especialmente propenso a sufrir daño de origen tanto metabólico como iatrogénico debido a su localización anatómica particular y su participación en el metabolismo de fármacos y en la desintoxicación. Como se ha descrito anteriormente, el hígado está interpuesto funcionalmente entre el sitio de absorción de compuestos exógenos y la circulación sistémica. Por lo tanto, a través del suministro de sangre de la vena porta, el hígado se expone directamente a todas las sustancias ingeridas que están presentes en la sangre portal [11-13]. Por otro lado, el hígado es cuantitativa y cualitativamente el órgano más importante en cuanto al metabolismo de fármacos se refiere, debido a la expresión en los hepatocitos de las enzimas metabolizadoras de fase I y fase II y de los transportadores de fármacos. Así, el hígado, junto con las enzimas metabolizadoras y los transportadores de fármacos expresados en la mucosa intestinal, proporcionan una barrera eficaz que impide que los xenobióticos entren en la circulación sistémica [14]. Sin embargo, la alta exposición del hígado a xenobióticos, su implicación en su metabolismo y la posibilidad de formación de especies reactivas hacen del hígado un tejido especialmente sensible al daño metabólico e inducido por fármacos [15,16].

Introducción

1.3 La esteatosis hepática

El hígado graso no alcohólico (HGNA) se caracteriza por el depósito de ácidos grasos libres y de triglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos, en forma de grandes vacuolas, en pacientes sin consumo tóxico de alcohol y no asociado a otras enfermedades hepáticas [17-19] (Figura 1.4).

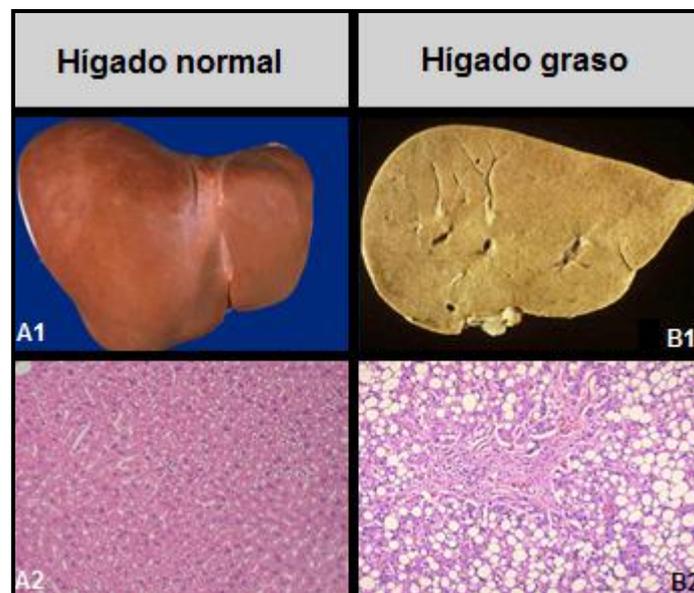


Figura 1.4. A1) Aspecto de un hígado normal visto a ojo; A2) Aspecto de un hígado normal visto al microscopio; B1) Aspecto de un hígado graso visto a ojo; B2) Aspecto de un hígado graso visto al microscopio.

En 1980 Ludwig y col. propusieron el término “esteatohepatitis no alcohólica” (EHNA) para designar aquellas lesiones que reproducen las producidas por el alcohol pero que se encuentran en personas que no abusan de él y que se definió como “un síndrome clínico patológico que afecta básicamente a personas obesas, mujeres diabéticas, que niegan el

Introducción

consumo de alcohol pero que presentan unas lesiones hepáticas similares a las producidas por el alcohol” [17].

En la actualidad el término EHNA queda englobado dentro de una entidad más amplia, la enfermedad hepática por depósito de grasa no asociada al consumo de alcohol o enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA). Esta enfermedad incluye varios estadios evolutivos como son la esteatosis hepática simple, la esteatohepatitis no alcohólica propiamente dicha (inflamación acompañada normalmente de fibrosis), la cirrosis hepática y finalmente el hepatocarcinoma (HCC) (Figura 1.5),

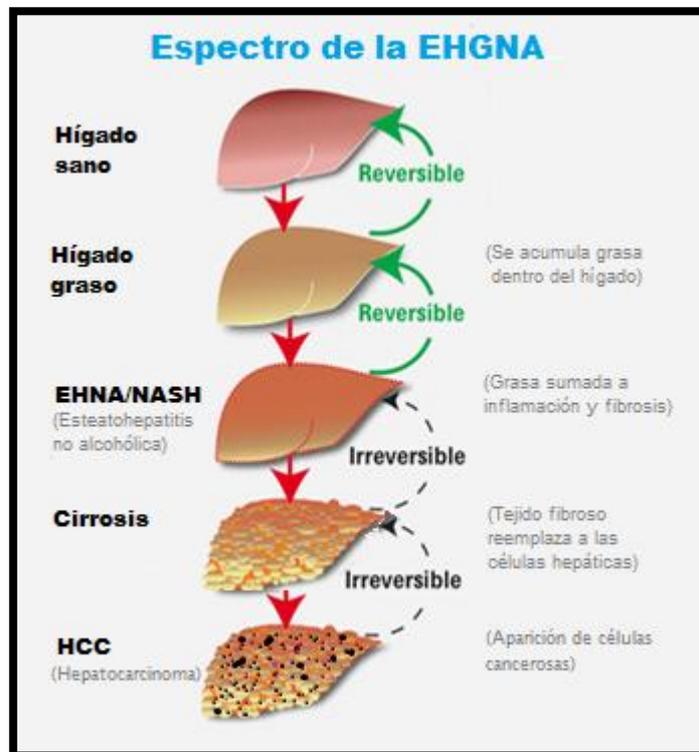


Figura 1.5. Espectro de la EHGNA.

Se estima que un 20% de los pacientes con EHGNA presenta características histopatológicas de EHNA y algunos de ellos progresarán

Introducción

a fibrosis avanzada, cirrosis e incluso hepatocarcinoma, estando aún sin dilucidar completamente los mecanismos implicados [18,19].

La AASLD (Asociación Americana para el Estudio del Hígado) define la EHGNA como la existencia de un hígado graso en sujetos con ingesta diaria de alcohol ≤ 20 g/día, en ausencia de infección por virus de la hepatitis B o C. Se requiere evidencia de esteatosis hepática radiológica o histológica, siempre en ausencia de etiología secundaria (alcohol, fármacos, hereditaria).

1.3.1 Prevalencia

La prevalencia de la EHGNA no es bien conocida y probablemente se encuentra infravalorada. Esto es debido a que gran parte de los pacientes son asintomáticos y/o presentan discretas alteraciones analíticas en la bioquímica hepática y, debido a la ausencia de marcadores serológicos concretos, se requiere de una biopsia hepática para establecer el diagnóstico definitivo. Sin embargo, se tiene constancia de que en las dos últimas décadas la EHGNA y la EHNA han aumentado su incidencia, siendo actualmente la EHGNA la causa más frecuente de enfermedad hepática en los países occidentales [20].

La prevalencia estimada varía entre el 20-30% de EHGNA en la población general en los países occidentales y del 15% en los países asiáticos. En cuanto a la EHNA afectaría sólo al 2-3% de la población general. La EHGNA se ha observado en individuos de todas las edades, incluyendo los niños, donde se estima una prevalencia del 10-15%, menor que en la población adulta. Como norma, la prevalencia aumenta con la edad y afecta por igual a ambos sexos [21,22].

Por lo general se trata de una enfermedad silenciosa que se presenta en un alto porcentaje de pacientes con síndrome metabólico. Entre un 80-90% de los pacientes con obesidad presentan algún grado de EHGNA. Entre los que padecen Diabetes Mellitus tipo 2 la prevalencia oscila entre

Introducción

el 10-75% y en aquellos sujetos que presentan hiperlipidemia entre el 20 y el 90% [23]. En cuanto al espectro de la enfermedad, la esteatosis hepática varía entre el 39-51%, la esteatohepatitis del 20-35% y la cirrosis alrededor de un 3% [22,24].

Se podría considerar que la EHGNA es la causa más frecuente de hepatopatía crónica en el mundo y la principal causa de cirrosis criptogénica (se ha implicado como factor etiológico hasta en un 70% de los casos de cirrosis criptogénica I) [25]. Además, se ha considerado la expresión hepática del síndrome metabólico y se ha establecido como un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular.

Todo lo anteriormente comentado, sumado a que las cifras de sobrepeso y obesidad están aumentando a nivel mundial, convertirán a corto plazo a la EHGNA en la hepatopatía más común, tanto en países ricos como pobres, con grandes repercusiones económicas y en salud pública. Además, se estima que para el año 2020 la cirrosis por EHNA se convertirá en la principal indicación de trasplante hepático en los Estados Unidos [26].

1.3.2 Historia natural de la enfermedad

Existen pocos datos acerca de la historia natural de esta enfermedad debido a la naturaleza indolente del proceso y a la escasez de estudios prospectivos [27-29].

Los pocos estudios publicados sobre la historia natural de la EHGNA indican un riesgo significativo de cirrosis hepática y sus complicaciones, con disminución de la supervivencia. Hace años se consideraba que la EHGNA era inofensiva, pero con el paso del tiempo se ha reconocido que se trata de una enfermedad que provoca una alteración hepática progresiva que aumenta el riesgo de padecer cirrosis, enfermedad hepática terminal y carcinoma hepatocelular [30] (**Figura 1.6**).

Introducción



Figura 1.6. Evolución morfológica de las lesiones del hígado graso no alcohólico hacia patologías más severas.

El pronóstico de estas lesiones no es homogéneo. Mientras que la esteatosis es una lesión estable (solamente un 3% de los casos progresa a lesiones más graves), la EHNA evoluciona a cirrosis en el 15-25% de los casos en un plazo de 10-15 años y hasta un 30-40% presentan una fibrosis avanzada en la biopsia (definida como F3-F4) en el momento del diagnóstico [31]. Así pues, la esteatosis simple no implica un aumento de la morbilidad o la mortalidad a corto plazo, pero su progresión hacia el desarrollo de EHNA aumenta de forma drástica el riesgo de cirrosis, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular.

La esteatosis simple tiene una mortalidad global comparable con la población general. No ocurre así con la EHNA, para la que se ha descrito un peor pronóstico, basado fundamentalmente en una mayor mortalidad de origen hepático (11-17,5% frente al 1,7-2,7%). Además, la mortalidad por causa hepática es mayor en pacientes con EHNA y fibrosis F3-F4 que en pacientes con EHNA y fibrosis F0-F2 (que a su vez es mayor que en aquellos con esteatosis simple). Otro dato llamativo es que existe una mayor capacidad de progresión a estadio de cirrosis cuanto mayor es el grado de fibrosis inicial (el 13% para F1-F2 frente al 25% para F3) [31].

Introducción

1.3.3 Etiopatogenia

Las causas que provocan EHGNA son múltiples, pudiéndose clasificar en primarias y secundarias. Las primarias, que son las más importantes, son aquellas que están en relación con el síndrome metabólico (obesidad, diabetes, dislipemia e hipertensión arterial) y la resistencia a la insulina. Las causas secundarias están relacionadas con el consumo de medicamentos, trastornos metabólicos y nutricionales [32].

La EHGNA se asocia a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, y es un factor de riesgo de morbilidad y mortalidad cardiovascular [33].

En la práctica clínica la mayoría de los pacientes presentan Diabetes Mellitus tipo 2 o hiperlipidemia como factor etiológico siendo la asociación entre ellos frecuente y, de ellos, los predictores más importantes de fibrosis son edad, obesidad y la Diabetes Mellitus tipo 2 [34].

La etiopatogenia de la EHGNA es compleja; en ella la resistencia a la insulina juega un papel fundamental. La teoría patogénica más aceptada es *la teoría del doble impacto* propuesta por Day y James en 1998 [35]. En una primera fase se desarrollaría esteatosis en el hepatocito por aumento de los ácidos grasos libres en el suero a causa de su mayor liberación desde el tejido adiposo. Factores como el estilo de vida, la flora intestinal, la obesidad, diabetes, factores genéticos y la resistencia a la insulina inducirían el acúmulo de lípidos a nivel hepático excediendo las necesidades fisiológicas. Este sería el primer impacto en el desarrollo de enfermedad hepática por depósito de grasa. Posteriormente, fenómenos de estrés oxidativo, agotamiento de antioxidantes, disfunción mitocondrial o regulación de citocinas llevarían a una segunda agresión desencadenando inflamación y fibrosis. Recientemente se ha propuesto una *teoría de multiimpacto* en la cual todos los procesos tendrían lugar de forma simultánea estando la esteatosis probablemente

Introducción

precedida por la aparición de los fenómenos inflamatorios [36-42] (Figura 1.7).

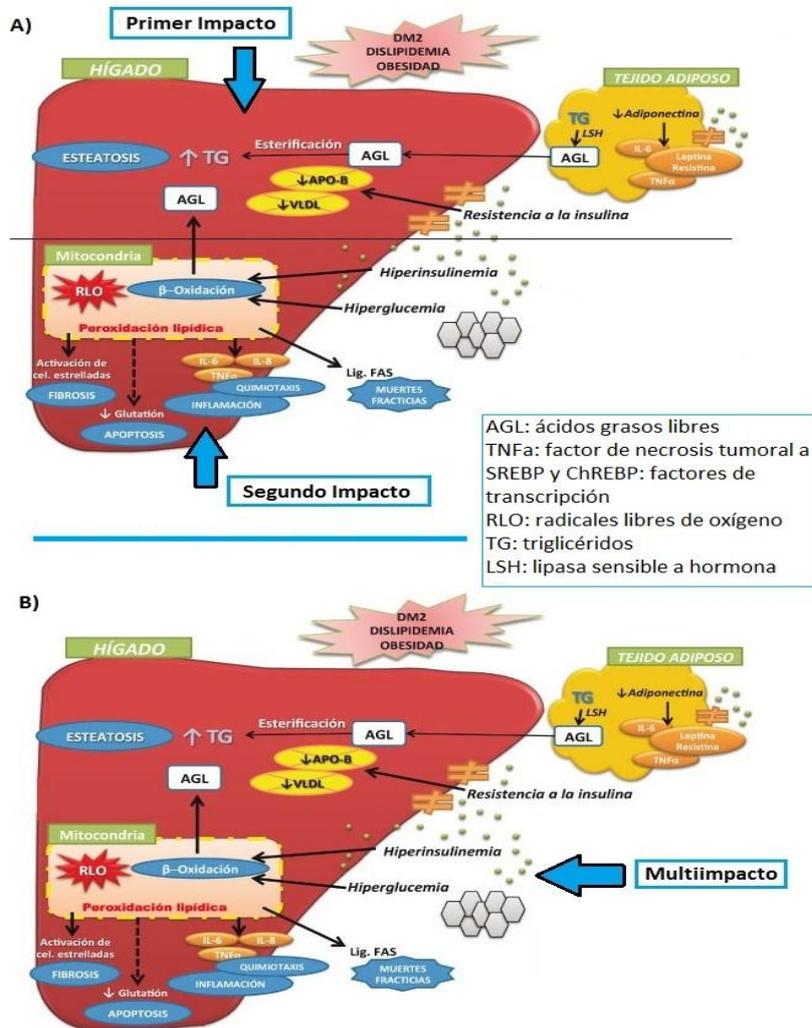


Figura 1.7. Etiopatogenia de la EHGNA. A) Teoría del doble impacto; B) Teoría multiimpacto. Figura adaptada de la referencia [42].

La investigación de factores implicados en la etiopatogenia de la EHGNA señala la existencia de biomarcadores potenciales de inflamación y fibrosis: HNF3a, TBA, adiponectina, resistina, leptina, TNFa,

Introducción

interleuquinas, ácido hialurónico, endotelina-1, TGF β , laminina, colágenos I, III y IV, péptidos de degradación del colágeno (PIIINP, PICP), MMP, TIMP, CK-18 [43-50]. Todo está siendo objeto de una intensa investigación para, en un futuro, ser aplicado en la práctica clínica.

1.3.4 Evaluación diagnóstica y pronóstica

La EGHNA, en general, debe sospecharse en pacientes que presentan uno o varios componentes del síndrome metabólico, una elevación aislada y moderada de transaminasas (en especial de alanina aminotransferasa (ALT)), ligera colestasis disociada o que presentan signos de esteatosis en la ecografía hepática. Es necesario descartar, por supuesto, otras causas de hepatopatía (virales, depósitos de hierro...).

Los pacientes suelen estar asintomáticos o presentar manifestaciones clínicas inespecíficas. Suelen presentar una elevación de las transaminasas, con un cociente entre aspartato aminotransferasa (AST) y ALT menor a uno ($AST/ALT < 1$). La ultrasonografía puede mostrar un hígado hiperecogénico, de aspecto brillante, sugestivo de esteatosis y hacer una ponderación semicuantitativa del porcentaje de grasa.

En ausencia de suficientes signos clínicos de cirrosis, la biopsia hepática es el único medio que nos permite establecer el diagnóstico, clasificando y estadificando la enfermedad. Sin embargo, dado que la mayoría de los pacientes se encuentran asintomáticos, y que la biopsia es una exploración invasiva, sumado a que todavía no se ha encontrado un tratamiento específico, las diferentes guías clínicas recomiendan en primera instancia modificar los hábitos higiénico-dietéticos del paciente y reservar la biopsia para cuando no se sigan las indicaciones clínicas o haya persistencia de alteraciones clínico-biológicas.

La biopsia no es únicamente útil para el diagnóstico y diferenciación de la esteatosis de la esteatohepatitis, sino que también permite establecer la gravedad de las lesiones. Actualmente la clasificación más

Introducción

utilizada es la de *Kleiner et al.*, que da un índice de actividad (NAS: NAFLD *activity score*) basado en la presencia e intensidad de la esteatosis, inflamación y balonización de los hepatocitos y un índice de fibrosis. El NAS oscila en un rango de 0 a 8. Un NAS <3 corresponde con “no esteatohepatitis” y un NAS ≥ 5 corresponde con “esteatohepatitis”. El rango 3-4 correspondería a un estado “intermedio-indeterminado” [51] **(Figura 1.8)**.

A pesar de las ventajas de la biopsia hepática queda claro que tiene una serie de inconvenientes, como la dificultad de realizar biopsias seriadas para monitorización de la evolución de la enfermedad y valorar el efecto de los posibles tratamientos. Es por ello que actualmente se está tratando de identificar métodos no invasivos (clínicos, analíticos, radiológicos) que sirvan de complemento a la biopsia hepática y/o una alternativa a la misma. Algunos de estos métodos están encaminados a diferenciar la esteatosis de la esteatohepatitis, mientras que otros se centran en intentar determinar la gravedad de las lesiones, en especial la fibrosis. Entre los índices de fibrosis en la EHGNA se pueden encontrar: i) índice de BARD, que incluye el índice de masa corporal (IMC), cociente ALT/AST y la presencia de diabetes mellitus, así como datos clínicos de fácil aplicación proporcionando una capacidad de exclusión de la enfermedad hepática avanzada con gran precisión; ii) NAFLD fibrosis score: proporciona un valor de fibrosis en función de si ésta es perisinusoidal, portal o periportal, perisinusoidal y periportal, en puentes o si ya existe cirrosis; iii) FibroScan: basado en una elastografía hepática transitoria (principio físico que cuantifica la rigidez-elasticidad de los tejidos) que permite estimar de forma no invasiva el grado de tejido fibrosos presente en el hígado. En última instancia, los métodos no invasivos puede que en un futuro próximo ayuden a evitar en muchos casos la necesidad de una biopsia hepática.

Introducción

Grado Esteatosis (0-3)	Inflamación Lobular (0-3)	Balonización (0-2)
0: < 5%	0: No hay	0: No hay
1: 5%-33%	1: < 2	1: Pocas células
2: 33%-66%	2: 2-4	2: Muchas células
3: > 66%	3: > 4	
NAFLD activity score NAS: 0-8	0-2 No EHNA/NASH 3-4 Indeterminado 5-8 EHNA/NASH	

Estadío de la fibrosis
0: No hay fibrosis
1a: Fibrosis leve, perisinusoidal zona 3
1b: Fibrosis moderada, perisinusoidal zona 3
1c: Sólo fibrosis portal/periportal
2: Fibrosis perisinusoidal zona 3 y fibrosis portal/periportal
3: Fibrosis formando puentes
4: Cirrosis

Figura 1.8. Sistema de Kleiner para puntuación histológica de la Red de Investigación Clínica sobre EHNA.

Como hemos comentado, los métodos no invasivos combinan datos clínicos y de laboratorio intentando identificar a los pacientes con alto riesgo de presentar EHGNA y ayudando a predecir la fibrosis hepática significativa. Entre los marcadores serológicos de inflamación/fibrosis estudiados se incluyen los anteriormente citados en el **punto 1.3.3**.

Los principales factores predictores analíticos y clínicos de fibrosis avanzada en la EGHNA, identificados en la literatura científica, son: la edad, la obesidad, la diabetes, la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico, el cociente AST/ALT y la trombopenia [52-55].

Introducción

1.4. Alteración de especies ROS y su relación con la EHGNA

Los organismos aeróbicos producen especies reactivas de oxígeno (ROS) continuamente tanto como consecuencia de sus procesos metabólicos normales, incluyendo la respiración celular, como por factores externos como el tabaco, la radiación ionizante o las toxinas. La exposición persistente a ROS puede producir daño oxidativo de moléculas circundantes que finalmente pueden alterar su estructura y función.

Para controlar la homeostasis de ROS y evitar ser dañados, los organismos aeróbicos han desarrollado diferentes sistemas biológicos, incluyendo: enzimas (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasas) y antioxidantes hidro y liposolubles (por ejemplo glutatión, ubiquinol, bilirrubina, ácido úrico, α -tocopherol y ácido ascórbico).

El desequilibrio entre la producción de ROS y la protección antioxidante provoca alteraciones en la homeostasis oxidativa, la cual puede provocar el desarrollo de la enfermedad [56,57].

ROS están implicados en la patogénesis de muchas enfermedades como la diabetes, aterosclerosis, EHGNA, cáncer y enfermedades neurodegenerativas [58-61] y son considerados una causa importante de toxicidad celular inducida por exposición a fármacos o productos químicos [62,63]. Es por ello que la detección directa de ROS y sus efectos adversos en sistemas biológicos han sido de especial importancia desde hace muchos años [64,65].

Dentro de la patogénesis del hígado graso las especies ROS son claves en la alteración del metabolismo energético y en la función mitocondrial y hay evidencias considerables de que el estrés oxidativo (EO) está presente en la EHGNA [66,67]. La oxidación de ácidos grasos acumulados dentro de las mitocondrias junto a otros mecanismos conduce a la generación de ROS y el consiguiente EO. La peroxidación lipídica y EO son un segundo hit en la enfermedad y desempeñan un

Introducción

papel importante contribuyendo a la progresión del espectro de la enfermedad de la EHGNA a la EHNA [67,68]. La disfunción mitocondrial acompañada de generación de ROS existe a múltiples niveles en pacientes con EHNA [69,70], encontrándose que los pacientes con EHNA tienen niveles muchos más altos de marcadores de EO en comparación con pacientes con EHGNA [71,72]. Además, los marcadores séricos de la peroxidación lipídica y EO están también incrementados, al contrario que los niveles de antioxidantes (vitamina E, retinol...) que se encuentran reducidos en pacientes con EHGNA en comparación con controles sanos [73-76].

En un estado fisiológico normal, los radicales libres u otras especies químicas altamente reactivas están presentes a concentraciones muy bajas y poseen vidas muy cortas, hechos que dificultan su detección directa. Una alternativa racional a la detección directa de estas especies inestables consiste en la medida del daño que provocan. Esto se puede conseguir mediante la determinación de biomarcadores indirectos de EO. Los productos moleculares formados por reacciones no enzimáticas entre moléculas biológicas y ROS son generalmente considerados más estables que los ROS [77]. Hasta el momento, se han descrito múltiples marcadores de EO, pero su detección ha venido acompañada de considerables dificultades analíticas y más cuando se trataba de muestras biológicas complejas [78]. No existe un único indicador universal de EO y se requiere de múltiples parámetros específicos, cada uno de ellos determinado de forma individual y mediante un método particular, para el estudio de modificaciones oxidativas a nivel de macromoléculas (DNA, proteínas y lípidos).

Por ello es de gran importancia y utilidad desarrollar métodos encaminados a valorar la homeostasis redox y el daño oxidativo a diferentes niveles biológicos (DNA, proteína y lípidos), para ello se suelen seleccionar marcadores de distinta naturaleza que abarcan todo este espectro. Algunos de los más utilizados se proponen a

Introducción

continuación: i) moléculas que contienen azufre, como glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) [79], S-(5-adenosil)-L-metionine clorada (SAM), y S-(adenosil)-L-homocisteína (SAH) [80]; ii) fenilalanina (Phe) [81] y tirosinas (3-iodo-L-tirosina (I-Tyr), 3-nitro-tirosina (N-Tyr), 3-cloro-L-tirosina (Cl-Tyr), DL-*o*-tirosina (*o*-Tyr), DL-*m*-tirosina (*m*-Tyr), L-tirosina (*p*-Tyr)) como marcadores de daño oxidativo a proteínas [77,82]; iii) 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OH-dG) y 2-deoxiguanosina (2-dG), como indicadores de daño a DNA [83]; y iv) malondialdehído (MDA) y 8-isoprostaglandina-F2 α (8-IsoPGF), los cuales son marcadores de peroxidación lipídica [84,85]. Además, podría incluirse un nuevo biomarcador de EO como es el ácido oftálmico (AcOft), el cual indica una disminución del glutatión [86].

Muchos de los marcadores arriba mencionados están presentes a concentraciones muy bajas en las matrices biológicas, por lo que se requieren técnicas de alta sensibilidad para su cuantificación. La espectrometría de masas (MS) y en concreto el triple cuadrupolo (TQ) constituyen una técnica que se ha mostrado como una potente técnica analítica para la determinación simultánea de un gran número de compuestos en baja concentración [87,88].

1.5 Modelos experimentales para el estudio de la EHGNA

El estudio de la EHGNA se ha abordado desde diferentes aproximaciones experimentales con el objetivo de profundizar en las causas que la producen y en los factores o mecanismos que determinan su progresión. Los modelos *in vivo* (ratas, ratones...) tratan de reproducir, en la medida de lo posible, el patrón clínico de la enfermedad. No obstante, las conocidas diferencias interespecie existentes dificultan enormemente la interpretación y extrapolación al hombre de los cambios metabólicos y fisiopatológicos observados en

Introducción

animales de experimentación. Como alternativa y/o complemento a los modelos experimentales *in vivo*, se han desarrollado modelos *in vitro* que presentan la ventaja del control de las condiciones ambientales en las que se lleva a cabo el experimento, la posibilidad de usar material de origen humano, la posibilidad de llevar a cabo experimentos de alto rendimiento, el relativo bajo coste en comparación con los modelos *in vivo*, la reducción en el número de animales de experimentación, etc. Aunque los estudios *in vitro* no reproducen la complejidad de un órgano completo, son un buen complemento para los estudios *in vivo* tradicionales y pueden ser útiles para identificar los mecanismos bioquímico-moleculares de la enfermedad [89].

1.5.1. Modelos experimentales *in vivo*

En la mayoría de pacientes el desarrollo de la EHGNA requiere años y es el resultado de la interacción de varios factores de riesgo como la sobrealimentación y/o un patrón de dieta inapropiado (alto contenido en grasas, elevado consumo de azúcar...) así como un gasto inadecuado de energía debido al estilo de vida sedentario y probablemente a susceptibilidades genéticas [39]. Los modelos animales utilizados en el estudio de la aparición y la progresión de la EHGNA deben tener en cuenta: i) los patrones histológicos y las alteraciones patológicas encontradas en los diferentes estadios de la enfermedad en humanos; y ii) las alteraciones fisiológicas generales asociadas al desarrollo de la enfermedad en humanos (aumento de peso, resistencia a la insulina...). La no existencia de semejanza en la patología del hígado o en las alteraciones fisiológicas de la EHGNA en el modelo experimental hará que sea más difícil trasladar los resultados encontrados a situaciones clínicas, y al desarrollo de estrategias de prevención de la enfermedad. Un modelo animal ideal para la EHGNA debería reproducir no sólo la esteatosis, sino también inflamación, lesión en las células hepáticas

Introducción

(balonización de hepatocitos) y, si se extiende el tiempo suficiente, la progresión a fibrosis. Además el modelo también debería mostrar las anormalidades metabólicas como sobrepeso, resistencia a la insulina, deterioro en la tolerancia a la glucosa, dislipidemia, así como un aumento en los niveles de endotoxinas bacterianas que se encuentran frecuentemente en pacientes con EHGNA [39].

Entre los modelos animales más comunes para el estudio de la EHGNA encontramos los modelos de roedores con alteraciones genéticas, como los ratones *ob/ob* que poseen una mutación en el gen leptina que hace que presenten un fenotipo de obesidad severa [90,91]. Este modelo ha sido ampliamente utilizado y en los últimos años se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de leptina y el desarrollo de la esteatohepatitis [92-94].

Otros modelos se basan en la modificación de la dieta administrada a los animales y no en sus alteraciones genéticas. Estos modelos dietéticos tienen relevancia en el estudio de la EHGNA humana ya que las alteraciones en los hábitos dietéticos y la sobrealimentación asociadas con el sobrepeso y resistencia a la insulina, han sido identificados como factores de riesgo para el desarrollo de la EHGNA [39,95]. Una de las dietas más usadas en estos modelos experimentales con roedores es la dieta deficiente en metionina y colina (MCD) [96-98], así como la dieta en alto contenido en grasas (HFD) [99,100].

Por último cabe señalar que se han propuesto otros modelos experimentales no basados en roedores, tales como *Caenorhabditis elegans* [101,102], zarigüeyas [103,104] o cerdos de Ossabaw [105,106], que aunque se puedan asemejar más en ciertos aspectos a la EHGNA humana que los roedores, resultan más caros (**Figura 1.9**).

Introducción

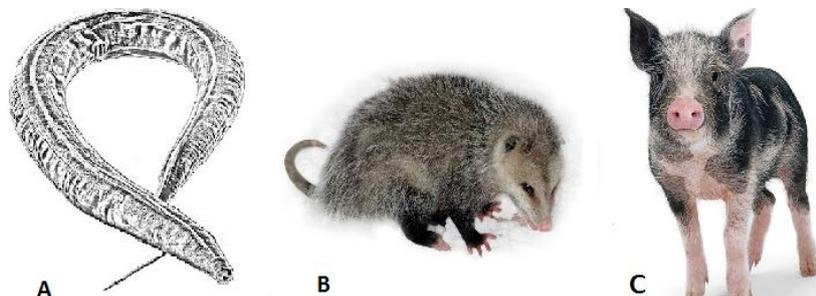


Figura 1.9. Modelos animales no roedores usados para el estudio de la EHGNA: **A)** *Caenorhabditis elegans*; **B)** Zarigüeya; **C)** Cerdo de Ossabaw.

1.5.2. Modelos experimentales *in vitro*

Los mecanismos moleculares y las cascadas de señalización implicadas en la progresión de la EHGNA fueron estudiados en un primer momento a través de modelos animales (modelos genéticos, modelos inducidos por la dieta...) y confirmados *a posteriori* a través de diferentes estudios clínicos [107]. Sin embargo, en los últimos años también se han propuesto modelos *in vitro* para el estudio de la EHGNA. Aunque estos modelos constituyen una aproximación demasiado simplista de la enfermedad, su principal ventaja es que facilitan el estudio de los mecanismos bioquímico-moleculares implicados [89]. A pesar de esto, y a diferencia de otras enfermedades hepáticas para las que los modelos *in vitro* son herramientas de investigación ampliamente utilizados, los resultados obtenidos hasta el momento para el estudio de la EHGNA usando estos modelos son escasos.

Los modelos *in vitro* más usados en la investigación de la EHGNA son los cultivos en monocapa de hepatocitos y las líneas celulares inmortalizadas. En menor medida se han empleado modelos basados co-cultivos o cultivos 3D, debido a la elevada dificultad de su uso [108]. Tanto los hepatocitos humanos primarios [109], las células de Kupffer, las células estrelladas y las células endoteliales sinusoidales parecen ser modelos relevantes [110], sin embargo, las cuestiones éticas y el

Introducción

limitado número de muestras de hígado humano hacen que sea muy difícil el uso de cultivos de células hepáticas humanas. Otra opción son los cultivos primarios de células de roedores, que según el modelo utilizado podrían imitar en mayor o menor medida la situación encontrada en los seres humanos. Sin embargo, los métodos usados en el aislamiento de las células necesitan estar muy bien establecidos para obtener resultados reproducibles y en muchas ocasiones las células pierden funciones específicas del tejido cuando son cultivadas durante un tiempo prolongado. Como alternativa a los cultivos de células primarias están las líneas celulares inmortalizadas, que poseen una alta capacidad de replicación, un fenotipo estable y permiten el uso de las mismas células a lo largo de un proyecto de investigación. Además, el cultivo de líneas celulares inmortalizadas es más simple y fácil de estandarizar [111]. En la **tabla 1.1** se puede ver un resumen de los distintos modelos *in vitro* y distintas líneas celulares disponibles para el estudio de la EHGNA.

Introducción

Tabla 1.1. Resumen de los distintos modelos *in vitro* y líneas celulares disponibles para el estudio de la EHGNA. Tabla adaptada de la referencia [108].

Modelo <i>in vitro</i>	Células	Ventajas	Inconvenientes
Cultivo de células primarias	Hepatocitos de pacientes y/o roedores con EHGNA Células de Kupffer/Células estrelladas/Células iNKT de pacientes humanos y/o roedores	<ul style="list-style-type: none"> - Células con fenotipo diferenciado - Reproducen muchas de las funciones metabólicas hepáticas - Imitan la fisiopatología del hígado <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Dificultad para su aislamiento - Cuestiones éticas - Disponibilidad limitada (células de origen humano) - Reproducibilidad variable de los experimentos - Tiempo de cultivo limitado
Líneas celulares inmortalizadas	RAW 264.7/AML-12/J774A/HepG2/HuH7/H4IIE/H4IIEC3/PAV-1/LX2	<ul style="list-style-type: none"> - Crecimiento ilimitado - Fácil cultivo - Fenotipo estable - Reproducibilidad elevada 	<ul style="list-style-type: none"> - Expresión alterada de muchas enzimas y factores nucleares (según el método de inmortalización) - Dificultad de extrapolación a <i>in vivo</i>
Modelos de co-cultivo	RAW 265.7 y AML-12 Hepatocitos y adipocitos humanos	<ul style="list-style-type: none"> - Imitan la diversidad celular implicada en la esteatosis <i>in vivo</i> - Posibilitan estudios de comunicación e interacción celular 	<ul style="list-style-type: none"> - Dificiles de cultivar - Baja reproducibilidad de los experimentos (dificultad de estandarización)
Cultivos 3D	Línea celular de hepatoma de Rata H35	<ul style="list-style-type: none"> - Imitan la arquitectura del hígado <i>in vivo</i> - Mayor grado de diferenciación y expresión de funciones específicas del hígado 	<ul style="list-style-type: none"> - Dificultades técnicas - Gran variabilidad funcional dependiendo de las condiciones de cultivo

1.5.2.1. Hepatocitos

Entre los modelos *in vitro*, el cultivo de hepatocitos está reconocido como el modelo hepático más cercano a la situación *in vivo* [5,78,85]. Bajo condiciones apropiadas de cultivo, los hepatocitos primarios conservan la mayor parte de las funciones diferenciadas características del hígado (gluconeogénesis, metabolismo de glucógeno, formación de

Introducción

urea, síntesis y secreción de proteínas plasmáticas, metabolismo de lípidos...) lo que convierte a este tipo de cultivo en un modelo *in vitro* interesante para el estudio de enfermedades hepáticas [109,112]. A pesar de algunos de los inconvenientes que supone el uso de hepatocitos, como el limitado número de muestras disponibles de tejido, las cuestiones éticas y la disminución de reproducibilidad debido a la necesidad de preparación continua, se han llevado a cabo diversos estudios relacionados con la esteatosis hepática empleando este modelo celular. Por ejemplo, estudios de esteatosis inducida por fármacos realizados en hepatocitos de rata en cultivo primario mostraron la idoneidad de este modelo para identificar fármacos con un potencial hepatoesteatogénico elevado [113]. En otro estudio se evaluó la capacidad de la tetraciclina para producir esteatosis utilizando hepatocitos primarios de perro [114]. Destacar también el uso de hepatocitos humanos para el estudio de la esteatosis hepática mediante el análisis del metabolismo del colesterol [115].

1.5.2.2. Líneas celulares de hepatoma

Las líneas celulares de hepatoma constituyen una fuente simple, de fácil acceso y casi ilimitada de células originarias de hígado humano [89]. Si bien muestran diferencias con los hepatocitos en muchos aspectos funcionales, especialmente respecto a los niveles de enzimas de metabolización de fármacos, son un modelo *in vitro* usado comúnmente en el estudio de la EHGNA. A pesar de que se han probado muchas líneas celulares hepáticas humanas (HuH7, HepaRG...), la línea celular HepG2 es la que se usa más frecuente y la mejor caracterizada [5,78].

Introducción

Línea celular HepG2

Las células HepG2 derivan de una muestra de tejido hepático de un donante con un carcinoma hepatocelular bien diferenciado [5]. Son células no tumorogénicas, con una alta tasa de proliferación y una morfología de tipo epitelial que poseen muchas de las funciones hepáticas diferenciadas, tales como síntesis y secreción de proteínas plasmáticas, metabolismo de colesterol y triglicéridos, metabolismo y transporte de lipoproteínas, síntesis de sales biliares, síntesis de glucógeno, señalización de la insulina, etc [5,116-118]. Sin embargo su principal inconveniente es la reducida expresión de algunas funciones hepáticas, especialmente las relacionadas con el metabolismo y transporte de fármacos. [5,78]. A pesar de sus limitaciones, las células HepG2 son el modelo celular más usado como alternativa al cultivo primario de hepatocitos. Han sido aplicadas al estudio del efecto de ciertos alcaloides como inhibidores de esteatosis hepática o de la capacidad de determinados ácidos grasos para inducir esteatosis [119,120]. Destacar también su utilización para el desarrollo de ensayos dirigidos al estudio de fármacos que inducen la esteatosis [121-123].

Línea celular HepaRG

Las células HepaRG derivan de un carcinoma hepatocelular humano que, a diferencia de otras líneas de hepatoma (p.e. HepG2) son capaces de diferenciarse bajo determinadas condiciones de cultivo y expresar de forma reproducible un fenotipo muy aproximado al de los hepatocitos humanos, conservando sus funciones específicas durante más de 4 semanas [124]. Tienen un gran potencial en la investigación de la esteatosis hepática ya que acumulan gotas lipídicas (del inglés *lipid droplets*) tras la exposición de diversos ácidos grasos (ácido esteárico, palmítico, oléico, linoléico...) [125,126]. Además, se han llevado a cabo

Introducción

otros estudios donde se ha usado este modelo celular para el estudio de la capacidad esteatogénica de diversos fármacos (acumulación de TG en las vesículas intracitoplasmáticas) y producir esteatosis. Algunos ejemplos que podemos encontrar son los estudios de *Anthérieu et al.* sobre la tetraciclina [124] o amiodarona [125] y sus efectos sobre la acumulación de lípidos en HepaRG. Finalmente, destacar los estudios centrados en el desarrollo de ensayos multiparamétricos para predecir el daño hepático inducido por fármacos usando las HepaRG como modelo celular [127].

1.6 Aspectos generales de la metabolómica

El término metaboloma fue definido inicialmente como el complemento cuantitativo de todas las moléculas de bajo peso molecular presentes en una muestra biológica representativa de un estado fisiológico o de desarrollo concreto [128,129]. Esta definición ha sido actualizada y actualmente se define como la determinación cuantitativa de todos los metabolitos endógenos de bajo peso molecular (aproximadamente < 1000-1500 Da) en una muestra biológica del sistema bajo estudio. Cada tipo de célula/fluido biológico tiene niveles específicos de metabolitos en función de las condiciones ambientales específicas y fluctúan con el tiempo dependiendo de las demandas fisiológicas [130].

Inicialmente se acuñaron dos términos diferentes para definir la ciencia centrada en el estudio del metaboloma: metabolómica [131] y metabonómica [132]. El término metabolómica se definió como "el análisis exhaustivo y cuantitativo de todos los metabolitos presentes en una célula, tejido o muestra biológica específica" y fue originado por analogía semántica con otras disciplinas "ómicas"[131]. Por otro lado, el término metabonómica se definió como "la medición cuantitativa de la respuesta metabólica multiparamétrica relacionada con el tiempo de los

Introducción

sistemas vivos a los estímulos fisiopatológicos o modificaciones genéticas" [132] y se deriva de las raíces griegas 'meta' y 'nomos' que significan *cambios* y *reglas/leyes*, respectivamente, para describir la generación de patrones de reconocimiento basados en modelos con capacidad de clasificar cambios en el metabolismo [133]. La discrepancia inicial entre las dos definiciones era principalmente filosófica. Mientras que la metabolómica pretendía caracterizar y cuantificar todas las pequeñas moléculas presentes en una muestra biológica, la metabonomía se centraba en el intercambio global en el metaboloma como respuesta a un estrés, estímulo o manipulación genética dada [134]. Hoy en día ambos términos se utilizan a menudo indistintamente para definir estudios cuyo objetivo es el análisis no sesgado de metabolitos en el sistema biológico en estudio [134]. Sus principales aplicaciones incluyen estudios de toxicidad, desarrollo de medicamentos farmacéuticos, monitorización en cultivos celulares, diagnóstico de enfermedades, nutrición, oncología y trasplante [135-140].

La metabolómica mide los productos finales de la cascada de las "ómicas", proporcionando así información complementaria que no es accesible a través de otras "ómicas" alternativas, como la genómica, transcriptómica o la proteómica [69,73] (**Figura 1.10**). Los metabolitos son los intermediarios de las reacciones bioquímicas, por lo tanto sus niveles vienen determinados en muchas ocasiones por la capacidad catalítica de las enzimas, siendo estas últimas el resultado de la integración de la transcripción, traducción, modificaciones post-traslacionales y los efectos alostéricos, lo que resulta en un efecto integrador entre las capacidades del sistema en estudio y su interacción con el entorno [141]. Por lo tanto debido a la integración de señales intra y extracelulares y a una naturaleza más dinámica, el metaboloma y los cambios metabolómicos, representan una aproximación más cercana al fenotipo del sistema bajo estudio que genes, transcriptores o proteínas [69, 74, 75]. Mientras que la genómica y la proteómica nos indican lo

Introducción

que *podría haber pasado*, la metabolómica nos indica lo que *realmente ha pasado* y por lo tanto es la ciencia que mejor puede caracterizar los fenotipos de los seres vivos. En la composición del metaboloma intervienen no solamente la expresión de los genes sino también los factores que rodean la vida de un ser como la alimentación, el ejercicio, el estrés, etc. Por lo tanto, la metabolómica es más informativa del estado funcional de las células que otras "ómicas".

Dentro de las aproximaciones clásicas de la cascada de las "ómicas", cada paso más hacia el fenotipo representa un enorme aumento en las cifras de las entidades de interés: desde cerca de 20.000 genes a 100.000 transcripciones y 1.000.000 de proteínas. Sin embargo, el número de metabolitos en los seres humanos se estima alrededor de 40.000 [142], siendo el número de metabolitos principales, aquellos con concentraciones más elevadas y funciones más relevantes, alrededor de 2.000 [143]. Por otra parte, si bien los genes, los transcritores y las proteínas son especie-específicos y, por lo tanto, tienen que ser diseñados diferentes estudios para cada especie, la mayor parte de los metabolitos son comunes a todas las especies, y sólo una parte del metaboloma es específica de una especie determinada [144].

Introducción

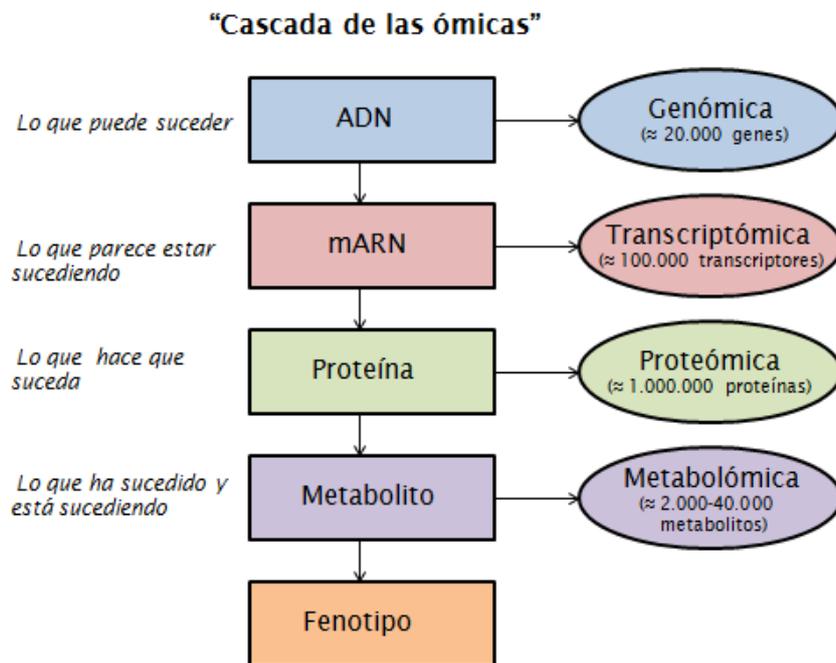


Figura 1.10. Representación de la 'cascada de -ómicas', junto con las cifras de la estimación del número de componentes que pertenecen a cada uno de los niveles. La metabolómica está en la última etapa de la cascada amplificando e integrando las señales de los niveles anteriores de regulación y, por tanto, siendo la aproximación más cercana al fenotipo real.

1.6.1 Estructura básica de un estudio metabolómico

La estructura típica de un estudio metabolómico se describe en la **Figura 1.11**. La primera etapa consiste en establecer una hipótesis del trabajo que se quiere realizar y definir los objetivos principales que se quieren lograr con el estudio, es decir, responder a las cuestiones biológicas que se plantean. Estrechamente relacionado con ello se han de definir las condiciones experimentales para lograr los objetivos propuestos. Esta etapa incluye la selección del modelo experimental (*in vitro* ó *in vivo*), fármacos en estudio (compuestos asociados a un mecanismo de toxicidad conocido), concentraciones adecuadas de

Introducción

tratamiento, plataforma analítica, etc. Además es necesario seleccionar cuidadosamente el tipo de muestra a analizar, ya que por ejemplo en un estudio celular, analizando la monocapa celular/medio de cultivo en realidad estaremos comparando el endometaboloma/exometaboloma. Es importante pues preparar un protocolo de procesamiento de las muestras que sea adecuado. Un requisito es que las muestras sean representativas y aporten información sobre el fenómeno que se quiere estudiar. Además se debe poder llevar a cabo la extracción de los metabolitos evitando su degradación o alteración con el tiempo. Una vez realizada esta etapa, las muestras deben ser analizadas por la plataforma analítica más apropiada que asegure la calidad de los resultados generados. Finalmente, el uso de técnicas analíticas de análisis de datos permitirá una correcta interpretación y validación de los resultados que responderán a las preguntas planteadas en la primera etapa. Las decisiones tomadas en cada una de las etapas del estudio metabolómico son cruciales para obtener unos resultados de gran calidad [137].

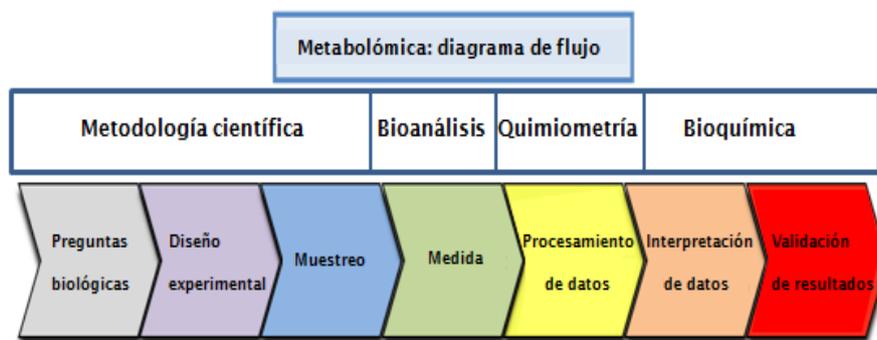


Figura 1.11. Diagrama de flujo del esquema general del estudio metabolómico. Figura adaptada de la referencia [137].

Introducción

1.6.2 Técnicas para el estudio del metaboloma

El metaboloma presenta una gran diversidad de componentes (aminoácidos, carbohidratos, lípidos, ácidos orgánicos...) con una estructura química y propiedades muy diferentes (desde muy polares hasta altamente hidrofóbicos...). Por ello es imposible determinar el metaboloma completo usando una plataforma analítica única, por lo que se requiere el uso de combinaciones de técnicas complementarias (tanto para la preparación como para el análisis de muestras) para obtener una cobertura más amplia del metaboloma [141].

Las técnicas más usadas en los estudios metabolómicos son la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y la MS acoplada a técnicas de separación como la cromatografía [145]. Ambas técnicas, RMN y MS, en sus diferentes configuraciones, son complementarias.

La espectroscopía ¹H-RMN se basa en la detección de todas las señales de protón presentes en una muestra dada. Sus principales ventajas son: i) es una técnica que no destruye la muestra, por lo que puede ser usada en análisis sucesivos; ii) requiere de una nula o baja preparación de muestra; iii) se puede usar con muestras sólidas; iv) es una técnica cuantitativa; v) es posible llevar a cabo análisis estructural; y vi) tiene una gran robustez lo que permite una fácil comparación de resultados entre diversos laboratorios. Sin embargo, tiene como inconvenientes su baja resolución y sensibilidad, la dificultad para interpretar los espectros obtenidos y la presencia de analitos que pueden ser deficientes en protones o poseer protones que pueden ser intercambiados fácilmente con el disolvente [73,78].

En la MS los analitos presentes en la muestra son ionizados y caracterizados por su relación masa/carga (m/z). La detección de analitos suele estar precedida por una técnica separativa para conseguir separar lo mejor posible los componentes individuales presentes en una matriz biológica compleja. Las técnicas de separación más comunes

Introducción

acopladas a MS son cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida (LC) y electroforesis capilar (CE). La GC se usa para separar metabolitos volátiles (y no volátiles, después de un proceso de derivatización). La CE separa compuestos polares ionizables basados en su relación m/z . La LC es la técnica de separación más popular usada en metabolómica y permite la separación de metabolitos en función de su afinidad por la fase estacionaria de la columna cromatográfica seleccionada.

Las principales ventajas de la MS acoplada a una técnica de separación son: i) la alta sensibilidad, con órdenes de magnitud por debajo de la RMN; ii) la alta resolución y selectividad; iii) la posibilidad de llevar a cabo análisis de fragmentación para confirmar la identidad de los metabolitos detectado, así como la identificación de compuestos desconocidos; y iv) la información obtenida es más fácil de manejar que en el caso de la espectroscopía RMN [69,73,78] (**Tabla 1.2**).

1.6.3 Aproximaciones metabolómicas dirigidas y no dirigidas

En la actualidad se usan dos aproximaciones para las investigaciones metabolómicas: i) el análisis no dirigido o *untargeted*; y ii) el análisis dirigido o *targeted*. Aunque el análisis dirigido no puede considerarse como una verdadera "ómica", porque básicamente consiste en un análisis sesgado que está dirigido por un conocimiento previo del sistema bajo estudio, este análisis puede considerarse como una parte importante del análisis metabolómico no dirigido. Un estudio metabolómico al uso utiliza ambas plataformas. En primer lugar se lleva a cabo el análisis no dirigido, que mediante un análisis de datos multivariante, proporciona una serie de metabolitos candidatos. A continuación, estos metabolitos son indentificados y considerados como biomarcadores potenciales. Posteriormente, una vez se han descubierto los biomarcadores más potenciales mediante el análisis metabolómico

Introducción

no dirigido, estos son validados y confirmados mediante un análisis cuantitativo dirigido (**Figura 1.12**).

Tabla 1.2. Ventajas y desventajas de la espectrometría de masas (MS) y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).

Plataforma	Ventajas	Desventajas
RMN	<ul style="list-style-type: none"> -Cuantitativa -No destruye la muestra -Alto rendimiento -Requiere mínima preparación de la muestra -Robusto (alta reproducibilidad) -Compatible con líquidos y sólidos 	<ul style="list-style-type: none"> -Baja sensibilidad (rango μM) -Baja resolución -Procesado de datos complicado -Requiere gran cantidad/volumen de muestra -Limitado a compuestos protonados
MS	<ul style="list-style-type: none"> -Alta versatilidad, potencial para cubrir gran parte del metaboloma -Se puede acoplar a técnicas previas de separación (GC, LC...) -Alta sensibilidad (en especial en el caso LC-MS, rango nM-pM) -Alta resolución y selectividad -Posibilidad de análisis metabólico dirigido y no dirigido -Normalmente requiere poca cantidad/volumen de muestra 	<ul style="list-style-type: none"> -Destruye la muestra -Limitada reproducibilidad -Normalmente requiere preparación de muestra extensa -Largos tiempos de análisis si va precedida de alguna técnica de separación -Cuantificación dependiente de curvas de calibrado, patrones internos y compuestos de referencia

Introducción

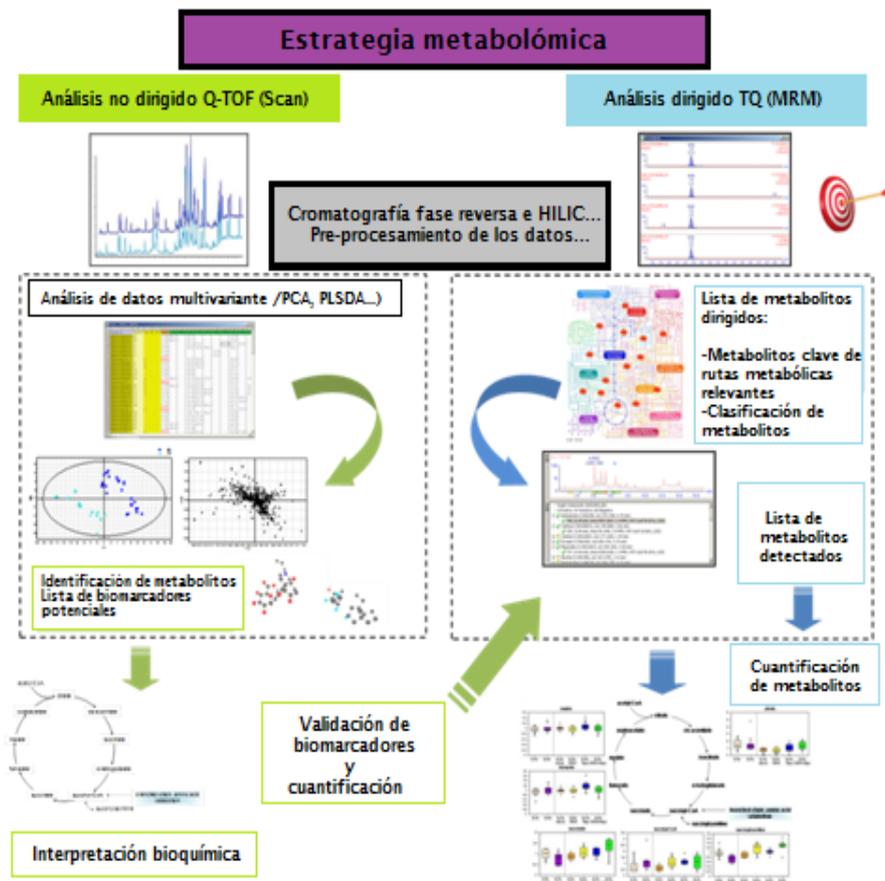


Figura 1.12. Esquema de la estrategia propuesta para el perfilado metabólico global. Se basa en la combinación de dos análisis metabolómicos, no dirigido y dirigido, teniendo como punto de partida el diagrama de flujo descrito en la Figura 1.11. El análisis no dirigido proporciona biomarcadores candidatos que pueden ser validados mediante el análisis cuantitativo dirigido. Figura adaptada de la referencia [137].

Análisis metabolómico no dirigido

El objetivo del análisis metabolómico no dirigido es detectar el mayor número posible de metabolitos en una muestra biológica concreta. Se centra en el análisis global del metaboloma con el fin de asociar patrones específicos de metabolitos a una condición o tratamiento dado [137,141]. Como se ha mencionado anteriormente, debido a la variedad

Introducción

de compuestos que se pueden encontrar en el metaboloma, resulta imposible el análisis simultáneo de todos los metabolitos existentes en una muestra mediante una única técnica analítica. Es por ello que siempre que sea posible se aconseja el uso de distintas aproximaciones analíticas para aumentar la cobertura metabolómica. Por ejemplo, en la LC-MS se puede mejorar la cobertura mediante la combinación de diferentes estrategias de separación que cubran un amplio rango de compuestos de diferente relación m/z [137].

Las separaciones tradicionales de LC se han llevado a cabo usando cromatografía de fase reversa (RP) [146-148]. Las columnas de RP, normalmente con relleno de sílice con enlaces-C18, son capaces de retener y separar los metabolitos de baja y media polaridad y son una buena opción como punto de partida en los estudios metabolómicos. Sin embargo, los compuestos de elevada polaridad son mínimamente retenidos por este tipo de columnas. Es por ello que los recientes avances en tecnología de columnas, por ejemplo en la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) [149], permiten la detección de analitos polares/iónicos que eran retenidos de manera insuficiente, o incluso no retenidos, mediante el uso de las columnas RP [150-152].

Las fases estacionarias usadas en cromatografía HILIC incluyen grupos amina, amida o silanoles libres. La retención del metabolito es una combinación de una partición líquido-líquido, adsorción, interacciones iónicas y retenciones hidrofóbicas, que depende en gran medida de la naturaleza del analito y de la composición de la fase móvil [150]. El uso de cromatografía HILIC acoplada a MS puede ofrecer una mayor sensibilidad que las fases convencionales RP porque aumenta la eficiencia de ionización como resultado del uso de una fase móvil que contiene una alta proporción de disolventes orgánicos. Otra técnica de separación complementaria a la LC es la GC. Este tipo de cromatografía proporciona una alta resolución y sensibilidad debido al uso de columnas capilares mucho más largas (varios metros). Se usa para

Introducción

muestras complejas donde existen analitos de bajo peso atómico, térmicamente estables y cuya volatilidad es media/alta, pudiendo incluso realizar una etapa previa de derivatización para favorecer el análisis de los compuestos poco volátiles [153,154]. La combinación de ambas técnicas de separación, LC y GC, puede ofrecer por tanto una mejora en la cobertura metabolómica.

Con respecto a la detección por MS, el análisis metabolómico no dirigido requiere de instrumentos que dispongan de modos de barridos completos '*full scan*' y medidas de masa exacta. El espectrómetro de masas de cuadrupolo de tiempo de vuelo (QTOF) cumple con estos requerimientos y combina la estabilidad de un cuadrupolo con la alta eficiencia, sensibilidad y precisión (< 5ppm) de un TOF. Además ofrece fragmentación de masas para la identificación de metabolitos desconocidos. Debido a estas capacidades, el espectrómetro QTOF se ha convertido en el instrumento preferido para las aproximaciones de análisis metabólico no dirigido, aunque otros instrumentos como el Orbitrap o el Ciclotrón de Resonancia Iónica por Transformada de Fourier también ofrecen posibilidades de alta resolución [137].

Análisis metabolómico dirigido

El objetivo del análisis metabolómico dirigido es la determinación cuantitativa de un grupo o clase de metabolitos seleccionados previamente. Los recientes avances en los instrumentos de MS mediante el desarrollo de la cromatografía líquida de alta resolución (UPLC) han permitido la cuantificación simultánea de decenas o incluso cientos de metabolitos separados previamente mediante una técnica cromatográfica [137,141]. La utilidad de este tipo de análisis reside en mapear metabolitos que tengan algún interés en concreto, en lugar del metaboloma completo. Esta aproximación es especialmente útil cuando la investigación recae sobre una ruta metabólica concreta o una clase de

Introducción

compuestos en particular o para validar biomarcadores descubiertos previamente mediante la aproximación no dirigida (**Figura 1.11**).

El análisis metabolómico dirigido requiere pues de una identificación sin ambigüedades y de una cuantificación de los metabolitos de interés. Con respecto a la LC, la separación cromatográfica es optimizada de acuerdo a las propiedades químicas del grupo de metabolitos de interés. Los espectrómetros de TQ trabajando mayoritariamente en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) son los equipos más comunes para llevar a cabo este tipo de aproximaciones. Los espectrómetros TQ tienen una menor resolución de masa que los QTOF, sin embargo tienen mejor sensibilidad, especificidad, robustez y un rango dinámico más amplio. En los TQ operando en MRM, el primer cuadrupolo selecciona el ión padre que es fragmentado en el segundo cuadrupolo (celda de colisión) para dar unos fragmentos específicos (iones hijos) que son seleccionados en el tercer cuadrupolo antes de llegar al detector. Es por ello que en el análisis dirigido mediante UPLC-TQ la alta selectividad, que favorece una alta sensibilidad, es proporcionada por un triple filtro: 1) el tiempo de retención (RT) en el UPLC; 2) fórmula molecular/masa, determinada por el primer cuadrupolo; y 3) estructura, determinada por el proceso de fragmentación y la selección de los iones hijos en el tercer cuadrupolo [137,155].

1.6.4 Análisis de datos en metabolómica

El análisis no dirigido mediante las plataformas LC-MS y GC-MS genera una increíble cantidad de datos que se ordenan en forma de matriz de datos en que cada valor (*feature*) está compuesto por una triada (tiempo de retención (RT), m/z e intensidad de la señal). La finalidad del análisis de los datos en metabolómica es transformar esta gran cantidad de datos crudos, proporcionados por la plataforma analítica, en datos que puedan ser usados de forma más sencilla y que proporcionen una información útil a nivel biológico [137,156]. Después de varias etapas de

Introducción

pre-procesamiento de los datos, se obtiene una matriz bidimensional, normalmente RT-m/z vs intensidad de señal. En estas etapas de pre-procesamiento lo normal es que los datos de todas las muestras hayan sido alineados (para evitar un posible procesado de señal inadecuado), normalizados, centrados a la media y escalados a varianza unitaria. Una vez realizado este proceso, quedan listos para que se puedan aplicar técnicas de análisis univariante y multivariante de los datos (MVDA) [137].

Los métodos univariantes analizan una sola variable e incluyen tests para comparar diferentes conjuntos de muestras, como por ejemplo el *test t* (o su análogo no paramétrico *test de Mann-Whitney*) para dos grupos de datos problema, o ANOVA (análisis de la varianza) para más de dos clases de datos problema. Los métodos multivariantes analizan todas las variables disponibles al mismo tiempo con el objetivo de dilucidar la relación existente entre ellas [156]. El esquema de trabajo típico para MVDA incluye dos aproximaciones estadísticas que constan tanto de métodos no supervisados como de métodos supervisados.

Análisis de datos multivariante no supervisado

Los métodos multivariantes no supervisados son aquellos en los que el algoritmo de trabajo no tiene conocimiento previo sobre el tipo de muestras de estudio (por ejemplo la clase o la categoría a la que pertenece cada muestra). Son usados normalmente para visualizar la relación natural entre las diferentes muestras pudiendo revelar grupos, tendencias o muestras anómalas que tengan un comportamiento diferente del resto (*outliers*) [157]. Dos de las herramientas más comunes para el análisis de datos multivariante no supervisado en metabolómica son el análisis de conglomerados jerárquico (HCA) o *Heatmap* y el análisis de componentes principales (PCA).

Introducción

En el HCA, los datos multidimensionales son reducidos a una matriz de correlación/distancia. Por tanto, las muestras son agrupadas conjuntamente en un simple dendograma donde las distancias entre las muestras reflejan las similitudes y diferencias entre sus patrones metabólicos [158] (**Figura 1.13**). En el desarrollo de los modelos HCA se pueden usar diferentes medidas de distancia (Euclidia, Pearson, Spearman...) y diferentes algoritmos de agrupación (unión media, unión simple, unión completa, unión centroide...) [159].

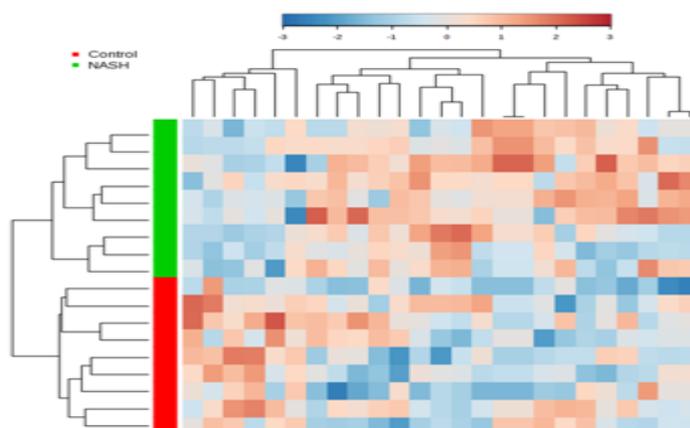


Figura 1.13. Ejemplo de modelo HCA obtenido para un conjunto de muestras pertenecientes a dos clases distintas (control y NASH).

El PCA es un modelo estadístico que reduce un gran número de variables (normalmente correlacionadas) en un pequeño número de variables sin correlacionar (ortogonales entre sí), que reciben el nombre de componentes principales (CP) [145,157]. En general dispondremos de un número de muestras no muy elevado, y en cada una de ellas medimos cientos de variables, de tal manera que para poder representar tendencias necesitaremos aproximaciones capaces de reducir su multidimensionalidad. El PCA genera unas nuevas variables (CP o variables latentes) que resumen las direcciones de máxima varianza de los datos. En general, con 3 o 4 dimensiones seremos capaces de captar

Introducción

casi toda la varianza de las muestras. Esta transformación se define de tal manera que el primer CP define el valor más alto posible de varianza, es decir, explica al máximo la variabilidad de los datos y cada CP siguiente (segundo, tercero...) a su vez posee el máximo de varianza posible siendo ortogonal (no correlacionado) con los CP anteriores.

Los resultados de un PCA normalmente se resumen con dos términos: puntuaciones (*scores*), que indican la relación entre muestras, y pesos (*loadings*), que indican las relaciones entre variables. Los diagramas de *scores* de un análisis PCA permiten observar cómo se agrupan las muestras en función de la similitud o diferencia de su espectro y por ende de su metaboloma. Los puntos de las muestras que están más agrupados tienen una mayor similitud en sus patrones metabolómicos, y por lo tanto una composición bioquímica más similar [145,157]. Los diagramas de *loadings*, indican cuales son las variables responsables de tal separación (**Figura 1.14**).

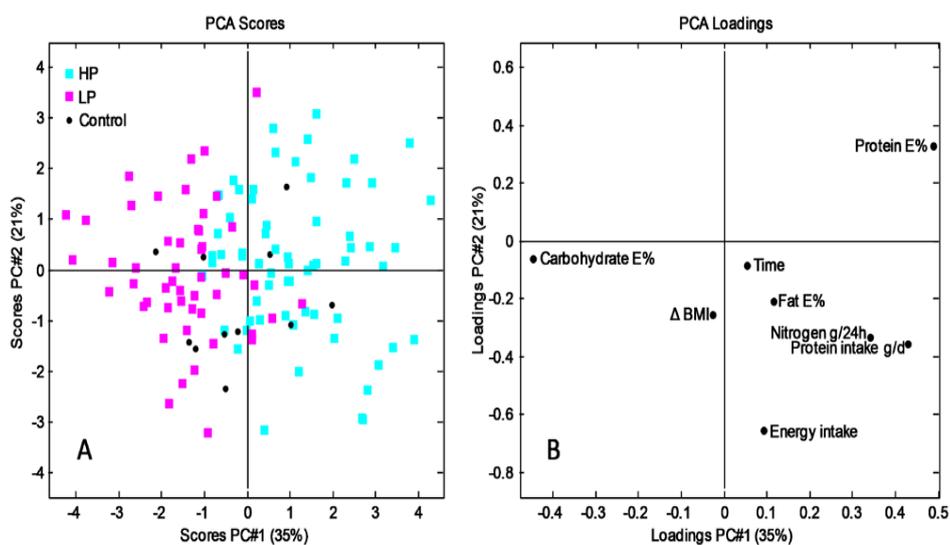


Figura 1.14. Ejemplo de diagrama de puntuaciones y pesos obtenido al realizar un PCA a un conjunto de muestras pertenecientes a tres clases distintas (control, HP y LP).

Introducción

Análisis de datos multivariante supervisado

Si el objetivo del análisis de los datos es la clasificación o regresión se tienen que crear modelos predictivos que estén supervisados. En metabolómica se han usado multitud de herramientas con este propósito: modelo de *random forest*, redes neuronales artificiales, análisis discriminante, modelado suave independiente por analogía de clases (SIMCA, *soft independent modeling of class analogy*)...; sin embargo, el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA, *partial least squares-discriminant analysis*) y el análisis discriminante por proyección ortogonal en las estructuras latentes (OPLS-DA, *orthogonal projection to latent structures-discriminant analysis*) son las más comunes [157,160,161]. El PLS-DA es un modelo basado en PLS donde la variable dependiente (bloque Y) representa la pertenencia a una clase [162,163]. El OPLS-DA es una variante del método PLS donde la variación en X (en metabolómica corresponde a la intensidad de las características detectadas) se divide en dos partes, una que está relacionada linealmente con Y, y otra que no está relacionada (es ortogonal) a Y [157,164]. El PLS-DA y OPLS-DA son métodos basados en proyecciones, como el PCA, sin embargo se prefieren porque la reducción de dimensiones que ofrece PLS está guiada de forma explícita por la variabilidad ofrecida entre grupos, mientras que el PCA sólo es capaz de identificar las direcciones de variabilidad brutas y no está diseñado para distinguir entre variabilidad inter e intra grupos [69,95,97] (Figura 1.15).

Introducción

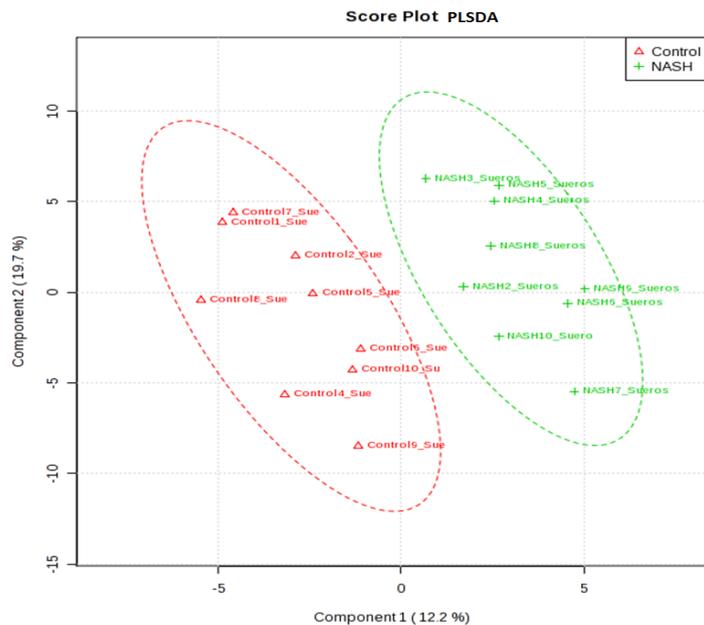


Figura 1.15. Ejemplo de diagrama de puntuaciones obtenido al realizar un PLS-DA a un conjunto de muestras pertenecientes a dos clases distintas (control y NASH).

Un problema común en el PLS-DA es la predisposición de los datos a estar sobreajustados (*overfitting*). Esto ocurre cuando el algoritmo parece encontrar una buena separación pero lo hace mediante el uso de ruido aleatorio en lugar de señales reales [156,165]. Este problema se resuelve mediante el uso de la doble validación cruzada (2CV) [166] en combinación con pruebas de permutación [167,168].

En 2CV los datos son subdivididos en dos grupos diferentes de muestras (el tamaño depende de los tiempos en los que se realiza la validación), uno es usado para el desarrollo del modelo y el otro se reserva para su validación. Dentro del primer subgrupo se realiza una nueva subdivisión en dos subconjuntos diferentes (el procedimiento habitual en esta etapa es desarrollar el modelo con todas las muestras excepto una, que es usada para la validación del mismo) con el objetivo de optimizar los parámetros del modelo, tales como el número de

Introducción

variables latentes (LVs) empleadas para desarrollar el modelo [166]. Las muestras incluidas en cada uno de los grupos son intercambiadas hasta que todas las muestras han sido incluidas en cada uno de ellos. El modelo desarrollado es pues una media de todos los generados durante el proceso de validación cruzada (CV).

Un test de permutación consiste en asignar aleatoriamente las etiquetas de las distintas clases y llevar a cabo un PLS-DA con el nuevo conjunto de datos re-etiquetado. El proceso se repite cientos o miles de veces y los resultados se representan en un histograma para su evaluación visual. Del resultado del histograma es posible determinar si la asignación de clases original es significativamente diferente de la asignación de clases realizada durante la permutación [167] (**Figura 1.16**).

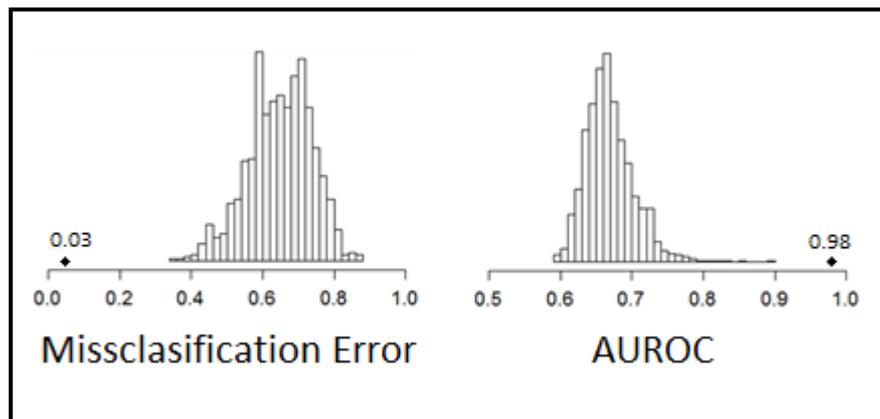


Figura 1.16. Ejemplo de test de permutación.

Introducción

1.6.5 Estado de la metabolómica en el estudio de la esteatosis

Recientemente, la metabolómica ha surgido como una estrategia prometedora para realizar investigaciones en diversas áreas relacionadas con la salud humana como por ejemplo la farmacología, toxicología u oncología. Los metabolitos son productos finales de la función de genes y proteínas, por lo que los perfiles metabolómicos son como "huellas dactilares" que reflejan el estado fisiológico en el que se encuentra un sistema biológico, ya sea célula, tejido u organismo [132].

Estudios recientes han destacado la utilidad de la metabolómica para el estudio de la hepatotoxicidad y sus efectos, analizando fluidos biológicos como orina o suero usando roedores como modelos *in vivo* [86,138,169-172]. Sin embargo, su aplicación al estudio de enfermedades hepáticas de origen metabólico es más limitada [173-176]. En concreto, los estudios metabolómicos dirigidos al estudio de la esteatosis hepática humana se han abordado fundamentalmente desde una perspectiva diagnóstica, prestando poca atención a los perfiles metabolómicos relacionados con el desarrollo de la enfermedad [177-180]. Algunos estudios han utilizado la metabolómica para el análisis de biomarcadores de EHGNA en diferentes especies y matrices, tales como plasma/suero [181-185] o tejido hepático [177,186,187] de ratón o de rata. A pesar de que en pacientes se han realizado estudios metabolómicos para dilucidar parte del perfil metabólico de la enfermedad en tejido hepático humano [188-190], suero [182], plasma [178], incluso estudios lipidómicos en tejido hepático y plasma humano en busca de metabolitos discriminantes entre diferentes estadios de la EHGNA [191]; el uso potencial de la metabolómica a la hora de ayudar a entender el desarrollo de enfermedades hepáticas, como la esteatosis y su posterior evolución a patologías más severas, no ha sido suficientemente explorado.

Los estudios metabolómicos sobre células en cultivo se han aplicado a diferentes tipos de células incluyendo fibroblastos humanos [192,193],

Introducción

células madre humanas pluripotentes inducidas [194], células CHO (del inglés Chinese Hamster Ovary) [195,196], hepatocitos humanos [197], células tumorales [198,199], células INS-1 [200,201], células HepaRG [202] y células HepG2 [202]. Si bien su desarrollo es relativamente reciente, se trata de campo de investigación muy activo en el que muchos grupos han puesto sus esfuerzos para optimizar las condiciones de procesamiento de muestras más adecuadas en función del tipo de células y las aplicaciones metabólicas [137,203,204]. Sin embargo, hasta el momento, no se ha descrito la aplicación de estrategias metabólicas sobre células de cultivo para el estudio de la esteatosis hepática.

1.7. Hipótesis del trabajo y objetivos

Basados en evidencias previas pensamos que la metabolómica puede ser una aproximación experimental de gran utilidad para estudiar los diferentes estadios de la EHGNA, con el objetivo de dilucidar las alteraciones metabólicas, bioquímicas y de la homeostasis celular que son claves en el desarrollo de la esteatosis, así como su potencial progresión a patologías más severas. Para ello proponemos la aplicación de estrategias metabólicas que permitan identificar perfiles metabólicos específicos de la EHGNA inducida por diferentes mecanismos y en base a ello proponer nuevos biomarcadores. En particular pondremos especial interés en aquellos cambios que puedan estar relacionados con la progresión de la enfermedad hacia estadios más avanzados de la enfermedad. En definitiva, pretendemos ahondar en el conocimiento de las bases moleculares asociadas a la EHGNA y, en última instancia, desarrollar estrategias para su diagnóstico y seguimiento basadas en los perfiles metabólicos sanguíneos y que puedan ser aplicadas en la rutina clínica.

Introducción

En base a esto, proponemos los siguientes objetivos:

1. Desarrollo de estrategias para el análisis del metaboloma de distintos tipos de muestras, tanto por LC-MS como por GC-MS, incluyendo la puesta a punto del procesamiento de muestras y análisis, el procesamiento de los datos generados y la validación de los biomarcadores propuestos.
2. Identificación de biomarcadores y patrones metabólicos asociados a esteatosis inducida con fármacos, usando modelos celulares de hepatocitos, HepG2 y HepaRG.
3. Exploración de biomarcadores de esteatosis en modelos *in vivo* de rata.
4. Identificación de perfiles metabolómicos de la enfermedad del hígado graso no alcohólico y de los cambios relacionados con su evolución en muestras de humanos. Búsqueda de nuevos biomarcadores que ayuden al diagnóstico y seguimiento de los distintos estadios de la EHGNA.
5. Desarrollo y validación de métodos para el análisis dirigido de biomarcadores relacionados con alteraciones metabólicas de la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

2. Metodología

Metodología

2.1 Procedimiento general, equipamiento y reactivos

Todos los disolventes para LC y GC, tales como agua, metanol, acetonitrilo, piridina e isopropanol, fueron grado LC/GC-MS y adquiridos en Fisher Scientific (Loughborough, U.K.). Todos los aditivos, tales como ácido fórmico o acetato amónico, los reactivos derivatizantes, tales como N-etilmaleimida (NEM), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), metoxiamina, N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) y trimetilclorosilano (TMCS), y los compuestos patrón fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España).

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo usando un método adaptado de Lowry para placa de 96 pocillos ([205,206]).

Las homogeneizaciones de tejido se llevaron a cabo usando un sistema Precellys 24 dual equipado con un refrigerador Cryolys (Precellys, Saint Quentin en Yvelines, France) para mantener las muestras a una temperatura controlada durante el proceso de homogeneización (**Figura 2.1.A**).

La evaporación de las muestras se llevó a cabo usando un concentrador SpeedVac equipado con una trampa de vapor refrigerada (Thermo Fisher Scientific, Watham, EEUU) (**Figura 2.1.B**).

La incubación de las muestras en caliente se llevó a cabo usando un Thermomixer de la casa Eppendorf (Hamburgo, Alemania) (**Figura 2.1.C**).



Figura 2.1. A) Precellys 24 Dual equipado con un refrigerador Cryolys. B) Savant SpeedVac conectado a una bomba de vacío y a una trampa de vapor refrigerada. C) Thermomixer

Metodología

2.2 Instrumentación basada en MS usada en el análisis metabolómico

Todos los análisis metabolómicos se llevaron a cabo usando plataformas analíticas LC-MS o GC-MS, dependiendo de la naturaleza de los analitos que se quisieran determinar en cada ensayo.

Las separaciones LC se llevaron a cabo usando un sistema cromatográfico Waters Acquity UPLC (Waters, UK), el cual se acopló a dos espectrómetros de masas diferentes: un espectrómetro de masas Waters Synapt HDMS QToF (Waters, Reino Unido) para análisis metabolómico no dirigido, y un espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S (Waters, Reino Unido) para análisis metabolómico dirigido (**Figura 2.2**).

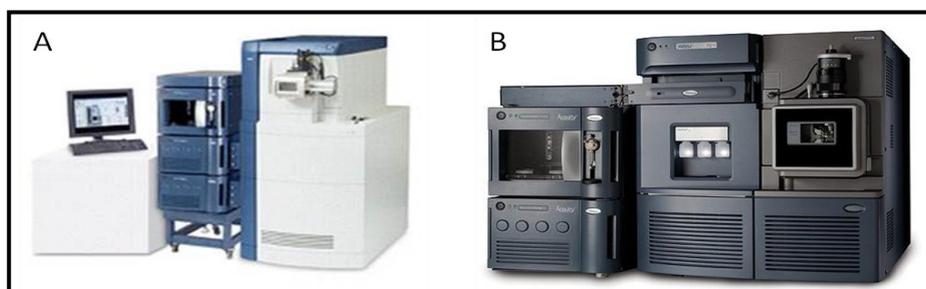


Figura 2.2. Plataforma metabolómica LC-MS usada. **A)** Equipo usado para estudios metabolómicos no dirigidos: Sistema UPLC Waters Acquity acoplado a un espectrómetro de masas Waters Synapt HDMS QToF. **B)** Equipo usado para estudios metabolómicos dirigidos: Sistema UPLC Waters Acquity acoplado a un espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S.

Las separaciones GC se realizaron con un sistema cromatográfico GC Agilent 7890A (Agilent, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas QToF/MS Agilent 7200 (Agilent, EEUU) tanto para análisis metabolómico no dirigido como dirigido (**Figura 2.3**).

Metodología



Figura 2.3. Plataforma metabolómica GC-MS usada. Equipo para estudios metabolómicos no dirigidos: Sistema cromatográfico GC Agilent 7890 acoplado a un espectrómetro de masas QToF/MS Agilent 7200.

2.2.1 Sistema Waters Acquity UPLC

UPLC es una variante de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que utiliza columnas con un tamaño de partícula inferior a $2\ \mu\text{m}$ (1.7 a $1.8\ \mu\text{m}$ normalmente), que ofrece mejores separaciones significativas que las columnas tradicionales (3 - 5 micras) y permite un análisis mucho más rápido. Esta técnica permite la combinación de columnas con partículas pequeñas y el uso de caudales más altos, obteniendo así una mayor velocidad de separación y una resolución y sensibilidad superior [207]. Esto se logra gracias a la alta presión (hasta $15.000\ \text{psi}$) que se alcanza utilizando de forma combinada los sistemas UPLC y las columnas de tamaño de partícula inferiores a $2\ \mu\text{m}$.

El sistema Waters Acquity UPLC empleado para el análisis está equipado con un módulo de disolvente binario que permite llevar a cabo eluciones de gradiente con un máximo de dos eluyentes, un módulo de automuestreador refrigerado que permite mantener las muestras a temperaturas bajas para minimizar la degradación de la muestra mientras se espera a su análisis y un módulo de columna termostatazado que permite realizar las separaciones a una temperatura controlada.

Metodología

El sistema requiere dos disolventes de elución para lograr una separación cromatográfica adecuada de los componentes presentes en la muestra I y que se seleccionan teniendo en cuenta la química de la columna cromatográfica empleada. Además, se utilizan dos disolventes de lavado que permiten la limpieza del sistema de inyección entre los ciclos de inyección: el disolvente débil de lavado de la aguja (weak needle wash, WNW) y el disolvente fuerte de lavado de la aguja (strong needle wash, SNW). El disolvente WNW ha de ser lo más parecido posible a las condiciones iniciales de la separación cromatográfica. El SNW tiene como función limpiar la jeringa con el fin de evitar la contaminación entre muestras.

La información sobre la temperatura de la columna, el caudal, la elución, la composición de los disolventes de lavado y el gradiente se detalla en cada uno de los métodos analíticos utilizados.

2.2.2 Espectrómetro de masas Waters Synapt HDMS QToF

Los estudios metabolómicos no dirigidos que usaban la cromatografía líquida como técnica de separación, se llevaron a cabo usando un espectrómetro de masas Waters Synapt HDMS QToF. Este instrumento permite el análisis en un amplio rango de masas (50-1200 Da) con una alta resolución (> 5000 anchura de pico total a media altura “*full width at half maximum (FWHM)*” (ver **Fórmula 2.1**) así como una alta precisión de masa (< 5 ppm) (ver **Fórmula 2.2**).

$$\text{Resolución de masa (FWHM)} = \frac{\text{Masa medida del ión}}{\text{Anchura del pico a media altura}}$$

Fórmula 2.1. Expresión para calcular la resolución de masa usando la aproximación de anchura de pico total a media altura (FWHM).

Metodología

$$\text{Error de masa (ppm)} = 10^6 \times \frac{(\text{Masa medida del ión} - \text{Masa exacta del ión})}{\text{Masa exacta del ión}}$$

Fórmula 2.2. Expresión empleada para calcular el error de masa en partes por millón (ppm).

Este espectrómetro de masas está equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y es capaz de funcionar en dos modos de ionización, positivo y negativo. Por otra parte, la adquisición de masas se puede hacer tanto en modo MS como en MS/MS simultáneamente, permitiendo de este modo llevar a cabo la fragmentación de iones para confirmar las identidades de los biomarcadores putativos. El software usado para la gestión de datos fue Masslynx v4.1 (Waters, Reino Unido).

Para asegurar que las medidas de las masas son correctas, el software requiere de una calibración del eje de masas para que los valores de m/z de los picos de la muestra puedan ser determinados con precisión. Es por ello que se realizan dos procedimientos distintos de calibración, uno antes y otro durante el análisis de la muestra, es decir, una calibración fuera de línea (off line) y otra calibración en línea (on line). El objetivo de la calibración off line es fijar la relación entre la m/z y el tiempo de vuelo de los iones en el interior del tubo TOF, mientras que la calibración on line realiza una corrección a tiempo real de este ajuste. La calibración off line se realiza utilizando un conjunto de picos de referencia conocidos (es decir, a través de la infusión de una solución que contiene 10% de ácido fórmico/NaOH 0,1 M/acetronitrilo (1:1:8)) para que el software determine las diferencias entre la masa real de los picos de referencia y la medición observada de ellos a lo largo del eje de masas. Puede entonces generarse una curva de calibración para la determinación precisa de masas incluidas en el rango de masas de calibración. Por otra parte, la calibración on line se basa en la medición de una masa de

Metodología

referencia individual (leucina encefalina, m/z 556.2771 o 554.2615, en ESI positivo (+) y ESI negativo (-), respectivamente, preparado a 50 pg / mL en acetonitrilo / agua (1: 1) más 0,1% de ácido fórmico) que se adquiere durante la adquisición de la muestra gracias a una fuente de iones de electrospray dual que permite la introducción de compuestos de analito y de referencia directamente en la fuente de iones. La masa de referencia (también llamada masa de bloqueo) realiza una corrección en tiempo real de la curva de calibración que permite lograr una alta precisión en la determinación de la masa (<5 ppm).

2.2.3 Espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S

El análisis metabolómico dirigido se realizó utilizando un espectrómetro de masas tipo triple cuadrupolo (TQ), Waters Xevo TQ-S, equipado con una sonda ESI que permite la adquisición simultánea en los modos de ionización positivo y negativo. El software usado para la gestión de datos fue Masslynx v4.1 (Waters, Reino Unido). Los espectrómetros de masas TQ están diseñados para el análisis específico, ya que permiten el análisis sensible, selectivo y cuantitativo de un grupo conocido de metabolitos. El modo de funcionamiento más común de un espectrómetro de masas TQ es MRM. Cuando un TQ opera en el modo MRM, el primer cuadrupolo selecciona un ión padre que es fragmentado en la celda de colisión para dar fragmentos específicos (iones hijo) que se seleccionan en el segundo cuadrupolo antes de llegar al detector. El software QuanOptimizer (Waters, Reino Unido) fue empleado para optimizar transiciones (selección de iones padre e hijo), voltajes de cono y energías de colisión para cada uno de los metabolitos específicos.

Metodología

2.2.4 Sistema Agilent GC 7890A

El sistema Agilent GC 7890A empleado está equipado con un sistema de gestión de gases (Helio y Nitrógeno), un sistema de gestión de muestras (automuestreador) y un horno para columnas de alta temperatura. Para asegurar el correcto funcionamiento de la jeringa de inyección y evitar obturaciones, así como evitar posibles contaminaciones de las muestras analizadas, es necesario incorporar dos viales de limpieza que permitan la eliminación de residuos entre muestra y muestra.

La información sobre el gradiente del horno, el caudal del gas portador, el modo de inyección (split o splitless), etc, debe ser detallada para cada uno de los métodos analíticos utilizados.

2.2.5 Espectrómetro de masas Agilent QToF/MS 7200

Los estudios metabolómicos no dirigidos que usaban la cromatografía de gases como técnica de separación, se llevaron a cabo usando un espectrómetro de masas Agilent QToF/MS 7200. Este instrumento permite el análisis en un amplio rango de masas (50-1700 Da) con una alta resolución (> 12500 FWHM) y una alta precisión de masa (< 5 ppm).

Está equipado con una fuente de ionización de impacto electrónico (EI) y trabaja en modo de ionización positivo. Por otra parte, la adquisición de masas se puede hacer tanto en modo MS como en MS/MS, permitiendo de este modo llevar a cabo la fragmentación de masas y obtener espectros de alta resolución de estos iones producto aumentando la selectividad y minimizando las interferencias de la matriz. El software usado para la gestión de datos fue Mass Hunter v7.0 (Agilent, EEUU) y las librerías usadas para la identificación de compuestos fueron la librería NIST (librería de referencia en cromatografía de gases con más de 200.000 compuestos de todo tipo) y

Metodología

la librería FIEHN (librería específica de metabolómica con más de 800 compuestos).

Para asegurar que las medidas de las masas son correctas, el software requiere de una calibración del eje de masas para que los valores de m/z de los picos de la muestra puedan ser determinados con precisión. Es por ello que se llevan a cabo dos procedimientos de calibración, uno antes y otro durante el análisis de la muestra. La calibración previa al análisis de las muestras se realiza utilizando un conjunto de picos de referencia incluidos en la ampolla de calibración del equipo, para que el software determine las diferencias entre la masa real de los picos de referencia y la medición observada de ellos a lo largo del eje de masas. Durante el análisis de las muestras se realiza la misma calibración entre muestra y muestra de forma automática, para una corrección en tiempo real que permite lograr una alta precisión en la determinación de la masa.

2.3 Condiciones analíticas para el análisis no dirigido LC-MS

En todos los casos, las temperaturas de la columna y del automuestreador fueron fijadas en 40°C y 4°C, respectivamente. El volumen de muestra de inyección fue 5 μL y el flujo de 0.4 mL/min. Las condiciones del ESI fueron las siguientes: el capilar fue fijado a 3.2 kV y 2.8 kV en modo positivo y negativo, respectivamente; el voltaje del cono fue fijado a 40 V; las temperaturas de desolvatación y la fuente fueron 380°C y 120°C, respectivamente; el flujo del cono y los gases de nebulización fueron 50 L/h y 800 L/h, respectivamente. Se usaron los mismos parámetros para el análisis simultáneo MS y MS/MS, con una rampa de energía de colisión de 5 a 60 eV en el canal MS/MS.

Metodología

2.3.1 Análisis no dirigido Genérico-RP

Las condiciones LC-MS para el análisis no dirigido genérico-RP fueron adaptadas de la referencia [208].

La separación UPLC se llevó a cabo usando una columna Acquity UPLC HSST3 (1.7 μm , 2.1 \times 100 mm; Waters). Los eluyentes y disoluciones de lavado fueron: i) Solvente A: agua con 0.1% de ácido fórmico; ii) Solvente B: acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico; iii) WNW y lavado de jeringa: agua/acetonitrilo (90:10, v/v); y iv) SNW: acetonitrilo.

Se utilizó un gradiente de elución de 26 min de la siguiente forma: durante los 2 primeros min, la composición de eluyentes fue de 99.9% A y 0.1% B, los cuales cambiaban de forma lineal hasta 75% A y 25% B en 4 min; después la proporción de B aumentaba hasta 80% en los siguientes 4 min, seguido de un aumento hasta 90% B alcanzado al min 12 y un 100% B en el min 17, manteniéndolo de esta forma durante 5.5 min. Finalmente, se alcanzaban las condiciones iniciales y se mantenían durante 2 min para el acondicionamiento de la columna.

La detección de masas se llevó a cabo en modo scan MS en el intervalo de 50 a 1000 Da con un tiempo de scan de 0.1 s.

2.3.2 Análisis no dirigido Lipidómico-RP

Las condiciones LC-MS para el análisis no dirigido lipidómico-RP fueron adaptadas de la referencia [209].

La separación UPLC se llevo a cabo usando una columna Acquity UPLC BEH C18 (1.7 μm , 2.1 \times 100 mm; Waters). Los eluyentes y disoluciones de lavado fueron:

- i) Solvente A: agua con 0.1% de ácido fórmico y 1% acetato amónico 1M;
- ii) Solvente B: acetonitrilo/isopropanol (5:2) con 0.1% de ácido fórmico y 1% acetato amónico 1M;
- iii) WNW y lavado de jeringa: agua/acetonitrilo (90:10, v/v); y iv) SNW: acetonitrilo/isopropanol (5:2).

Metodología

Se realizaron dos separaciones cromatográficas para los diferentes modos de ionización, ESI (+) y ESI (-). Para ESI (+) se utilizó un gradiente de 18 min de la siguiente forma: la composición inicial de eluyentes fue de 65% A y 35% B, los cuales cambiaban de forma lineal hasta 20% A y 80% B en 2 min; después la proporción de B aumentaba hasta 100% al min 9, manteniéndolo de esta forma durante 7 min. Finalmente, se alcanzaban las condiciones iniciales y se mantenían durante 2 min para el acondicionamiento de la columna. Para ESI (-) se utilizó un gradiente de 18 min de la siguiente forma: la composición inicial de eluyentes fue de 85% A y 15% B, los cuales cambiaban de forma lineal hasta 35% A y 65% B en 2 min; después la proporción de B aumentaba hasta 100% al min 11, manteniéndolo de esta forma durante 5 min. Finalmente, se alcanzaban las condiciones iniciales y se mantenían durante 2 min para el acondicionamiento de la columna.

La detección de masas se llevó a cabo en modo scan MS en el intervalo de 200 a 1200 Da en ESI (+) y en el intervalo de 100 a 1200 Da en ESI (-) con un tiempo de scan de 0.1 s.

2.3.3 Análisis no dirigido HILIC

Para la separación UPLC se utilizó una columna Acquity UPLC BEH Amide (1.7 μm , 2.1 \times 100 mm; Waters). Los eluyentes y disoluciones de lavado fueron:

i) Solvente A: acetonitrilo; ii) Solvente B: acetato amónico 20 mM a pH 3 en agua; iii) WNW y lavado de jeringa: agua/acetonitrilo (10:90, v/v); y iv) SNW: agua/acetonitrilo (90:10, v/v).

Respecto al gradiente de elución, se utilizó un gradiente de 18 min de la siguiente forma: durante los 3 primeros min, la composición de eluyentes fue de 95% A y 5% B, los cuales cambiaban de forma lineal hasta 75% A y 25% B en 6 min; después la proporción de B aumentaba hasta 65% en el min 13, manteniéndolo de esta forma durante 2 min.

Metodología

Finalmente, se alcanzaban las condiciones iniciales y se mantenían durante 2.5 min para el acondicionamiento de la columna.

La detección de masas se llevó a cabo en modo scan MS en el intervalo de 50 a 1000 Da.

2.4 Condiciones analíticas para el análisis no dirigido GC-MS

Las condiciones GC-MS para el análisis no dirigido fueron adaptadas del protocolo Fiehn de Agilent [210].

El volumen de muestra de inyección fue 1 μ L en modo con división de flujo (split) 10:1 a flujo constante. Los disolventes de limpieza de la jeringa fueron metanol (A) y acetato de etilo (B). El valor de presión se fijó usando el método de bloqueo de tiempo de retención del metil estearato, el cual se usaba como patrón interno (PI). La energía de ionización fue de 70 eV. Las temperaturas de la línea de transferencia, de la fuente y del cuadrupolo fueron 290°C, 250°C y 150°C, respectivamente.

La separación cromatográfica se llevo a cabo usando una columna capilar HP DB-5MS+DG (30 m x 250 μ m x 0.25 μ m; Agilent). Como gas portador se utilizó Helio y como gas de refrigeración Nitrógeno. Se usó un gradiente de temperaturas del horno de 37.5 min: temperatura inicial de 60°C y ascenso hasta 325°C a 10°C/min, manteniendo la temperatura final durante 10 min. La detección de masas se llevo a cabo en modo scan MS en el intervalo de 50 a 600 Da con una velocidad de adquisición de 10 espectros/segundo.

2.5 Procesamiento de datos en crudo e identificación de metabolitos en el análisis metabolómico no dirigido

El objetivo principal en el tratamiento de los datos es organizar correctamente la enorme cantidad de datos brutos generados por los archivos de MS en una matriz que facilite la manipulación posterior de los datos para el análisis multivariante. Por lo tanto, los datos se representan en una matriz 2D en la que cada fila representa una muestra (objeto) y cada columna un ion detectado por MS (variable). Estas variables se expresan por la combinación de tres características, dos que definen la identidad del ion, m/z y RT, y otra que define la intensidad del ión medido en cada una de las muestras [211].

2.5.1 LC-MS

Los datos brutos fueron adquiridos usando el software Masslynx v 4.1 (Waters, Reino Unido) y se convirtieron posteriormente pasando de formato *.raw a formato *.cdf usando la herramienta Data Bridge del software v4.1 Masslynx. El procesamiento de datos se realizó utilizando el software gratuito v.2.9.1 MZmine [212]. Los siguientes pasos se ejecutan de forma secuencial durante el tratamiento de los datos (**Figura 2.4**): i) recolección/detección de pico, se trata de la detección de todas las señales por encima de un determinado umbral, distinguiendo así las señales verdaderas del ruido; ii) deconvolución de las señales detectadas a fin de integrar la masa y la información cromatográfica, como resultado se obtiene una lista de picos (*features*) caracterizados por RT, m/z e intensidad para cada muestra; iii) alineación, con el fin de poder comparar entre diferentes muestras, los *features* deben coincidir y estar alineados a través de todas las muestras incluidas en el conjunto de muestras; iv) llenado de huecos (*gap filling*), se trata de la recopilación de la información de intensidad de los picos que en un

Metodología

principio no se detectaron en todas las muestras; v) filtrado, consiste en la eliminación de esos *features* no informativos que no están presentes en un número determinado de muestras, donde el filtrado inicial se fijó para eliminar aquellas características que no están presentes en al menos 20% de las muestras problema pertenecientes a una clase común o en el 50% de un determinado tipo de control de calidad (QC) de la muestra, una vez que se han realizado los procedimientos de verificación de control de calidad, los filtros adicionales se aplican y esos *features* no presentes en las muestras problemas o presentes en las muestras de los blancos de control de calidad también se eliminan [189,213]; vi) Normalización, diferentes enfoques de normalización han sido descritos en la bibliografía [211,214], sin embargo decidimos normalizar los datos con respecto al patrón interno que se añade a cada muestra durante los procesos de homogenización y preparación [189,213]. Como la respuesta del PI se ve afectada por factores tales como las pérdidas de muestra durante la preparación, volumen de inyección o la detección de masas, tras la normalización esos factores se corrigen y se eliminan los datos anómalos antes de las posteriores etapas de análisis. Además se llevan a cabo procedimientos adicionales de normalización para algunos tipos de muestras, como por ejemplo en las muestras de cultivos celulares, donde se incluye la normalización de la señal con respecto a la cantidad total de la muestra biológica, representada por el contenido total de proteína [137].

Por último, la identificación de metabolitos se realizó mediante la consulta de la masa exacta de los *features* detectados dentro de un cierto rango de masas (± 5 ppm) en las bases de datos en línea. Las bases de datos empleadas para la identificación de metabolitos fueron: la base de datos del metaboloma humano (HMDB) [142], y la base de datos Metlin [215]. La identidad de los metabolitos de interés fue confirmada mediante la comparación de los espectros MS/MS de los *features* seleccionados con los de los metabolitos propuestos en las base

Metodología

de datos en línea HMDB [142], Metlin [215] y MassBank [216]. Las identidades de los metabolitos seleccionados se ven además confirmadas mediante el uso de patrones reales disponibles.

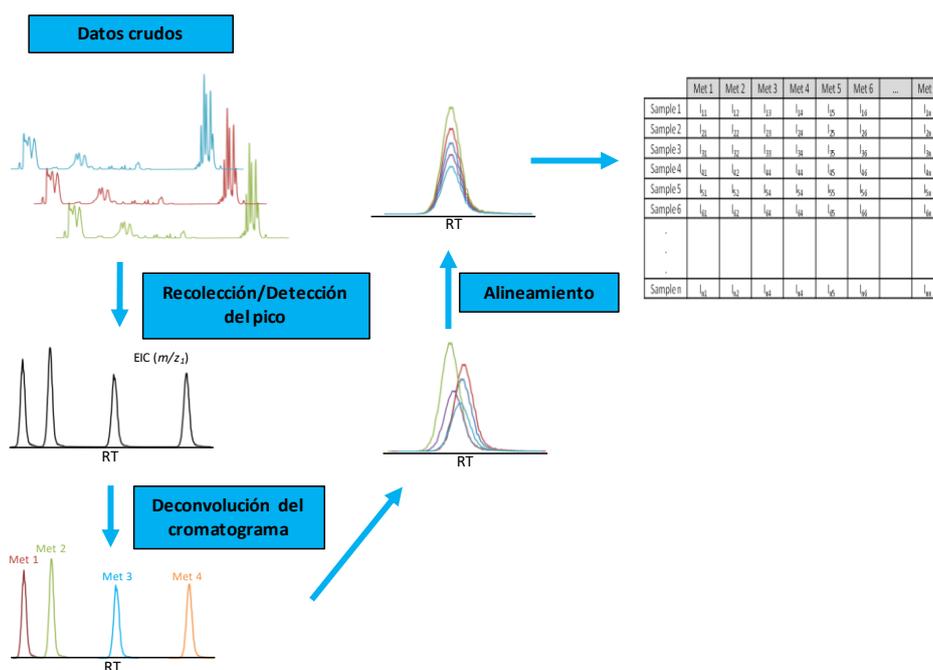


Figura 2.4. Representación esquemática de los pasos más importantes llevados a cabo durante el procesamiento de datos. Figura adaptada de la referencia [217].

2.5.2 GC-MS

Los datos brutos fueron adquiridos usando el software MassHunter v6.0 (Agilent, EEUU). El software MassHunter Unknowns Analysis v.7.0 (Agilent, EEUU) se usó durante el proceso de deconvolución, seguido de la identificación de metabolitos mediante el uso de librerías de GC-MS tales como la librería NIST o Fiehn [210]. Posteriormente los archivos se convirtieron en formato *.CEF mediante un scrip característico proporcionado por Agilent. Por último el procesamiento de datos se

Metodología

realizó utilizando el software Mass Profiler Professional v.12.6 (Agilent, EEUU). Los pasos seguidos durante el procesamiento de datos fueron análogos a los explicados en la **sección 2.5.1** para las muestras obtenidas en LC-MS.

2.6 Análisis de datos

Todo el análisis estadístico univariante y multivariante se llevó a cabo mediante el software online y gratuito MetaboAnalyst 3.0. [159,218] y los software Mass Profiler Professional (MPP) de Agilent y SIMCA [219]. Para el análisis de datos, toda la información para una muestra dada (es decir, la información proporcionada por las diferentes condiciones de análisis en el caso que las hubiese) se unió en una sola matriz. La estrategia seguida para el análisis de los datos se representa en la **Figura 2.5** [220]. Dicha estrategia se desarrolla en tres etapas diferentes. I) la detección y eliminación de valores anómalos o atípicos (*outliers*) se realiza en base al examen de la distribución de la intensidad de las muestras y el análisis multivariado no supervisado, como el HCA o el PCA. II) Con el fin de descifrar patrones metabólicos asociados con la esteatosis, los datos se dividen en un grupo control frente a un grupo tratado o con diagnóstico de EHGNA y las variables que muestran un valor $q < 0,05$ (basado en la prueba *U de Mann-Withney*) o una importancia de la variable en la proyección (VIP) con un valor > 1 (en los modelos de PLS-DA) se consideran variables discriminantes. III) Por último, se desarrollan modelos predictivos/clasificatorios basados en PLS-DA.

2.6.1 Revisión de los datos generados en el análisis por MS

El primer paso en el análisis de datos es la detección de potenciales valores anómalos. Estos valores se definen como aquellas muestras que

Metodología

muestran un comportamiento anormal que puede deberse a distintos motivos como a la degradación de la muestra, errores instrumentales, cambios en las condiciones de medición o fallos debido a errores humanos [165].

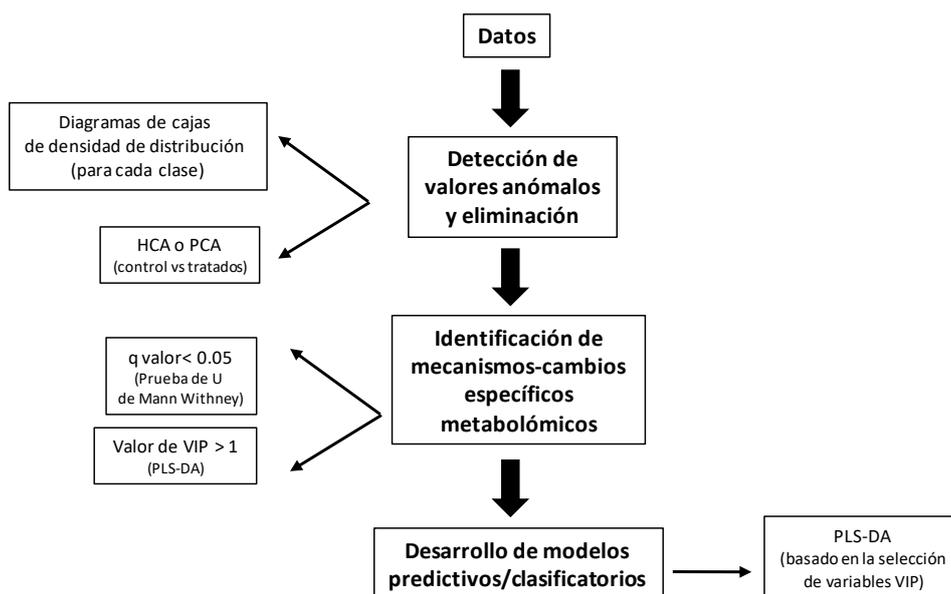


Figura 2.5. Diagrama de flujo para la estrategia llevada a cabo en el análisis de los datos.

Se aplicaron dos estrategias diferentes con el fin de realizar una detección temprana de dichos valores anómalos en el proceso de análisis de datos. En primer lugar, se generaron diagramas de densidad de cajas y bigotes, en los que se obtiene información acerca de la distribución de la intensidad de todos los *features* de una sola muestra y se visualizan utilizando un único gráfico. Las muestras cuyas distribuciones difieren considerablemente del resto de las muestras (valores por encima o por debajo de 3 desviaciones estándar desde la media) pertenecientes a su misma clase (es decir, muestras control, muestras esteatóxicas...) se

Metodología

consideraron valores atípicos y fueron eliminadas de los siguientes pasos. A continuación, sin supervisión (es decir, sin utilizar ningún conocimiento a priori acerca de las muestras) se realizaron análisis multivariantes con el fin de visualizar la interrelación natural entre las diferentes muestras y detectar valores atípicos que no hayan sido detectados anteriormente y que puedan interferir en el análisis posterior. En el caso de aproximaciones multiclase (más de dos grupos) se realizó poniendo a prueba un grupo tratado con respecto a su control (es decir, la esteatosis vs control, estrés oxidativo vs control y así sucesivamente). Las herramientas empleadas para este fin fueron HCA o PCA. En ambos enfoques, las muestras que se agrupan en conjunto se consideran que tienen patrones metabólicos más similares que los que se agrupan aparte. Los conjuntos de datos fueron centrados a la media y escalados a varianza unitaria antes de realizar el HCA. Los conjuntos de datos fueron transformados de forma logarítmica para conseguir distribuciones normales, centrados a la media y escalados a varianza unitaria antes de realizar el PCA. Las muestras cuya posición en el gráfico de puntuaciones del PCA están lejos del resto de las muestras de su mismo grupo (es decir, fuera de la elipse de confianza de un 95% para T^2 de Hotelling [221]) pueden ser consideradas valores anómalos.

El proceso de detección y eliminación de valores atípicos se ejemplifica en la **Figura 2.6** utilizando un conjunto de datos simulados. El conjunto de datos utilizado en el ejemplo se compone de 100 variables y 20 observaciones, 10 pertenecientes al grupo A y 10 pertenecientes al grupo B. Para el grupo A las primeras 50 variables siguen una distribución normal con una media de 80 y una desviación estándar de 15, las segundas 50 variables siguen una distribución normal con una media de 120 y una desviación estándar de 15. Para el grupo B, las variables comparten las mismas características, pero con las medias invertidas. Para la muestra B5, se asigna un valor de 160 para la media de las primeras 50 variables. La **Figura 2.6.a** muestra que el valor medio

Metodología

y la desviación de la intensidad de las variables para la muestra B5 son mayores que los obtenidos para el resto de las muestras. El gráfico de puntuaciones del PCA muestra como esa muestra B5 está fuera de la elipse de confianza del 95% de la T^2 de Hotelling obtenida para el grupo B (representada en rojo) (**Figura 2.6.b**). Por último, el dendrograma dibujado en la parte superior de la **Figura 2.6.c** muestra que se obtienen dos grupos, que corresponden a los grupos A y B, respectivamente. Sin embargo, puede verse que dentro de la agrupación correspondiente al grupo B, la muestra B5 muestra la mayor distancia con respecto al resto de las muestras y se agrupa aparte del resto de las muestras del grupo. Por otra parte, una mirada al *heatmap* revela que la razón de esta distancia es un aumento en la intensidad en un grupo de variables con respecto al resto de las muestras del grupo. Por tanto, la muestra B5 se puede identificar como valor anómalo y la razón de su comportamiento anormal con respecto al resto de las muestras del grupo se ha evidenciado.

2.6.2 Identificación de alteraciones metabólicas

Con el fin de visualizar los cambios metabólicos provocados por cada tratamiento específico y con vistas a elucidar el mecanismo que los provoca, se utilizó la prueba no paramétrica *U de Mann-Whitney*. Las variables con un valor de $q < 0,05$ se consideraron alteradas de manera significativa como resultado del tratamiento. Como las pruebas univariantes no reflejan la naturaleza multivariante de los datos y la relación entre las diferentes variables, se construyeron modelos PLS-DA para cada caso control-tratamiento y las variables con un valor de $VIP > 1$ fueron también consideradas como causantes de un importante impacto en la discriminación entre los grupos control y tratados. Basándonos en esos metabolitos alterados, se empleó la herramienta de análisis de Metaboanalyst [222] para trazar las vías alteradas significativamente como consecuencia del tratamiento. Por último, se elaboraron diagramas

Metodología

de caja y bigotes de los metabolitos alterados significativamente, los grupos de metabolitos y vías alteradas para facilitar la interpretación y visualización de los datos.

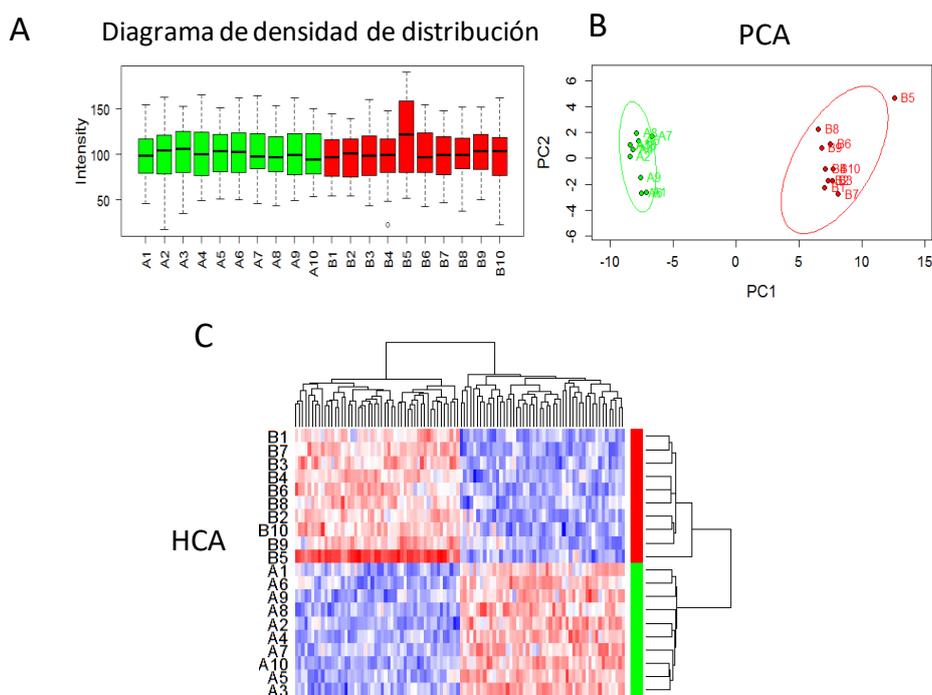


Figura 2.6. A) Ejemplo simulado de la aplicación del diagrama de densidad de distribución de caja de bigotes, B) PCA y C) HCA para la detección de valores atípicos. A) La distribución de la intensidad en el diagrama de caja muestra que la muestra B5 tiene una media mayor y una desviación mayor en comparación con el resto de las muestras pertenecientes a su misma clase (color rojo). Las cajas denotan rangos intercuartílicos, las líneas denotan las medianas, y los bigotes indican los percentiles 10 y 90. B) Los gráficos de puntuaciones del PCA se dibujan para cada grupo (el verde, clase A, y el rojo, clase B). La muestra B5 está fuera de la elipse y lejos del resto de muestras de su mismo grupo. C) HCA, el dendrograma dibujado en la parte superior muestra la gran distancia entre B5 y el resto de las muestras del grupo, que se agrupan juntas. Basándose en esta información, la muestra B5 se considera un valor atípico. Figura adaptada de la referencia [217].

Metodología

Para ejemplificar la estrategia de análisis de datos propuesta con respecto a la detección de variables alteradas (metabolitos) se ha creado un conjunto de datos simulados que consta de 100 variables y 30 muestras, dividido en dos grupos de igual tamaño. Las variables se generaron usando una distribución normal de media 100 y desviación estándar 15. Entre las 100 variables, se seleccionaron 10 variables que tenían diferentes medias entre los dos grupos: V1 (A = 120, B = 100), V11 (A = 80, B = 100), V21 (A = 100, B = 120), V31 (A = 100, B = 120), V41 (A = 140, B = 100), V51 (A = 60, B = 100), V61 (A = 100, B = 140), V71 (A = 100, B = 140), V81 (A = 120, B = 100), y V91 (A = 100, B = 120). La **Tabla 2.1** muestra los resultados de las variables seleccionadas utilizando una simple prueba de *U de Mann-Whitney* ($p < 0,05$) y el valor de VIP ($VIP > 1$) como criterios. Se obtuvieron resultados similares con respecto al número total y la identidad de las variables seleccionadas con las estrategias del p valor y VIP. En ambos casos se seleccionaron todas las variables con una diferencia predefinida de la media entre las dos clases, sin embargo, también se incluyeron una serie de variables que no se suponía que iban a ser diferentes entre los dos grupos.

Tabla 2.1. Datos de las diferentes estrategias empleadas para la selección de variables en los datos simulados que se describen en la Sección 2.6.2.

Estrategia	Número de variables seleccionadas	Número de variables seleccionadas y alteradas realmente	Variables seleccionadas
p valor	15	10	<u>V1</u> , V4, <u>V11</u> , <u>V21</u> , <u>V31</u> , V36, <u>V41</u> , V42, V44, <u>V51</u> , <u>V61</u> , <u>V71</u> , <u>V81</u> , V90, <u>V91</u>
VIP	16	10	<u>V1</u> , V4, <u>V11</u> , <u>V21</u> , <u>V31</u> , V36, <u>V41</u> , V42, V44, <u>V51</u> , <u>V61</u> , <u>V71</u> , V75, <u>V81</u> , V90, <u>V91</u>

p valor: variables con un p valor de *U de Mann-Whitney* < 0.05 ; VIP: variables con un valor $VIP > 1$, valores VIP correspondientes a un modelo PLS-DA desarrollado usando 1 variable latente. Las variables subrayadas representan las variables con diferentes medias entre los dos grupos.

Metodología

2.6.3 Desarrollo de modelos predictivos

El objetivo principal en el desarrollo de modelos predictivos es utilizar el modelo más óptimo, es decir, el que se adapte mejor con el mínimo número posible de predictores. Para ello, se realizó un análisis PLS-DA mediante la clasificación y selección de variables basadas en VIP.

Validación del modelo

Se ensayaron dos estrategias diferentes respecto a la validación del modelo: la validación cruzada (CV) y la prueba de permutación de clases [166,167]. A pesar de que la forma óptima para la validación de cualquier modelo es utilizar un conjunto de datos externos que no hayan participado en la construcción del modelo (validación externa), las limitaciones en el número de muestras y compuestos ensayados hicieron que usásemos la CV y la prueba de permutación en su lugar.

En una estrategia de CV los datos se dividen en diferentes subconjuntos y, dependiendo de la forma en que el CV se lleva a cabo, algunos de los subconjuntos se utilizan para construir el modelo y el resto se utiliza para evaluar las capacidades del modelo. Se emplearon dos estrategias diferentes de CV.

Para el desarrollo del modelo se utilizó una estrategia de 7-fold CV (**Figura 2.7.a**). Usando esta aproximación, los datos se dividieron en 7 subgrupos diferentes. En cada ronda de la CV, 6 de los subgrupos se utilizaron para desarrollar el modelo y el último se utilizó como conjunto de prueba para evaluar las capacidades del modelo. El proceso se repitió hasta que se utilizaron todos los subconjuntos como prueba. Para la validación del modelo, se usaron dos parámetros diferentes: el error de clasificación y AUROC (área bajo la curva del operador característico), por problemas multiclase se empleó el método desarrollado por Hand y Till [223]. Se utilizó una estrategia aleatoria de CV para estimar estos

Metodología

parámetros: 2/3 de los datos se emplearon para desarrollar el modelo y otro tercio se utilizó como conjunto de prueba (**Figura 2.7.b**). Las particiones se repitieron 100 veces de manera aleatoria.

Por último, también se utilizó la prueba de permutación de clases como estrategia de validación. Una prueba de permutación implica la reasignación al azar de las etiquetas de clase y el desarrollo y evaluación de modelos basado en el conjunto de datos recién re-etiquetado (**Figura 2.7.c**). En las pruebas de permutación se compara la bondad del ajuste del modelo original con los valores obtenidos después de la aleatorización de las clases. Las figuras de mérito del rendimiento del modelo se pueden representar en un histograma para la evaluación visual, lo que hace posible determinar si la asignación de clases original es significativamente diferente, en todo o en parte, de la distribución basada en las asignaciones de la permutación de clases. Se puede calcular un valor de p empírico mediante la determinación del número de veces que los datos permutados produjeron un resultado mejor que el uso de las etiquetas originales [167]. El proceso se repitió 1000 veces y los resultados de rendimiento se compararon con los obtenidos con el del etiquetado real de las clases [167].

PLS-DA

El análisis PLD-DA se basa en PLS con al diferencia de que la variable dependiente (bloque Y) es categórica y normalmente representa las clases [162,163]. El objetivo global del PLS-DA es modelar la relación entre X (el conjunto de datos de MS) e Y (clases). Las ecuaciones fundamentales del PLS-DA [162] están escritas y representadas gráficamente en la **Figura 2.8**.

Metodología

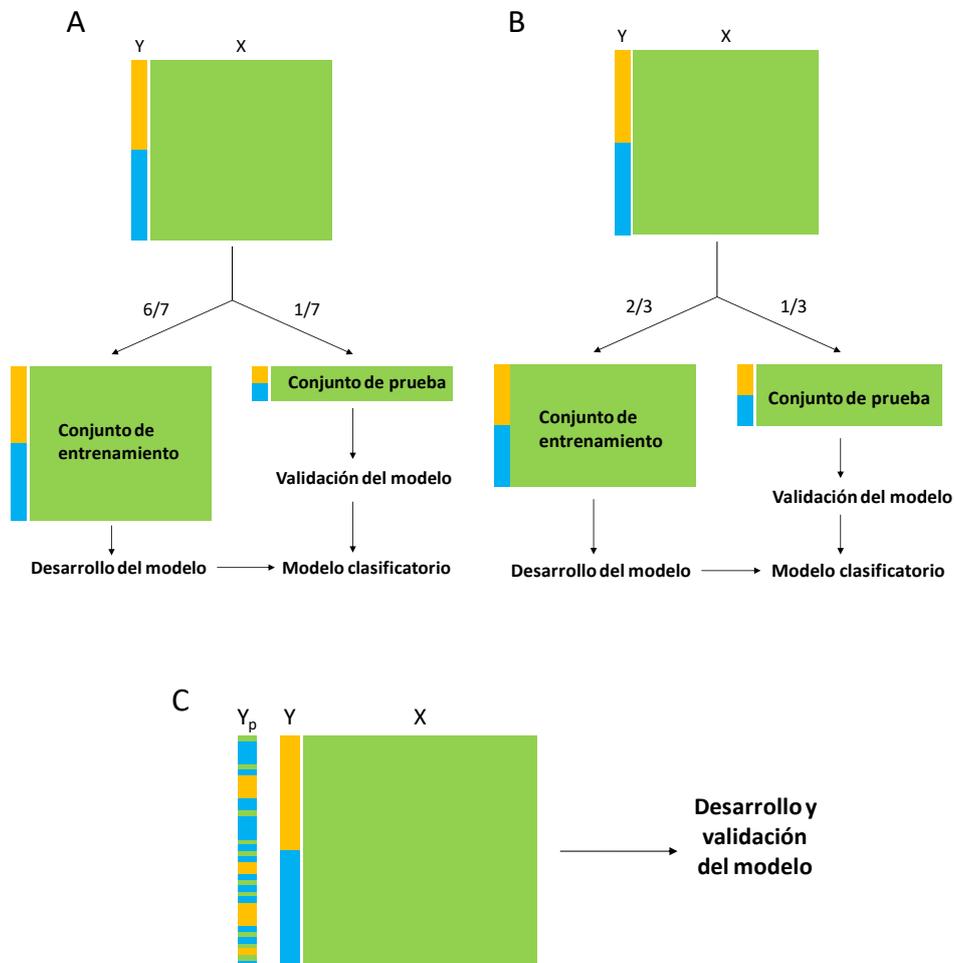


Figura 2.7. A) 7-fold CV, los datos se dividen en 7 subgrupos diferentes. 6 subconjuntos se utilizan como sistema para construir el modelo y el último como criterio establecido para evaluarlo. El proceso se repite hasta que todos los subconjuntos se han utilizado como conjunto de prueba. B) Los datos se dividen en dos subgrupos, 2/3 de los datos se utilizan como sistema para construir el modelo y el resto como prueba. Las particiones se repiten 100 veces al azar. C) En la prueba de permutación las clases (Y) son asignadas al azar (Y_p) y el modelo se desarrolla y valida utilizando las clases permutadas. Figura adaptada de la referencia [217].

Metodología

[ec. 1]
$$T = XW$$

[ec. 2]
$$X = TP' + E$$

[ec. 3]
$$Y = UC' + F$$

[ec. 4]
$$Y = TC' + F^* = XWC' + F^* = XB + F^*$$

[ec. 5]
$$B = WC'$$

Figura 2.8. Ecuaciones fundamentales del PLS-DA. n representa el número de observación, k el número de variables independientes, m el número de clases en las que las observaciones se pueden clasificar y a el número de LVs empleadas para desarrollar el modelo PLS-DA. X es la matriz de predictores $n \times k$, e Y la matriz respuesta $n \times m$. P ($k \times a$) y C ($m \times a$) son las matrices de las cargas de X e Y , respectivamente. T y U son matrices de puntuaciones $n \times a$ para X e Y , respectivamente. E , F y F^* representan matrices residuales. W ($k \times a$) representa la matriz de peso X y B ($k \times a$) representa la matriz de coeficientes de regresión para todas las Y s. Las puntuaciones de X (T) se calculan como una combinación lineal de los predictores originales con los pesos [eq 1]. X e Y pueden ser proyectadas en el nuevo espacio adimensional [eq 2,3]. Y se puede predecir en base en las puntuaciones de X (T) [eq 4], que puede ser reformulado en base a las ecuaciones 1,5 visto como un modelo de regresión múltiple en el que las respuestas (Y) se pueden predecir basadas en una serie de predictores (X) a través de los coeficientes correspondientes (B). Las ecuaciones 2, 3 y 4 se representan gráficamente. Figura adaptada de la referencia [217].

Los conjuntos de datos fueron transformados logarítmicamente, centrados a la media y escalados a varianza unitaria antes de realizar el PLS-DA. La selección del número óptimo de LV y la evaluación de la calidad de los modelos PLS-DA se llevó a cabo por el procedimiento de

Metodología

CV típico dejando una séptima parte de las muestras fuera de cada ronda (**Figura 2.7.a**) [28]. Los diferentes parámetros del modelo se utilizaron para evaluar el rendimiento del mismo: i) varianza explicada total de Y (es decir, R^2); ii) variación predecible de Y (es decir, Q^2); iii) precisión de la predicción, evaluada como la tasa de error de clasificación; y iv) AUROC. Pueden ser utilizados diferentes métodos con el fin de evaluar la importancia de una variable proporcionada por un modelo PLS-DA [213], entre todos ellos, decidimos emplear el valor de VIP.

La puntuación VIP de un predictor resume la importancia en las proyecciones para encontrar una LV. Dado que el promedio de las puntuaciones VIP al cuadrado es igual a 1, la regla "mayor que uno" se utiliza generalmente como un criterio de selección de variables [224]. Por lo tanto, un proceso de eliminación de variables poco informativas se puede realizar a partir de los valores obtenidos de VIP [213]. Dicho procedimiento no sólo mejora el rendimiento del modelo, sino que también logra una simplificación de éste, un aspecto importante para el futuro desarrollo de aproximaciones dirigidas de MS para la determinación cuantitativa de biomarcadores [213]. Como el sobreajuste es un problema común asociado al modelado con PLS-DA [28,30], se usó una estrategia de *bootstrapping* [225,226] junto a la determinación de los valores de VIP para seleccionar los metabolitos que se deben incluir en el modelo predictivo final.

Bootstrapping se basa en un remuestreo aleatorio con reemplazo para estimar un parámetro estadístico. Para la construcción del modelo PLS-DA, se obtuvieron doscientos conjuntos de datos derivados del muestreo aleatorio con reemplazo de las observaciones, para cada uno de los conjuntos de datos utilizados. Se construyó un modelo PLS-DA para cada uno de los conjuntos de datos obtenidos y se calculó el valor medio del VIP para cada predictor. Los modelos PLS-DA se construyeron disminuyendo el número de variables en función del valor medio del VIP clasificado. Para cada modelo se registraron R^2 , Q^2 y la precisión de la

Metodología

predicción. El modelo de predicción óptimo fue seleccionado como el que proporciona la más alta precisión con el menor número de variables retenidas. A fin de evaluar la consistencia y rendimiento del modelo, se aplicó un test de permutación de respuesta ($n = 1000$), basado en R^2 , Q^2 , precisión de la predicción y AUROC [167,168].

Con el fin de facilitar la comprensión de la estrategia de análisis de datos de PLS-DA, se aplicó todo el proceso en los datos simulados descritos en la **Sección 2.6.2**. La **Figura 2.9** muestra los valores de R^2 , Q^2 y los errores de clasificación obtenidos para los modelos PLS-DA construidos utilizando todas las variables y un número de LV que varía de 1 a 3. De los resultados obtenidos se puede concluir que el número óptimo de LV utilizadas para el desarrollo del modelo PLS-DA es 1, ya que proporciona los valores más altos de Q^2 , que evalúa la capacidad predictiva del sistema así como la precisión.

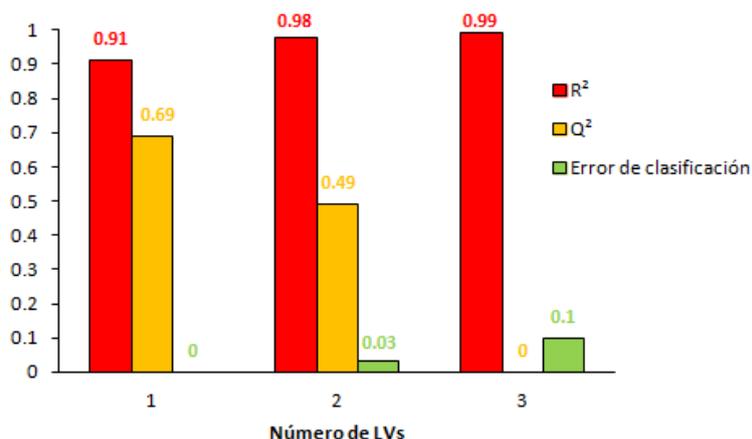


Figura 2.9. Valores de R^2 , Q^2 y de error de clasificación en función del número de las LVs empleadas para construir el modelo PLS-DA, utilizando los datos simulados descritos en la Sección 2.6.2. Los valores obtenidos para cada parámetro y modelo se detallan encima de la barra correspondiente.

Metodología

Después de determinar el número óptimo de LVs, el siguiente paso es decidir las variables que deben ser incluidas en el modelo predictivo/clasificadorio final. Para ello, se clasificaron de acuerdo con la estrategia descrita anteriormente, modelos PLS-DA con un creciente número de variables, construyéndose y evaluando su rendimiento. Siguiendo con el análisis del ejemplo, todas las variables que tenían diferencias en las medias entre las dos clases se quedaron dentro del top 15 de las variables, además, las cuatro variables con mayores diferencias simuladas (es decir, V51, V61, V71 y V81) fueron las de mayor valor medio de VIP. Por otra parte, la **Figura 2.10**, muestra que el modelo con el rendimiento más alto (es decir, AUROC = 1, error de clasificación = 0) se logró con sólo estas cuatro variables.

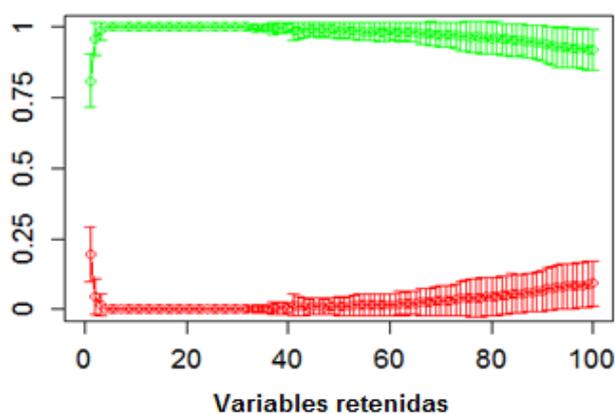


Figura 2.10. Valores obtenidos para el AUROC (verde) y error de clasificación (rojo) frente al número de variables retenidas utilizando los datos simulados descritos en la Sección 2.6.2 basados en el remuestreo *bootstrap* acoplado a la estrategia de clasificación del VIP. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. El valor mínimo para el error de clasificación y el valor máximo para el AUROC se obtienen con el modelo desarrollado utilizando sólo las cuatro variables mejor clasificadas.

Los gráficos de puntuaciones y de cargas correspondientes al modelo óptimo PLS-DA están representados en la **Figura 2.11.a** y la **Figura 2.11.b**, respectivamente. La posición de una variable en el gráfico de

Metodología

cargas está determinada por su relación con otras variables y la asignación de la clase. En el ejemplo representado en la **Figura 2.11.b**, las variables V41 y V71 están correlacionadas positivamente entre sí y la Clase A, como queda patente por sus valores cercanos respecto a la LV1. La misma conclusión se puede obtener con respecto a las variables V51 y V61 y la Clase B.

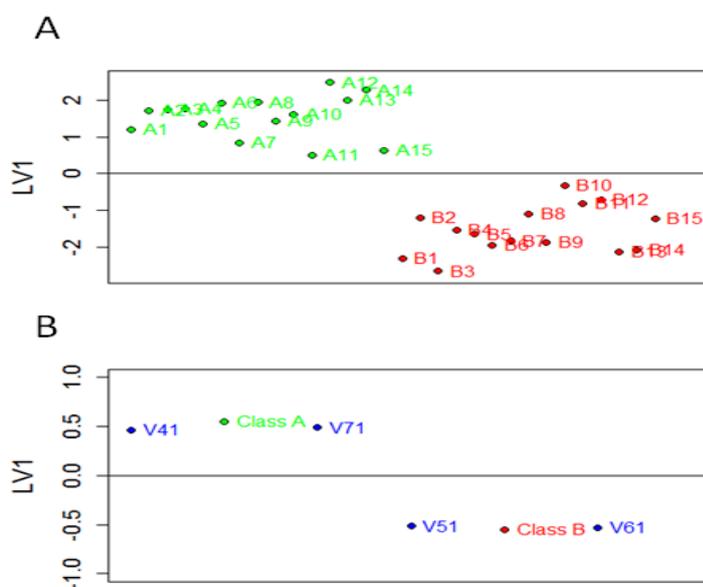


Figura 2.11. Gráficos de puntuaciones (A) y cargas (B) correspondientes al modelo PLS-DA desarrollado usando las 4 variables mejor clasificadas y 1LV, utilizando la simulación de datos descritos en la **Sección 2.6.2** y un *bootstrapping* acoplado a la clasificación basada en VIP y a una estrategia de selección de variables. La Clase A se representa en verde, la Clase B en rojo y las variables en azul. El eje X representa el orden de la muestra.

La validación del modelo se realizó mediante el uso de un test de permutación de clases. Los resultados se muestran en la **Figura 2.12**. Se evaluaron cuatro parámetros: R^2 , Q^2 , error de clasificación y AUROC. Los histogramas representan la distribución de los valores obtenidos para los modelos permutados y el valor obtenido con las clases reales está representado por un punto rojo. Para todos los parámetros se puede

Metodología

observar que el valor real se encuentra fuera de la distribución de los valores obtenidos con las clases permutadas. Como se realizan 1000 permutaciones, se puede asignar un valor de p experimental $<0,001$. Estos resultados indican que el modelo PLS-DA desarrollado es coherente, se basa en una diferencia real entre las clases y no refleja una correlación casual entre ellas.

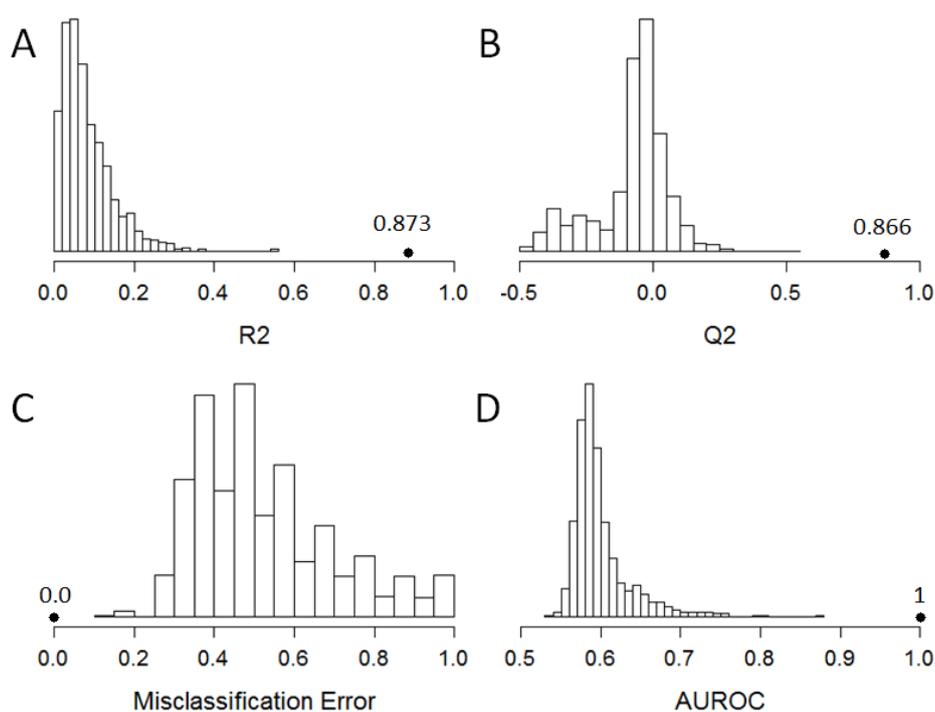


Figura 2.12. Test de permutación ($n = 1.000$) para R^2 (A), Q^2 (B), error de clasificación (C) y AUROC (D) correspondiente al modelo PLS-DA desarrollado usando las 4 variables mejor clasificadas y 1LV, utilizando la simulación de datos descritos en la Sección 2.6.2 y un *bootstrapping* acoplado a la clasificación basada en VIP y a una estrategia de selección de variables. Los histogramas representan los valores proporcionados por los modelos PLS-DA obtenidos mediante permutación de clases. Los puntos rojos representan el valor obtenido para el modelo PLS-DA desarrollado utilizando las clases reales, con el valor escrito sobre él.

2.7 Validación de un método de análisis dirigido LC-MS/MS de biomarcadores de estrés oxidativo

Se desarrolló un nuevo método UPLC-MS MRM dirigido a evaluar el daño de estrés oxidativo inducido a proteínas, ADN y lípidos en muestras de suero, tejido hepático y células en cultivo [227].

El método bioanalítico se validó en términos de linealidad, exactitud y precisión siguiendo los criterios de cumplimiento descritos por la Guía de la FDA (*food and drug administration*) para la industria: validación del método bioanalítico [228]. Se definió el límite inferior de cuantificación (LLOQ) como la concentración más baja a la que el analito podría ser cuantificado con una desviación estándar relativa (RSD) por debajo del 20% y por debajo de un $\pm 20\%$ de desviación del valor nominal. Se definió el límite superior de cuantificación (ULOQ) como la concentración más alta a la que el analito podría ser cuantificado con una RSD por debajo del 20% y por debajo de un $\pm 20\%$ de desviación del valor nominal. El límite de detección (LOD) se definió como la concentración más baja del analito a la que respuesta era al menos tres veces la respuesta del blanco. Las curvas de calibración se generaron mediante la representación del ratio entre el área del pico del compuesto y de su correspondiente PI frente a la concentración nominal. La recta que proporcionaba el mejor ajuste se determinó por regresión lineal ponderada ($1/x$) por mínimos cuadrados. El criterio de aceptación de linealidad para el coeficiente de correlación fue de 0,99 o superior. Cada concentración estándar calculada mediante el ajuste debía estar dentro de un $\pm 15\%$ de desviación del valor nominal, excepto para el LLOQ, donde la desviación máxima tolerable era del $\pm 20\%$.

Metodología

2.7.1 Metabolitos analizados

Los marcadores incluidos en el método fueron: glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), ácido oftálmico (AcOft), S-(5-adenosil)-L-metionina (SAM), S-(5-adenosil)-L-homocisteína (SAH), fenilalanina (Phe), tirosinas (3-yodo-L-tirosina (*l*-Tyr), 3-nitro-tirosina (N-Tyr), 3-cloro-L-tirosina (Cl-Tyr), DL-*o*-tirosina (*o*-Tyr), DL-*m*-tirosina (*m*-Tyr), L-tirosina (*p*-Tyr)), 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OH-dG), 2-deoxiguanosina (2-dG), 8-isoprostaglandin-F2 α (8-IsoPGF) y malondialdehído (MDA).

Como patrón interno se usó fenilalanina-d5 (Phe-d5) para todos los compuestos, excepto para la 8-IsoPGF para el que se usó 8-isoprostaglandin-F2 α -d4 (8-IsoPGF-d4).

2.7.2 Análisis UPLC-MS

La separación UPLC se llevó a cabo en un sistema Acquity UPLC (Waters, Reino Unido) equipado con una columna Acquity UPLC HSST3 (1,8 m, 2,1 x 100 mm; Waters). Las temperaturas de la columna y del inyector automático se fijaron en 60 °C y 4 °C, respectivamente. El volumen de inyección de la muestra fue de 5 μ L. La composición de los eluyentes y las disoluciones de lavado fueron: i) Eluyente A: ácido fórmico al 0,1% en agua; ii) Eluyente B: ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo; iii) WNW y SW: agua: acetonitrilo (90:10, v/v); y iv) SNW: agua:acetonitrilo (10:90, v/v). El caudal se fijó en 0,3 mL/min. Se utilizó un gradiente de elución de 7 min de la siguiente manera: durante los primeros 2 min, la composición de los eluyentes se fijó en 95% de A y 5% de B, que fue cambiado linealmente hasta 5% de A y 95% B en 1,5 min y se mantuvo durante 2 min. Por último, se recuperaron las condiciones iniciales y se mantuvieron durante 1 min para el acondicionamiento de la columna.

Metodología

El análisis de MS se llevó a cabo usando un espectrómetro de masas Waters MS Xevo TQ-S (Waters) equipado con una fuente ESI operando en modo de ion positivo y negativo a la vez y trabajando en modo MRM. Se usó un voltaje capilar de 3 kV, una temperatura de la fuente de 150 °C y una temperatura de desolvatación de 380 °C. Los flujos del gas de desolvatación y del cono se establecieron en 800 L/h y 150 L/h, respectivamente, y el del gas de colisión fue de 0,25 mL/min. Las transiciones, tiempos de retención, voltajes del cono, y las energías de colisión para cada compuesto se muestran en la **Tabla 2.2**.

Tabla 2.2. Condiciones MS para la cuantificación de los marcadores de estrés oxidativo seleccionados.

Compuesto	Modo de ionización	Ión Padre (m/z)	Fragmento (m/z)	Voltaje del cono (V)	Energía de colisión (eV)	Tiempo de retención (min)
GSSG	ESI +	613.2	355.0	60	15	1.10
GSH ^a	ESI +	433.1	201.0	20	20	3.32
SAM	ESI +	398.9	136.0	22	17	0.74
SAH	ESI +	385.1	136.0	35	25	1.09
l-Tyr	ESI +	308.1	291.0	40	15	3.33
AcOf _t	ESI +	290.2	161.1	15	15	1.16
8-OH-dG	ESI +	284.0	168.0	30	15	2.16
2-dG	ESI +	268.0	152.0	25	15	1.60
MDA ^b	ESI +	235.0	159.0	30	30	4.08
N-Tyr	ESI +	227.1	181.0	25	10	3.21
Cl-Tyr	ESI +	216.0	170.0	30	15	2.37
o-Tyr	ESI +	182.1	136.0	20	10	2.09
m-Tyr	ESI +	182.1	136.0	20	10	1.52
p-Tyr	ESI +	182.1	136.0	20	10	1.27
Phe	ESI +	166.1	120.1	20	20	2.62
8-IsoPGF	ESI -	353.2	193.3	35	25	3.85
Phe-d5	ESI +	171.1	125.1	20	20	2.62
8-IsoPGF-d4	ESI -	357.2	197.3	35	25	3.85

^aCompuesto derivatizado con N-etilmaleimida (NEM).

^bCompuesto derivatizado con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH).

Metodología

Se prepararon curvas de calibración de los patrones en PBS (0,5 mM DNPH, 5 mM NEM) en el intervalo de concentraciones de 2,5 µg/mL a 0,15 ng/mL para cada compuesto. La concentración de Phe-d5 y 8-IsoPGF-d4 (PI) se mantuvo constante a 0,2 µg/mL en todos los puntos de calibración.

2.7.3 Optimización de los reactivos derivatizantes

Durante el desarrollo del método se requirió de una etapa de derivatización para evitar la degradación de algunos analitos lábiles, mejorando así la estabilidad, detección y cuantificación de algunos compuestos. Por esta razón el MDA y el GSH se determinaron después de la reacción con DNPH [229-231] y NEM [79,232], respectivamente (**Figura 2.13**). Para optimizar el procedimiento de derivatización, se prepararon por separado disoluciones de MDA y de GSH en PBS (1 µg/mL) y se analizaron después de la reacción con el reactivo de derivatización correspondiente a diferentes concentraciones (0,25 a 2 mM DNPH y 2,5 a 50 mM NEM). Además, se comprobó si la utilización de los reactivos de derivatización producía interferencias en la determinación de los otros analitos. Con este fin, diferentes disoluciones que contenían todos los analitos de estudio (desde 0,125 hasta 1 µg/mL) fueron tratadas con DNPH 1 mM, NEM 10 mM, ambos reactivos DNPH 1 mM y NEM 10 mM juntos, o sin ningún reactivo de derivatización.

2.7.4 Procesamiento de muestras

El método fue desarrollado para muestras de tejido hepático, suero, medio de cultivo y monocapas celulares, por lo que las muestras biológicas se procesaron de manera diferente dependiendo de su naturaleza.

Metodología

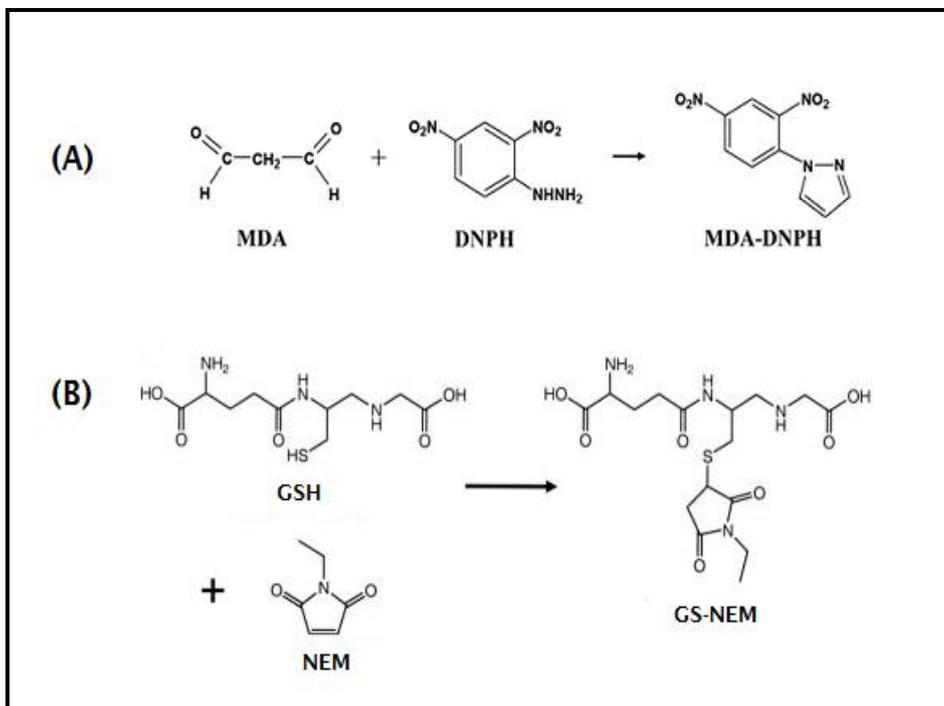


Figura 2.13. A) Reacciones de derivatización del MDA con DNPH y B) GSH con NEM.

Además, para permitir la detección óptima de todos los biomarcadores en las diferentes matrices biológicas, se prepararon tres fracciones diferentes para cada tipo de muestra: i) la *fracción I*, obtenida después de una etapa de concentración, para determinar los analitos a concentraciones más bajas; ii) la *fracción II*, obtenida después de dilución, para determinar los analitos a concentraciones más altas; y iii) la *fracción III*, para determinar el MDA, después de una hidrólisis básica y derivatización debido a su inestabilidad [71].

Las monocapas celulares (previamente lavadas y congeladas en N₂ líquido) se rascaron con 1 mL de NEM 50 mM en PBS y se aplicaron tres ciclos de congelación y descongelación para asegurar la lisis celular. Las muestras de tejido congelado (50-100 mg) se extrajeron usando un sistema Dual Precellys 24 con un total de 1 mL de NEM 50 mM en PBS. Las muestras de medio de cultivo y de suero se utilizaron directamente

Metodología

para preparar las diferentes fracciones, sin necesidad de pretratamiento alguno.

La obtención de las distintas fracciones se realizó como se detalla a continuación (**Figura 2.14**):

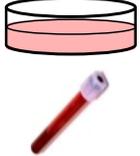
Para obtener la *fracción I*, se añadieron 1.200 μL o 800 μL de metanol frío a 400 μL de extracto celular o 200 μL de extracto de tejido hepático, respectivamente, y los tubos se agitaron en vórtex. Para las muestras de medio de cultivo o de suero, se añadieron 200 μL de NEM 10 mM en PBS a 200 μL de muestra y, después de agitar en vórtex, se añadieron 1.200 μL de metanol frío. La mezcla obtenida (a partir de células, tejido, medio de cultivo o suero) se dejó en reposo durante 20 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después se centrifugó durante 10 min a 10.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y se evaporó a sequedad en el SpeedVac. El residuo seco se reconstituyó en 50 μL de PBS que contenía 200 ng/mL de Phe-d5 y 8-IsoPGF-d4 (PI), se centrifugó (10 min, 10.000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) y el sobrenadante limpio fue transferido a una placa de 96 pocillos de HPLC para su análisis.

Para obtener la *fracción II*, se añadieron 115 μL o 245 μL de metanol frío a 10 μL de extracto celular o 5 μL de extracto de tejido hepático, respectivamente. Para las muestras de medio de cultivo o de suero, se añadieron 15 μL de NEM 10 mM en PBS a 10 μL de muestra y, después de agitar en vórtex, se añadieron 100 μL de metanol frío. A continuación, la mezcla (a partir de células, tejido, medio de cultivo o suero) se dejó reposar durante 20 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después de la centrifugación (10 min, 10.000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), 50 μL de sobrenadante limpio se transfirieron a una placa de 96 pocillos de HPLC y se mezcló con 50 μL de PBS que contenía 400 ng/mL de Phe-d5 (PI) para su análisis.

Para obtener la *fracción III*, 25 μL de NaOH 6 N se añadieron a 100 μL de muestra (extracto celular o de tejido, medio de cultivo o suero), y la mezcla se incubó a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Después se añadieron 60 μL de ácido perclórico al 35% y la mezcla se centrifugó (10 min, 10.000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

Metodología

°C). El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y se mezcló con 15 μL de de una disolución en PBS de DNPH 5 mM y 2.660 ng/mL de Phe-d5 (PI). La mezcla se incubó durante 60 min a 37 °C y se transfirió a una placa de HPLC de 96 pocillos para su análisis.

MATRIZ BIOLÓGICA	PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA	FRACCIÓN I	FRACCIÓN II	FRACCIÓN III
 <p>CÉLULAS</p>	<ol style="list-style-type: none"> Rascar con 1000 μL de PBS + 50 mM NEM. Ciclos de congelación-descongelación. 	<ol style="list-style-type: none"> Añadir MeOH (1200 μL) a 400 μL de muestra e incubar a -20°C durante 20 min. Centrifugar^a. Evaporar el sobrenadante a sequedad. Reconstituir en PBS (50 μL) que contiene PI a 200 ng mL⁻¹. 	<ol style="list-style-type: none"> Añadir MeOH (115 μL) a 10 μL de muestra e incubar a -20°C durante 20 min. Centrifugar^a. Mezclar 50 μL de sobrenadante con 50 μL de PBS que contiene PI a 400 ng mL⁻¹. 	<ol style="list-style-type: none"> Añadir 25 μL de NaOH 6M a 100 μL de muestra e incubar a 60°C durante 30 min. Añadir 60 μL de PCA 35% (v/v). Centrifugar^a. Mezclar el sobrenadante (185 μL) con 15 μL de PBS que contiene PI (2660 ng mL⁻¹) y DNPH 5 mM e incubar a 37°C durante 60 min.
 <p>MEDIO DE CULTIVO/SUERO</p>		<ol style="list-style-type: none"> Añadir 200 μL PBS + 10 mM NEM a 200 μL de muestra. Añadir 1200 μL de MeOH y mantener a -20°C durante 20 min. Centrifugar^a. Evaporar el sobrenadante a sequedad. Reconstituir en PBS (50 μL) que contiene PI a 200 ng mL⁻¹. 	<ol style="list-style-type: none"> Añadir 15 μL de PBS + 10 mM NEM a 10 μL de muestra. Añadir 100 μL de MeOH y mantener a -20°C durante 20 min. Centrifugar^a. Mezclar 50 μL de sobrenadante con 50 μL de PBS que contiene PI a 400 ng mL⁻¹. 	<ol style="list-style-type: none"> Añadir 25 μL de NaOH 6M a 100 μL de muestra e incubar a 60°C durante 30 min. Añadir 60 μL de PCA 35% (v/v). Centrifugar^a. Mezclar el sobrenadante (185 μL) con 15 μL de PBS que contiene PI (2660 ng mL⁻¹) y DNPH 5 mM e incubar a 37°C durante 60 min.
 <p>TEJIDO HEPÁTICO</p>	<ol style="list-style-type: none"> Pesar 50-100 mg de tejido congelado. Homogeneizar con 10 vol. (p/v) de PBS + NEM (50 mM). 	<ol style="list-style-type: none"> Add 800 μL of MeOH to 200 μL of sample and incubate at -20°C for 20 min. Centrifugar^a. Evaporar el sobrenadante a sequedad. Reconstituir en PBS (50 μL) que contiene PI a 200 ng mL⁻¹. 	<ol style="list-style-type: none"> Añadir 245 μL de MeOH a 5 μL de muestra y mantener a -20°C durante 20 min. Centrifugar^a. Mezclar 50 μL de sobrenadante con 50 μL de PBS que contiene PI a 400 ng mL⁻¹. 	<ol style="list-style-type: none"> Añadir 25 μL de NaOH 6M a 100 μL de muestra e incubar a 60°C durante 30 min. Añadir 60 μL de PCA 35% (v/v). Centrifugar^a. Mezclar el sobrenadante (185 μL) con 15 μL de PBS que contiene PI (2660 ng mL⁻¹) y DNPH 5 mM e incubar a 37°C durante 60 min.

^a Centrifugación a 10.000 g durante 10 min y 4°C

Figura 2.14. Diagrama de flujo de la preparación de la muestra para el método de estrés oxidativo antes del análisis UPLC-MS/MS.

Metodología

2.8 Estudios *in vitro* en células en cultivo

2.8.1 Cultivo y tratamiento de líneas celulares

2.8.1.1 Células HepG2

Se utilizó la línea celular de hepatoma humano HepG2 (ECACC N° 85011430). Se trata de células no tumorigénicas con una alta tasa de proliferación de morfología epitelial y que crecen en forma de monocapa adheridas sobre una superficie sólida (**Figura 2.15**).

Las células HepG2 se cultivaron en frascos de cultivo a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂/95% de aire en medio Ham's F-12/Leibovitz L-15 (1:1, v/v) suplementado con un 7% de suero bovino fetal, 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina. El medio fue renovado cada 2 días. Una vez alcanzado el 70-80% de confluencia, las células se despegaron de la superficie de cultivo mediante un tratamiento con un 0,25% de tripsina/0,02% de ácido etilendiamonotetraacético (EDTA) a 37 °C. Se utilizó una muestra de la suspensión celular obtenida para determinar la viabilidad celular (mediante la prueba de exclusión con azul tripán) y el número de células (mediante un contador de células) [233]. Para los estudios metabolómicos, las células se sembraron a una densidad de 9x10⁵ células/placa de 3.5 cm de diámetro.

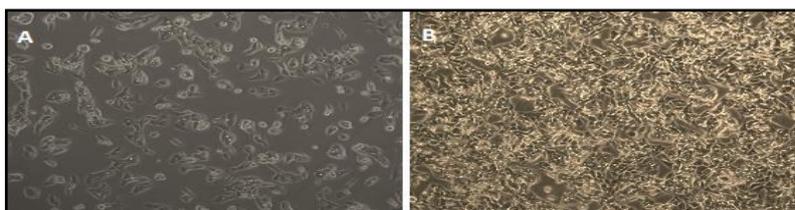


Figura 2.15. A) Cultivo de células HepG2 a baja densidad. B) Cultivo de células HepG2 a alta densidad.

Metodología

Para el estudio *in vitro* se seleccionaron 25 compuestos (**Tabla 2.3**) clasificados como esteatósicos o no esteatósicos en base a la información disponible en la literatura [121-123,234-236]. Las soluciones stock de los compuestos se prepararon en DMSO y se diluyeron en medio de cultivo recién preparado hasta obtener la concentración final deseada. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo fue $\leq 0.5\%$. Sólo fueron utilizadas concentraciones de los compuestos que no producían muerte celular (**Tabla 2.3**) [33-38]. Cada fármaco y concentración se ensayó por duplicado.

Antes de iniciar los tratamientos con los compuestos a estudiar y con el fin de favorecer y acelerar la acumulación intracelular de lípidos y el desarrollo del daño esteatósicos, las células HepG2 se incubaron durante 14 h con una mezcla de oleato y palmitato 62 μM (2:1) en medio de cultivo. Previamente se había descrito que este procedimiento favorece y acelera la acumulación intracelular de lípidos y el desarrollo del daño esteatósico inducido por fármacos en las células HepG2 [121]. A continuación, las células se trataron con los compuestos seleccionados durante 24 h en un medio libre de ácidos grasos (AG) [39,32]. Después de la incubación, las células se procesaron mediante las plataformas LC-MS y GC-MS de acuerdo con los procedimientos descritos en el **punto 2.8.2**.

2.8.1.2 Células HepaRG

Las células HepaRG corresponden a una línea celular de origen humano obtenida a partir de un carcinoma de hígado. Estas células presentan la singularidad de que cuando se diferencian en cultivo exhiben muchas de las características de los hepatocitos humanos primarios, incluyendo la morfología y las funciones bioquímicas y de metabolización de fármacos (**Figura 2.16**). Debido a sus características

Metodología

estas células se han empleado en los últimos años en numerosos estudios de hepatotoxicidad [237-241].

Tabla 2.3. Compuestos y concentraciones utilizadas en el estudio no dirigido de hepatotoxicidad con células HepG2.

Clasificación	Compuesto	Concentración
No esteatosis	Medio de cultivo sin AG	
	Medio de cultivo con AG	
	Control DMSO	0.5%
	Amitriptilina	25, 50 μM
	Citrato	250, 500 μM
	Buspirona	125, 250 μM
	Gentamicina	750, 1500 μM
	Sorbitol	500, 1000 μM
	Ketotifeno	37.5, 75 μM
	Clorpromazina	10, 20 μM
	Amikacina	5, 10 μM
	Simvastatina	12.5, 25 μM
	Clozapina	15, 30 μM
	Tilorona	2.5, 5 μM
	Maprotilina	7.5, 15 μM
Esteatosis	Acetilsalicílico	1, 2 mM
	Amiodarona	12.5, 25 μM
	Ciclosporina	12.5, 25 μM
	Doxiciclina	250, 500 μM
	Fungizona	2.5, 5, 7.5 $\mu\text{g/mL}$
	Tamoxifen	10, 20 μM
	Metotrexato	100, 200 μM
	Tetracilina	200, 400 μM
	Tianeptina	500, 1000 μM
	Zidovudina	200, 400 μM
	Valproato	4, 8 mM
	Irinotecan	10, 20 μM
	Ibuprofeno	1, 2 mM

Metodología

Las células HepaRG no diferenciadas (Biopredic International, Rennes, France) se cultivaron de forma rutinaria en frascos de cultivo a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂/95% en medio Williams' E complementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 IU/ml, estreptomycin 10 µg/ml, insulina 5 µg/ml e hidrocortisona 5 µM y se subcultivaron cada dos semanas mediante tripsinización (0,25% de tripsina/0,02% de EDTA a 37 °C). Para los estudios metabonómicos, las células se sembraron a una densidad de 2×10^5 células/placa de 3.5 cm de diámetro y se cultivaron en el medio estándar durante 15 días. A continuación las células se cultivaron durante otros 15 días en medio de diferenciación (medio estándar con 2% de DMSO). Durante todo el proceso de cultivo el medio se renovó cada 3 días.

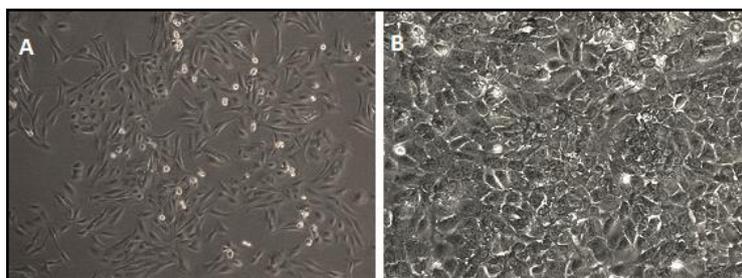


Figura 2.16. A) Células HepaRG sin diferenciar. B) Células HepaRG diferenciadas.

Para el estudio no dirigido *in vitro* en la línea celular HepaRG solamente se empleó la plataforma GC-MS. Los compuestos y las concentraciones ensayados se indican en la **Tabla 2.4**. Las soluciones stock de los compuestos en estudio se prepararon en DMSO y se diluyeron en medio de diferenciación recién preparado hasta obtener la concentración final deseada. Los tratamientos con los fármacos se realizaron tanto en células pre-incubadas durante 14 h con oleato y palmitato 62 µM (2:1) como en células mantenidas en medio control con el objetivo de comprobar el posible efecto de la recarga lipídica previa

Metodología

sobre la respuesta de las células HepaRG a los compuestos esteatósicos, tal y como ocurre en las células HepG2. En todos los casos las células se trataron durante 24 h con los fármacos y a continuación las células se procesaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el **punto 2.8.2.**

Tabla 2.4. Hepatotoxinas y concentraciones incluidas en el estudio no dirigido de hepatotoxicidad con células HepaRG.

Clasificación	Compuesto	Concentración
No esteatosis	Medio de cultivo sin AG	-
	Control DMSO	2%
	Amitriptilina	50 μ M
	Citrato	500, 1000 μ M
	Gentamicina	1500 μ M
	Sorbitol	1000 μ M
	Ketotifeno	75 μ M
	Clorpromazina	20 μ M
	Amikacina	5 μ M
	Clozapina	30 μ M
	Tilorone	5 μ M
	Maprotilina	15 μ M
Esteatosis	Acetilsalicílico	2 mM
	Amiodarona	25 μ M
	Ciclosporina	25 μ M
	Doxiciclina	250, 500 μ M
	Tamoxifen	20 μ M
	Metotrexato	200 μ M
	Tetracilina	200, 400 μ M
	Tianeptine	1000 μ M
	Zidovudina	400 μ M
	Valproato	4, 8 mM
	Ibuprofeno	2 mM

Metodología

2.8.1.3 Hepatocitos humanos

Se utilizaron hepatocitos aislados de biopsia hepática humana de pequeño tamaño (2-5g) mediante perfusión con colagenasa [242]. Una vez aislados del tejido los hepatocitos se sembraron en placas de 3.5 cm (7.5×10^5 células/placa) recubiertas con fibronectina/colágeno tipo I (Sigma-Aldrich, Madrid) y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada (5% de CO₂/95% de aire) [109,243-255] (**Figura 2.17**). El medio de cultivo utilizado fue Ham's F-12/Williams (1:1) (Gibco BRL, Paisley, UK) complementado con suero de ternera al 2%, antibióticos (penicilina 50 mU/ml, estreptomycin 50 µg/ml), albúmina sérica bovina 0.1%, insulina 10 nM, transferrina 25 µg/ml, etanolamina 0.64 mM, ácido linoléico 7.2 µM, glucosa 17.5 mM y ácido ascórbico 6.14 mM. El medio de cultivo se cambió 1 h más tarde para eliminar las células no adheridas y a las 24 h se reemplazó con el mismo medio sin suero y con dexametasona 10 nM [256].

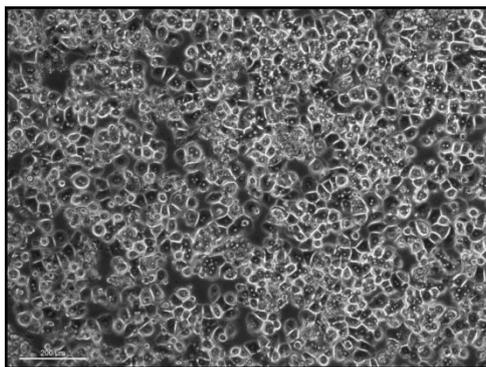


Figura 2.17. Hepatocitos humanos en cultivo primario.

Para el estudio no dirigido de esteatosis inducida por fármacos en hepatocitos humanos se utilizó la plataforma LC-MS. Para dicho estudio se seleccionaron 12 compuestos (**Tabla 2.5**) en base a la información disponible en la literatura [121-123,234-236]. Cada fármaco y

Metodología

concentración se ensayó por duplicado. Las soluciones stock de los compuestos se prepararon en DMSO y se diluyeron en medio de cultivo recién preparado hasta obtener la concentración final deseada.

Tras una pre-incubación de 14 h con una mezcla de oleato y palmitato (ver apartado 2.7.1.1), las células se trataron durante 24 h con los compuestos de ensayo en un medio libre de ácidos grasos y finalmente se procesaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el **punto 2.8.2.**

Tabla 2.5. Compuestos y concentraciones utilizadas en el estudio no dirigido de hepatotoxicidad con hepatocitos humanos.

Clasificación	Compuesto	Concentración
No esteatosis	Control DMSO	0.5%
	Amitriptilina	50 μ M
	Citrato	500 μ M
	Clozapina	30 μ M
	Ketotifeno	75 μ M
	Clorpromacina	20 μ M
Esteatosis	Acetilsalicílico	2 mM
	Doxiciclina	500 μ M
	Metotrexato	200 μ M
	Tetracilina	400 μ M
	Tamoxifen	20 μ M
	Valproato	8 mM
	Ciclosporina	25 μ M

2.8.1.4 Hepatocitos de rata

Se utilizaron hepatocitos de rata obtenidos mediante perfusión *in situ* del hígado con colagenasa [257]. Las células recién aisladas se sembraron en placas de 3.5 cm (7.5×10^5 células/placa) recubiertas con fibronectina/colágeno tipo I) y se cultivaron utilizando el mismo procedimiento que para los hepatocitos humanos (ver 2.7.1.3).

Tras 24 h de cultivo, los hepatocitos se trataron con cumene hidroperóxido 500 μ M durante 24h, un compuesto con reconocida

Metodología

capacidad para producir estrés oxidativo a nivel celular [258-261]. La solución stock del compuesto en estudio se preparó en DMSO y se diluyó en medio de cultivo recién preparado hasta obtener la concentración final deseada. El ensayo se realizó por sextuplicado. Para el estudio dirigido de marcadores de estrés oxidativo en hepatocitos de rata solamente se empleó la plataforma LC-MS. Tras el tratamiento se recogió el medio de cultivo y las células y finalmente se procesaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el **punto 2.7.4**.

2.8.2 Procesamiento de muestras

Tras los diferentes tratamientos, el medio de cultivo se retiró por aspiración, y la monocapa celular se lavó con PBS. A continuación, las monocapas de células se congelaron mediante la adición de N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento posterior. El análisis dirigido de biomarcadores de estrés oxidativo se realizó también en el sobrenadante de cultivo (medio extracelular). En este caso, y tras los tratamientos con los inductores de estrés oxidativo, el medio de cultivo se recogió por aspiración e inmediatamente después se centrifugó (5 min, 3.000g) para eliminar restos celulares y se conservó a -80°C hasta su procesamiento (ver **apartado 2.7.4**).

2.8.2.1 Análisis no dirigido LC-MS

El procesamiento y análisis de las muestras utilizado para la plataforma LC-MS se basó en la aproximación lipidómica-RP adaptada de la referencia [209].

Las células se rascaron con 400 μ L de tampón fosfato salino (PBS) que contenía 0.375 μ g/mL de reserpina como PI. El extracto celular se trasvasó a un tubo eppendorf limpio de 2 mL. Los posibles restos celulares se recuperaron añadiendo otros 200 μ L de la solución de PBS

Metodología

con PI y se juntó con el volumen anterior. La suspensión celular obtenida fue sometida a 3 ciclos de congelación/descongelación (N_2 líquido/temperatura ambiente) para favorecer la lisis celular y la extracción de metabolitos. Una alícuota de 50 μ L se mezcló con 100 μ L de NaOH 0.66 N para la determinación posterior de proteína. Al resto del volumen se le añadió 1100 μ L de una disolución de metanol:cloroformo (1:2) que contenía 0.01 μ g/mL de terfenadina como PI. Tras 3 ciclos de vortex (3x10s), las muestras se incubaron durante 20 min a -20°C , centrifugando posteriormente durante 10 min a 10.000 g y 4°C . La fase orgánica inferior se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se volvió a extraer la fase acuosa con 1100 μ L de la disolución de metanol:cloroformo (1:2) con terfenadina y la fase orgánica inferior se juntó con la recogida anteriormente. Por último, 1 mL de la mezcla se evaporó a sequedad en el speedvac y el residuo seco se guardó a -80°C hasta su análisis.

El residuo seco se resuspendió en 75 μ L de una disolución de metanol:cloroformo (3:1) que contenía 0.5 μ g/mL de verapamil y 4 μ g/mL de LCD-d4 como PI y se analizó utilizando la aproximación lipidómico-RP en modo ESI(+) con las condiciones indicadas en la **sección 2.3.2**.

2.8.2.2 Análisis no dirigido GC-MS

El procesamiento y análisis de las muestras utilizado para la plataforma GC-MS se basó en el protocolo Fiehn de Agilent [210].

Se añadieron 500 μ L de metanol frío a cada pocillo de cultivo y se incubó durante 5 min a -20°C . Las células se recogieron en este volumen y la suspensión celular se trasvasó a tubos eppendorf limpios. Se añadió otros 500 μ L de metanol frío a cada pocillo para recuperar los posibles restos y se juntó con el volumen anterior. La suspensión celular obtenida fue sometida a 3 ciclos de congelación/descongelación (N_2 líquido/temperatura ambiente) para favorecer la lisis celular y la extracción de metabolitos. Tras agitar en vortex y centrifugar (10 min, 10.000 g, 4°C),

Metodología

el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf limpio y las muestras se trataron siguiendo el protocolo Fiehn que constaba de 3 etapas: preparación del extracto biológico, etapa de metoxiaminación y etapa de trimetilsililación. A cada uno de los sobrenadantes se le añadieron 5 μ L de una disolución de ácido mirístico-d₂₇ 0.3 mg/mL preparada en agua:metanol:isopropanol 2:5:2 (v/v/v) como PI. Tras evaporación a sequedad, el residuo seco se resuspendió 5 μ L de una disolución de metil estearato 0.25 mg/mL preparada en cloroformo como PI (preparación del extracto biológico). A continuación se añadió 20 μ L de metoxiamina hidrociorada 20 mg/mL preparada en piridina, se agitó en vortex y se incubó a 30°C con agitación suave durante 90 min (etapa de metoxiaminación). Finalmente se añadió 90 μ L de una disolución de N-metil-N-trimetiltrifluoroacetamida con 1% de trimetilclorosilano (MSTFA + 1% TMCS), se agitó en vortex y se incubó agitando suavemente a 37°C durante 30 min (etapa de trimetilsililación).

Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se analizaron utilizando las condiciones indicadas en la **sección 2.4**.

2.9 Estudios *in vivo* en ratas

2.9.1 Tratamiento de los animales y diseño experimental

Se utilizaron ratas OFA macho de seis semanas de edad (200-240 g) de Charles River (Barcelona, España) (**Figura 2.18**) aclimatadas a las condiciones del laboratorio durante al menos 7 días. Los animales fueron alojados en jaulas de dos en dos en una habitación mantenida a 21-25 °C, 30-70% de humedad y un ciclo de luz-oscuridad de 12 h. A cada animal se le permitía el libre acceso al agua y la dieta. Todas las manipulaciones se realizaron de acuerdo a la normativa vigente sobre el uso de animales de experimentación y los procedimientos utilizados

Metodología

fueron aprobados previamente por el comité de evaluación ética y bienestar animal de la institución.



Figura 2.18. Rata OFA

Tratamiento con tetraciclina y dieta esteatósica

Se utilizaron 32 animales distribuidos en 4 grupos: 1) - Dieta control; 2) Dieta hipercalórica; 3) Dieta control + tetraciclina; y 4) Dieta hipercalórica + tetraciclina.

La duración total del procedimiento fue de 4 semanas. A lo largo de todo el experimento se realizaron exploraciones físicas del animal y observaciones de su comportamiento y se controló el peso del animal y del alimento ingerido. Según el grupo de tratamiento, las ratas fueron alimentadas *ad libitum* durante este periodo con una dieta estándar de mantenimiento (dieta control) o con una dieta hipercalórica. Como dieta control se utilizó la Dieta Teklad global rodent diet 2016 (Teklad Harlan, Barcelona, España) de 3kcal/g y un contenido aproximado del 16% de proteína, 4% de grasa y bajo o nulo contenido en colesterol. Como alternativa se utilizó la dieta hipercalórica rica en grasas (equivalente en su composición a la conocida como “western diet”) Teklad TD.88137 (Teklad Harlan, Barcelona, España) de 4,5 kcal/g y que contenía aproximadamente 17% de proteína, 20% de grasa, 0,2% de colesterol. Los cuatro días antes de su sacrificio, las ratas fueron tratadas con

Metodología

tetraciclina (2g/Kg/día) o vehículo (metilcelulosa 0.5%) administrados oralmente como una única dosis diaria. Los animales se sacrificaron 24 h después de la última administración del fármaco/vehículo.

Tratamiento con paracetamol

Se utilizaron 16 animales distribuidos en 2 grupos: 1) Control y 2) Tratamiento con paracetamol. Las ratas fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta estándar de mantenimiento. A los animales tratados con paracetamol se les administró oralmente durante dos días consecutivos una dosis 1g/Kg/día del fármaco disuelto en metilcelulosa al 0.5%. Los animales control recibieron un tratamiento equivalente con el vehículo (metilcelulosa 0.5%). Los animales fueron sacrificados 24 h después de la última administración del fármaco/vehículo.

Las ratas se sacrificaron tras anestesia con tiobarbital sódico (0,1g/kg). La sangre se recogió por punción cardiaca y tras la coagulación y centrifugación (1.000 g durante 10 min a 4 °C), las muestras de suero se alicuotaron y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis por LC-MS y GC-MS. Una alícuota se utilizó para obtener la bioquímica sérica y la actividad enzimática utilizando los procedimientos estándar del laboratorio. Tras extraer el hígado y enjuagarlo con PBS, se dividió en pequeñas porciones que se congelaron inmediatamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el análisis.

2.9.2 Procesamiento de muestras

Tras los diferentes tratamientos, las muestras de suero y tejido hepático se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento posterior. El análisis dirigido de biomarcadores de estrés oxidativo se realizó solamente en las muestras del estudio con paracetamol (ver **apartado 2.7.4**).

Metodología

2.9.2.1 Análisis no dirigido LC-MS

Muestras de tejido hepático

Se pesaron aproximadamente 100 mg de tejido congelado de cada muestra en un tubo *Precellys* de 2 mL que contenía bolas cerámicas CK14. Por cada 1g de tejido, se añadieron 5.25 mL de una mezcla metanol:agua (4:1.25) que contenía reserpina (2.5 µg/mL) y sulfadimetoxina (1 µg/mL) como PI. El tejido se homogeneizó dos veces durante 25 s a 6.500 rpm a 4 °C en un sistema dual *Precellys* 24. Después de la centrifugación (10.000 g, 5 min, 4 °C), el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Se realizó una segunda extracción con 5.25 mL/g de tejido de la disolución anterior para recoger posibles restos que quedasen en el tubo. Se juntó con el volumen anteriormente recogido, se centrifugó (10 min a 10.000 g, 4 °C) y se pasó el sobrenadante limpio a un nuevo tubo. Por último, se almacenó a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

Una alícuota de 100 µL del extracto anterior se transfirió a un tubo limpio y se evaporó hasta sequedad utilizando el *SpeedVac*. El residuo seco se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Una vez descongelado el residuo se resuspendió en 100 µL de agua:metanol (1:1) que contenía 0,5 µg/mL de verapamil y 5 µg/mL de terfenadina (para ESI+), y LCA-d4 2 µM y GCA-d4 1 µM (para ESI-) como PI. Después de centrifugar (10 min, 10000 g, 4 °C), el sobrenadante fue transferido a una placa de 96 pocillos y se analizó por LC-MS utilizando las condiciones de análisis genérico-RP en modo ESI (+) y ESI (-) (**Sección 2.3.1**).

Otra alícuota de 100 µL del extracto se transfirió a un tubo limpio y se evaporó hasta sequedad utilizando el *SpeedVac*. El residuo seco se almacenó a -80 °C hasta su análisis. El residuo se resuspendió en 100 µL de acetonitrilo:agua (70:30) que contenía 40 µg/mL de Phe-D5, 20 µg/mL de 8-BrAMP y 10 µg/mL de Val-Tyr-Val como PI y se analizó

Metodología

utilizando la aproximación HILIC en ambos modos, ESI (+) y ESI (-) (**Sección 2.3.3**).

Por otro lado, otra muestra de tejido congelado de aproximadamente 5-10 mg se colocó en un tubo *Precellys* de 2 mL que contenía bolas cerámicas CK14. Por cada 5 mg de tejido, se añadieron 200 μ L de PBS que contenía rifampicina 5 μ g/mL como PI. El tejido se homogeneizó dos veces (25 s, 6.500 rpm, 4 °C) en un sistema dual *Precellys 24* y tras centrifugación (10.000 g, 5 min, 4 °C), el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Por cada 5 mg de tejido se añadieron 500 μ L de una disolución de cloroformo:metanol (2:1) y se vorteoó (3x30s). Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min y se centrifugó (10 min, 10.000 g, 4 °C). Se transfirió la fase orgánica (inferior) a un nuevo tubo limpio. Por último, se almacenó a -80 °C hasta su posterior procesamiento. A una alícuota de 100 μ L se le añadieron 10 μ L de una disolución de metanol que contenía terfenadina 0.25 μ g/mL como PI y se analizó utilizando la aproximación lipídica-RP en modo ESI (+) (**Sección 2.3.2**).

Muestras de suero

Para el análisis genérico-RP, se mezcló una alícuota de 50 μ L de suero con 150 μ L de metanol frío que contenía reserpina (0,8 μ g/mL) y sulfadimetoxina (0,3 μ g/mL) como PI. Después de agitar en vórtex (3x10s), las muestras se dejaron en reposo a -20 °C durante 30 min y se centrifugaron (10 min, 10.000 g, 4 °C). El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y se evaporó a sequedad. El residuo seco se almacenó a -80 °C hasta su análisis. El residuo se resuspendió en 50 μ L de agua:metanol (1:1) que contenía 0,5 μ g/mL de verapamil y 5 μ g/mL de terfenadina (para ESI+), y LCA-d4 2 μ M y GCA-d4 1 μ M (para ESI-) como PI. Después de la centrifugación (10 min, 10.000 g, 4 °C), el sobrenadante fue transferido a una placa de HPLC de 96 pocillos y se

Metodología

analizó usando las condiciones de análisis genérico-RP en modo ESI (+) y ESI (-) (**Sección 2.3.1**).

Para el análisis lipidómico-RP, una alícuota de 10 μL de suero se mezcló con 40 μL de PBS que contenía 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rifampicina como PI. Se añadieron 250 μL de una disolución de cloroformo:metanol y se agitó en vórtex (3x30s). Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 min y se centrifugaron (10 min, 10.000 g, 4 °C). Una alícuota de 100 μL de la fase orgánica inferior se transfirió a una placa HPLC de 96 pocillos y se añadieron 10 μL de una disolución de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de terfenadina en metanol como PI. El análisis se realizó utilizando la aproximación lipidómica-RP en modo ESI (+) (**Sección 2.3.2**).

2.9.2.2 Análisis no dirigido GC-MS

Muestras de tejido hepático

El procesamiento y análisis de las muestras de tejido hepático para la plataforma GC-MS se basó en el protocolo Fiehn de Agilent [210] y la referencia [262].

Se pesaron aproximadamente 100 mg de tejido congelado de cada muestra en un tubo *Precellys* de 2 ml que contenía bolas cerámicas CK14. Por cada 100 mg de tejido se añadieron 500 μL de una disolución de cloroformo:metanol:agua (1:2:1, v/v/v) y se agitó en vortex durante 10 s. Se homogeneizaron las muestras por duplicado durante 25 segundos a 6500 rpm y 4 °C en un sistema dual *Precellys* 24. Se centrifugó durante 5 min a 10.000 g y 4 °C y se pasó el sobrenadante a un tubo limpio. Se procedió a una segunda extracción con 500 μL de la disolución de cloroformo:metanol:agua por cada 100 mg de tejido como en el paso anterior y el sobrenadante se pasó a otro tubo limpio diferente. Finalmente los extractos se congelaron a -80 °C hasta su procesamiento.

Se cogieron 150 μL de cada uno de los dos extractos y se llevaron a un mismo tubo para proceder con el método Fiehn explicado en la **sección**

Metodología

2.8.2.2. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se analizaron utilizando las condiciones indicadas en la **sección 2.4**.

Muestras de suero

El procesamiento y análisis de las muestras de suero para la plataforma GC-MS se basó en el protocolo Fiehn de Agilent [210].

Se cogieron 200 μ L de suero y se añadieron 600 μ L de metanol frío. Se dejaron incubar las muestras durante 15 min a -20 °C, se agitó en vortex durante 10 s y se centrifugaron durante 10 min a 10.000 g y 4 °C. Finalmente se pasó el sobrenadante a un tubo limpio para proceder con el método Fiehn explicado en la **sección 2.8.2.2**. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se analizaron utilizando las condiciones indicadas en la **sección 2.4**.

2.10 Estudios en muestras humanas

En todos los casos las muestras de tejido hepático y de sangre fueron recogidas por personal cualificado del centro correspondiente. Las muestras de tejido hepático se obtuvieron del Banco de Hígados del Hospital La Fe (UHE-LAFE/CIBERehd, Valencia, España) y las muestras de sangre de la Unidad de Hepatología y Transplante Hepático del Hospital La Fe. El suero, obtenido mediante coagulación a temperatura ambiente y centrifugación, y las muestras de hígado, se congelaron a -80 °C hasta su procesamiento. Todas las muestras se recogieron mediante consentimiento informado y previa aprobación del comité ético.

2.10.1 Análisis no dirigido GC-MS

Se recogieron sueros de 10 pacientes diagnosticados con EHNA, mediante biopsia hepática y scan, y de 10 sujetos sanos (grupo control)

Metodología

con el objetivo de observar las diferencias metabólicas entre ambos grupos.

Se realizó un análisis no dirigido de las muestras por la plataforma GC-MS en base al protocolo Fiehn de Agilent [210]. A 200 μ L de suero se añadieron 600 μ L de metanol frío. Tras mantener las muestras durante 15 min a -20 °C, se agitaron en vortex durante 10 s y se centrifugaron (10 min, 10.000 g, 4 °C). Finalmente se pasó el sobrenadante a un tubo limpio para proceder con el método Fiehn explicado en la **sección 2.8.2.2**. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se analizaron utilizando las condiciones indicadas en la **sección 2.4**.

2.10.2 Análisis no dirigido LC-MS

Se recogieron sueros de 48 pacientes diagnosticados con distintos grados de EHNA y de 15 sujetos sanos (grupo control) con el objetivo de observar las diferencias metabólicas entre ambos grupos.

Para la clasificación de los pacientes se usó el sistema de Kleiner [51], método más usado y aceptado a nivel global para la graduación de la EHGNA. Dicho método tiene en cuenta el grado de esteatosis, inflamación lobulillar y balonización del tejido para obtener un valor que determine si la muestra es considerada como No EHNA, Intermedia o EHNA (**Figura 2.19**).

Metodología

Grado de esteatosis (0-3)	Inflamación lobulillar (0-3)	Balonización (0-2)
0: < 5 %	0: Ninguna	0: Nada
1: 5-33 %	1: Leve	1: Poca
2: 34-66 %	2: Moderada	2: Mucha/Destacada
3: > 66 %	3: Marcada	

The diagram illustrates the classification of the NAS score. A box labeled "Puntuación NAS" has a red arrow pointing to a larger box containing three categories: "0 - 2 No NASH", "3 - 4 Indeterminado", and "5 - 8 NASH".

Figura 2.19. Clasificación de Kleiner para el grado de NAS obtenido como suma de los valores de esteatosis, inflamación lobulillar y balonización.

Las muestras se analizaron siguiendo la metodología y bajo las condiciones RP e HILIC indicadas en la **sección 2.3**.

2.10.3 Análisis dirigido de biomarcadores de estrés oxidativo

Se recogieron 33 muestras de tejido hepático clasificadas como EHNA (n=16) y control (n=17) y 17 muestras de suero clasificadas como EHNA (n=10) y control (n=7). El diagnóstico de la EHNA se realizó mediante biopsia hepática y scan. Para llevar a cabo el análisis dirigido de biomarcadores de estrés oxidativo, las muestras se procesaron de acuerdo con los procedimientos descritos en la **sección 2.7.4**.

Metodología

2.10.4 Estudio del ácido oftálmico como nuevo biomarcador sérico para el diagnóstico de EHNA

Realizamos dos estudios en paralelo: i) *Cohorte 1*: pacientes sin obesidad mórbida y con diferentes grados de EHNA y ii) *Cohorte 2*: pacientes con obesidad mórbida que presentaban distintos grados de EHNA (**Tabla 2.6**).

Tabla 2.6. Muestras de suero humano analizadas para la determinación de ácido oftálmico en la cohorte 1 y cohorte 2.

Clasificación	Nº de muestras cohorte 1	Nº de muestras cohorte 2
Control	14	19
No EHNA (NAS 0-2)	8	23
Indeterminado (NAS 3-4)	12	28
EHNA (NAS 5-8)	21	15

Todas las muestras de suero se analizaron y procesaron según el protocolo de estrés oxidativo descrito en la **sección 2.7.4** [70].

3. Resultados

Resultados

3.1 Estrategias para asegurar la calidad del análisis metabolómico no dirigido

La principal premisa en un estudio metabolómico es que los niveles de metabolitos detectados reflejen el estado biológico del sistema bajo estudio. Con el fin de asegurar el cumplimiento de esta premisa, se implantó una estrategia para asegurar la calidad en la preparación y el análisis de las muestras, así como para asegurar la calidad de los resultados obtenidos y minimizar y detectar cualquier fuente de variación no relacionada con la naturaleza biológica de las muestras [189,213]. Esto se ha conseguido mediante la adición de PI a las muestras problema, la inclusión de QC de muestras (pools de muestra) y blancos de muestras, un diseño cuidadoso del proceso de adquisición de las muestras y una minuciosa limpieza y mantenimiento del equipo antes y después de cada uno de los análisis.

Se incorporaron diferentes PI a las muestras en diferentes etapas del procesado de las muestras, por ejemplo durante la homogenización y preparación de las muestras en el análisis LC-MS, o durante la preparación y derivatización de las muestras en GC-MS. Estos PI tienen una doble función, por un lado los niveles de PI son usados para evaluar la eficiencia en la extracción del metaboloma y para cuantificar una posible pérdida de muestra durante el procesado de la misma, por otro lado, el PI también sirve para supervisar, dentro de las muestras problema, la robustez del análisis con respecto a los aspectos de la cromatografía (RT y forma del pico) y la detección (exactitud de la masa y área del pico). En el apartado de *Metodología* se proporciona información detallada sobre los PI empleados en cada tipo de muestra y condición analítica.

Los blancos de muestras fueron procesados como las muestras problema, pero sin adicionar matriz biológica. El objetivo es detectar cualquier ión contaminante proveniente del procesado de muestras o del

Resultados

análisis de las mismas. Los QC de las muestras se obtuvieron haciendo un pool de las muestras que se iban a analizar y se usaron para asegurar un correcto funcionamiento del equipo y del análisis.

También se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones a la hora de analizar cada bloque o cola de muestras: i) Como la exactitud de la masa y la reproducibilidad de la respuesta puede verse comprometida por tiempos de análisis largos, el tiempo total de análisis para cada bloque de muestras se limitó a 48h para análisis LC-MS y a 24h para análisis GC-MS, debido a que la estabilidad de las muestras derivatizadas era menor [263,264]; ii) Los QC de muestras se inyectaron 6 veces antes de empezar el análisis de las muestras en análisis LC-MS y 5 veces en análisis GC-MS, tanto para acondicionar la columna como para verificar el correcto funcionamiento del equipo; iii) Los QC y los blancos se intercalaron en la cola de muestra de la siguiente manera: 1 QC cada 15 muestras problema y 1 blanco cada 10 muestras problema para análisis LC-MS y 1 QC cada 5 muestras problema y 1 blanco cada 10 muestras problemas para análisis GC-MS; iv) Las muestras fueron analizadas en orden aleatorio pero divididas en bloques representativos (por ejemplo, bloques con el mismo número de muestras pertenecientes a las diferentes clases) [265]; y v) Al finalizar la cola de muestras se analizaba un blanco y un QC por duplicado. El diseño de análisis de la cola de muestras esta ejemplificado en la **Figura 3.1**.

Para testar el funcionamiento del espectrómetro, se calculó la RSD del RT, área del pico y exactitud de la masa de cada uno de los PI tanto en las muestras problema como en los QC. Los valores de RSD permitidos para el área de pico y el tiempo de retención fueron del 15% y 1% respectivamente, mientras que el error de masa permitido fue del 5 ppm. Estos criterios fueron seleccionados siguiendo el criterio descrito por la guía para la industria de la FDA para la validación de métodos bioanalíticos [228]. Además, el funcionamiento analítico también se evaluó mediante PCA.

Resultados

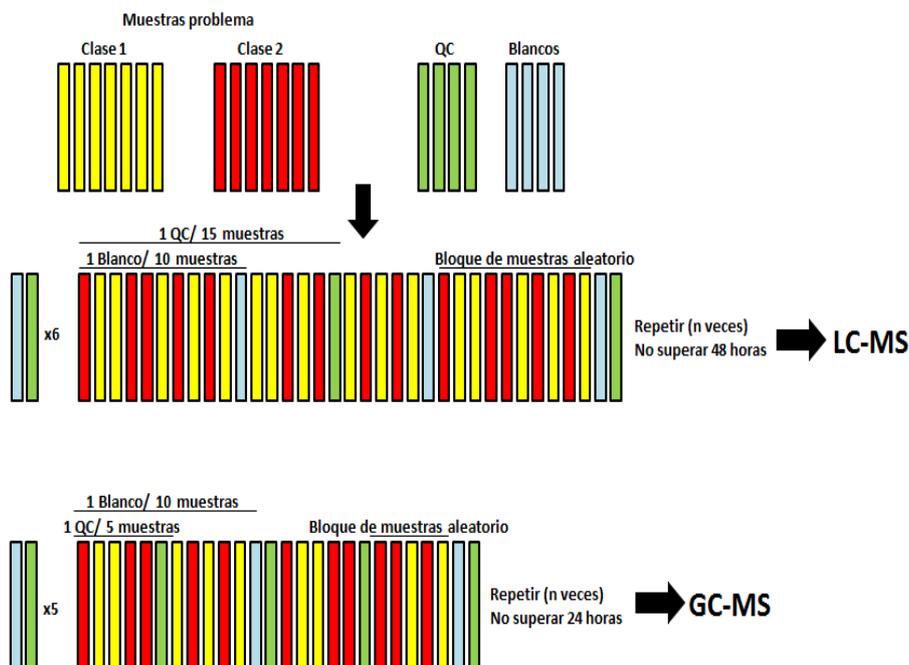


Figura 3.1. Ejemplo de una cola de análisis de muestras para el estudio metabólico no dirigido en LC-MS y GC-MS. Las muestras problema están distribuidas en bloques representativos y puestas de forma aleatoria. Los QC y los blancos están intercalados durante toda la cola de muestras.

Las muestras agrupadas de manera conjunta tienen un patrón metabólico (variables) más similar que las que están más separadas. Por tanto, todas las muestras pertenecientes a una misma clase (muestras problema, QC, blancos...) deben estar supuestamente agrupadas y separadas de las muestras pertenecientes a otras clases. Esto quiere decir pues, que una correcta agrupación de las muestras es indicativa de un buen funcionamiento del sistema UPLC-QToF/GC-QToF.

Para mostrar un ejemplo, la **Figura 3.2** muestra los valores del área, exactitud de masa y tiempo de retención para los PI sulfadimetoxina y reserpina, bajo las condiciones UPLC-MS de análisis genérico RP en ESI (+), para todas las muestras incluidas en un análisis de ejemplo. Todos los valores obtenidos están dentro de los valores de aceptación.

Resultados

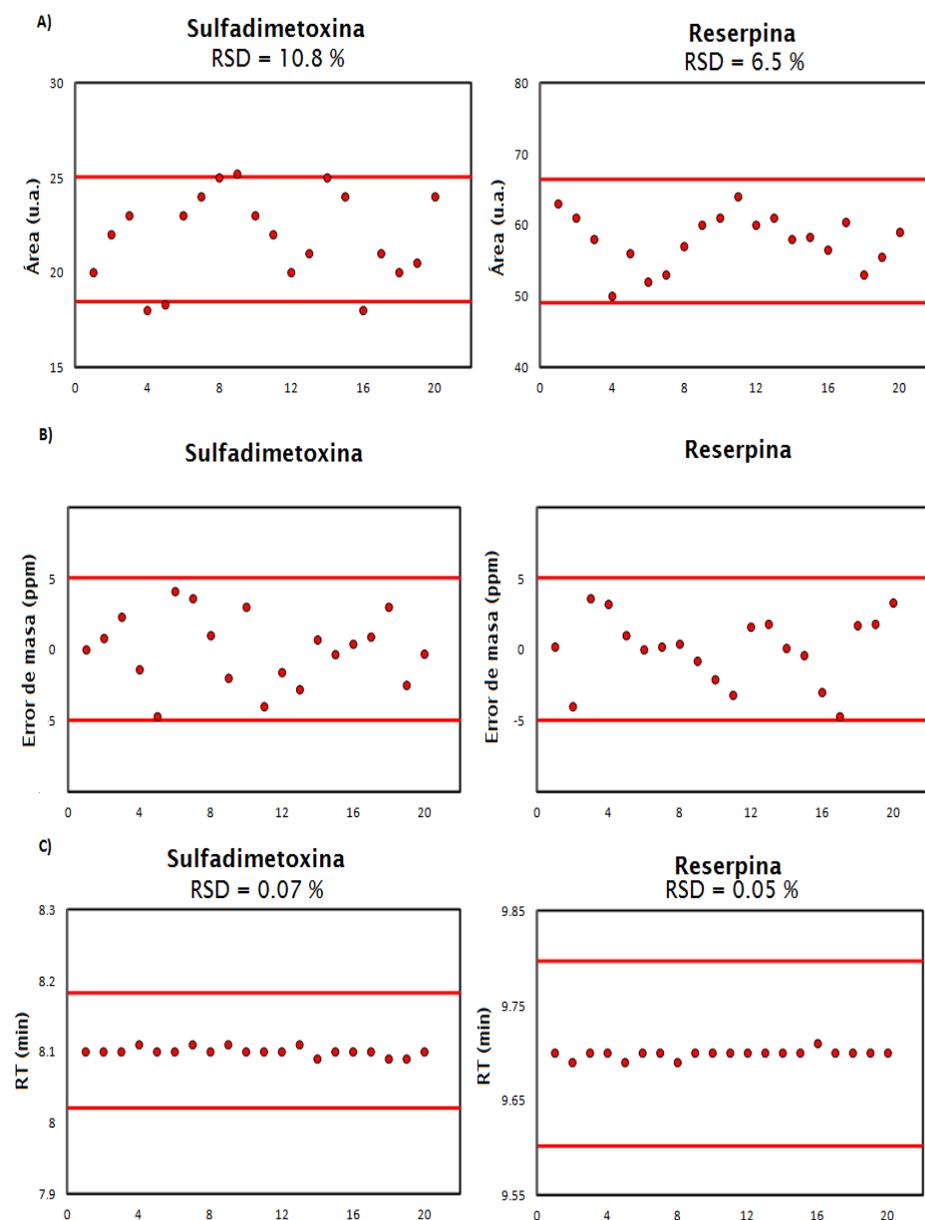


Figura 3.2. A) Área de pico, B) error de masa y C) tiempo de retención para los PI sulfadimetoxina y reserpina añadidos en las muestra problema. Cada diagrama muestra los valores para todas las muestras problema analizadas bajo las condiciones UPLC-MS de análisis genérico RP en ESI (+). Las líneas rojas indican el criterio de aceptación para cada parámetro: 15% de desviación para el área, 1% de desviación para el RT y 5 ppm para el error de masa.

Resultados

Para investigar la relación existente entre las distintas clases de muestras (muestras problema, QC y blancos), se llevó a cabo un PCA (**Figura 3.3**). Todas las muestras de una misma clase se agruparon conjuntamente y fueron separadas del otro tipo de muestras, indicando un buen funcionamiento del sistema durante el análisis.

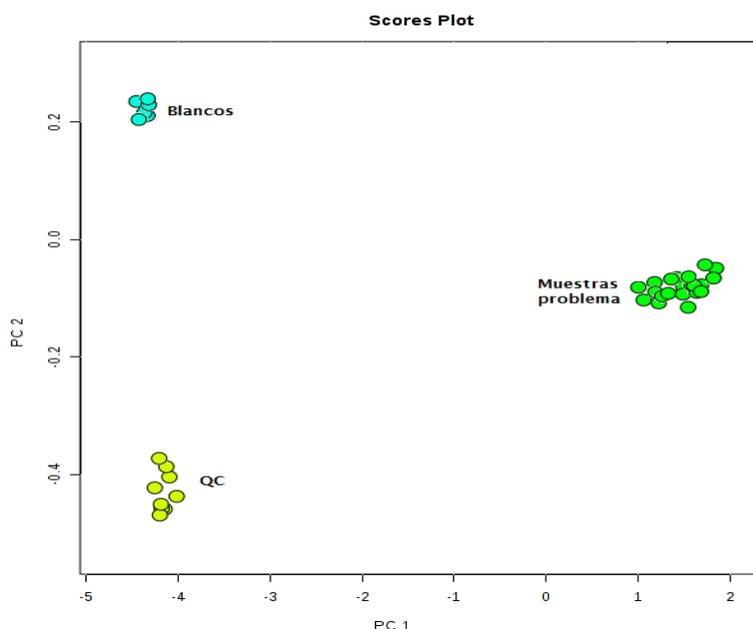


Figura 3.3. Diagrama de scores del PCA. Muestra la relación natural entre las diferentes clases de muestras (muestras problema, QC y blancos) incluidos en un análisis de ejemplo. Cada punto en el diagrama de scores representa toda la información proporcionada por las variables medidas. UPLC-MS de análisis genérico RP en ESI (+). Azul: Muestras problema; Verde: QC; Rojo: Blancos.

Esta estrategia, para asegurar la calidad del análisis, constituye un método sencillo para evaluar el funcionamiento del sistema antes, durante y después del proceso de adquisición de las muestras problema. El chequeo pre-inyección está diseñado para asegurar que el sistema se encuentra en unas condiciones óptimas antes de comenzar el análisis o al finalizar la preparación de las muestras problema. Todos los parámetros (área de pico de los PI, RT, simetría del pico, exactitud de

Resultados

masa, perfil global de los QC...) son chequeados durante la adquisición de las muestras. Por tanto, si se detecta un problema, puede detenerse el análisis y las muestras pueden ser almacenadas de manera adecuada, previniendo la inyección o degradación de las mismas. Finalmente, los chequeos post-inyección son la evaluación final previa al análisis de los datos, evitando una pérdida de tiempo en el procesado de muestras o bloques de análisis que no cumplen con los estándares de calidad. Además, la incorporación del análisis específico de los PI, es una herramienta de ayuda en la normalización de los datos analizados, ya que los niveles de PI reflejan las diferencias entre muestras relacionadas con aspectos como el volumen de inyección, pérdidas de volumen durante el procesado de muestras, detección de sensibilidad...[167].

Publicaciones recientes han resaltado la importancia de emplear estrategias para que aseguren la calidad en estudios metabolómicos por MS [167,208,263,266]. Las estrategias más comunes para verificar el correcto funcionamiento de los sistemas LC-MS y GC-MS incluyen el uso de QC y la adición de PI. Sin embargo, dichas estrategias están centradas en chequear el funcionamiento del sistema antes de empezar el análisis y una vez finalizado. La estrategia aquí descrita tiene el valor añadido de incluir un chequeo directo del instrumento, ya que los parámetros pueden ser evaluados durante la adquisición, que es especialmente importante cuando el tamaño de muestra es limitado, permitiendo prevenir el consumo o degradación de las muestras.

3.2 Estudios *In Vitro*. Esteatosis inducida por fármacos en modelos celulares

3.2.1 Células HepaRG

Las células HepaRG son un modelo muy prometedor para el estudio *in vitro* de los potenciales efectos tóxicos asociados a fármacos [124,125],

Resultados

por lo que decidimos utilizarlas como modelo para estudiar la esteatosis inducida por fármacos mediante aproximaciones metabolómicas. Dado que dichas células no habían sido utilizadas previamente con esta finalidad, planteamos un estudio exploratorio para el que se seleccionaron compuestos esteatósicos y no esteatósicos. Se testó una única concentración de los mismos (salvo algunas excepciones, donde se pudieron testar dos concentraciones). En todos los casos, se utilizaron concentraciones de fármacos que previamente se había comprobado que no afectaban a la viabilidad celular (por debajo de la IC10) [89,267]. Además se exploraron dos condiciones experimentales: i) células HepaRG preincubadas con oleato y palmitato (lo que llamaremos *con recarga lipídica (RL)*) y ii) células mantenidas en medio control (lo que llamaremos *sin recarga lipídica (sin RL)*). El objetivo era comprobar el posible efecto de dicha RL previa sobre la respuesta de las células HepaRG a los compuestos esteatósicos, tal y como ocurre en otro tipo de modelos celulares [233,268]. Para el análisis del perfil metabólico de dichas muestras se empleó la plataforma GC-MS.

En el estudio de la esteatosis inducida por fármacos en células HepaRG con RL se usaron 11 compuestos incluyendo fármacos esteatósicos y no esteatósicos: amitriptilina, citrato, sorbitol, ketotifeno y maproptilina como compuestos no esteatósicos; acetilsalicílico, doxiciclina, metotrexato, tetraciclina, tianeptina y valproato como compuestos esteatósicos. En el estudio en células HepaRG sin RL se usaron 20 compuestos incluyendo fármacos esteatósicos y no esteatósicos: amitriptilina, citrato, gentamicina, sorbitol, ketotifeno, clorpromazina, amikacina, clozapina, tilorona y maproptilina como compuestos no esteatósicos; acetilsalicílico, amiodarona, ciclosporina, doxiciclina, tamoxifen, metotrexato, tetraciclina, zidovudina, valproato e ibuprofeno como compuestos esteatósicos. El resumen de los compuestos y las concentraciones usadas para cada uno puede verse en la **Tabla 2.3**.

Resultados

El estudio por GC-MS permitió la detección de 103 variables (después de eliminar aquellas carentes de información) en las células recargadas lipídicamente, y 73 variables en las no recargadas. Por lo tanto, el número de variables detectadas aumentó al usar RL.

El análisis multivariante de estos datos por PLS-DA ofreció una separación evidente entre los dos grupos de muestras (compuestos esteatósicos y no esteatósicos) en el caso del estudio llevado a cabo con RL, sin ningún solapamiento entre las muestras usando sólo 2 CP. En el estudio sin RL la separación de grupos con 2 CP fue correcta aunque no tan evidente como en el caso de las muestras cargadas lipídicamente y fueron necesarios 3 CP para obtener una mejor separación (**Figura 3.4**).

El ajuste del modelo del modelo, se llevó a cabo mediante CV. R^2 indica lo bien que el modelo explica la varianza de los datos (bondad del ajuste) y Q^2 indica la capacidad predictiva del modelo (bondad de la predicción), siendo mejor cuanto más cerca de 1 tanto para R^2 como para Q^2 . En la **Tabla 3.1** pueden verse los valores obtenidos para estos parámetros, tanto para el modelo PLS-DA con 2 CP de las células HepaRG con RL como para el modelo PLS-DA con 3 CP de las células HepaRG sin RL. Pese a que en los dos casos los valores de R^2 son aceptables, los valores de Q^2 no son tan buenos. Sin embargo, con RL se observan mejores resultados (tanto para R^2 como para Q^2) en la CV. Por tanto, el modelo obtenido por PLS-DA es mejor cuando se usa RL en las células HepaRG, explicando mejor la variabilidad de las variables y siendo un modelo más predictivo.

Tras la identificación de los posibles marcadores (81 en las HepaRG con RL y 63 sin RL), empleamos el criterio $VIP > 1$ para seleccionar aquellas variables con mayor peso en el modelo y por tanto más discriminantes. Se seleccionaron 27 y 18 metabolitos, respectivamente, siendo comunes sólo 7 de ellos. En ambos casos estos compuestos fueron en su mayoría aminoácidos y ácidos orgánicos (**Tabla 3.2** y **Tabla 3.3**).

Resultados

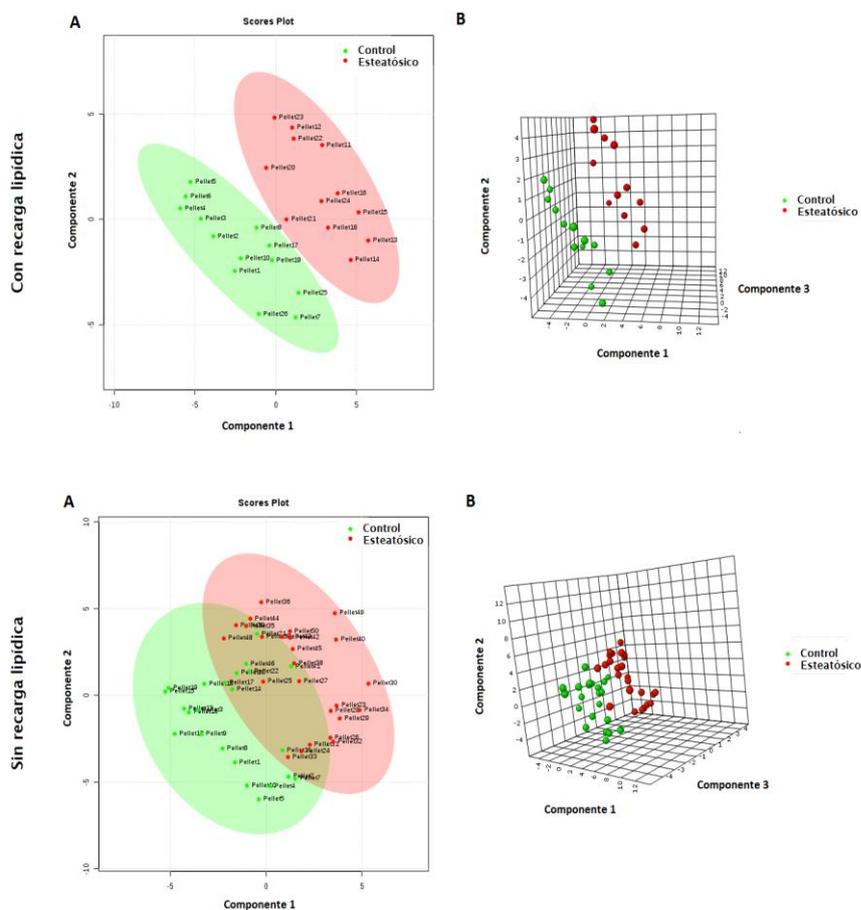


Figura 3.4. A) Diagrama de scores con dos componentes principales y B) con tres componentes principales del análisis PLS-DA realizado sobre las muestras de células HepaRG con recarga lipídica (superior) y sin recarga lipídica (inferior) analizadas por GC-MS. Verde: Muestras tratadas con fármacos control; Rojo: Muestras tratadas con fármacos esteatósicos.

Tabla 3.1. Validación cruzada del modelo PLS-DA obtenido para las muestras de células HepaRG con recarga (2CP) y sin recarga lipídica (3CP) analizadas por GC-MS.

HepaRG con RL		HepaRG sin RL	
PLS-DA (2 CP)		PLS-DA (3 CP)	
R ²	Q ²	R ²	Q ²
0.87	0.22	0.83	0.08

Resultados

Tabla 3.2. Variables identificadas con un VIP>1 en el análisis de muestras de células HepaRG con recarga y sin recarga lipídica analizadas por GC-MS.

HepaRG con recarga lipídica			
Compuesto	VIP	S/C¹	p-valor²
α-D-Glucopyranose	1.89	0.689	0.08
(2,3-Diphenylcyclopropyl)methylphenyl	1.15	0.65	0.14
1,2,3-Propanetricarboxylic acid	1.54	1.53	0.06
1-Monooleoylglycerol	1.42	0.83	0.19
3-(2-Hydroxyethyl)imidazole-2-thione	1.78	0.9	0.4
5-Methyluridine	1.00	0.9	0.2
6-Chloro-4-phenyl-2-propylquinoline	1.79	0.80	0.14
Adenosine	1.17	2.05	0.14
Butanal	1.39	1.0	0.9
Butanedioic acid	1.23	1.18	0.09
cis-9-Hexadecenoic acid	1.06	0.9	0.4
Coumarine	1.29	0.43	0.17
Dipropylacetic acid	1.67	0.78	0.06
D-Lactose	1.13	0.63	0.16
DL-Ornithine	1.49	1.27	0.08
Ethanimidic acid	1.06	1.1	0.3
Glycine	1.18	0.94	0.07
L-Isoleucine	1.50	1.564	0.011
L-Leucine	1.47	1.53	0.02
L-Proline	1.73	1.24	0.11
L-Threonine	1.64	1.1	0.4
L-Valine	1.54	1.530	0.009
N-α-Acetyl-L-Lysine	1.11	1.1	0.3
Pantothenic acid	1.39	1.2	0.5
Phenylalanine	1.21	0.58	0.05
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	1.42	0.70	0.06
Tyrosine	1.73	1.39	0.05

Continúa en la página siguiente

Resultados

HepaRG sin recarga lipídica			
Compuesto	VIP	S/C¹	p-valor²
(2,3-Diphenylcyclopropyl)methyl phenyl	1.90	0.73	0.08
1-Monooleoylglycerol	2.17	0.72	0.06
3-(2-Hydroxyethyl)imidazole-2-thione	1.66	0.9	0.5
5-Methyluridine	1.30	0.8	0.6
Aminomalonic acid	1.92	1.2	0.5
Benzoic acid	1.08	3.88	0.16
D-Lactose	1.08	0.7	0.3
DL-Ornithine	1.63	0.45	0.04
D-Mannose	1.23	0.40	0.13
L-Alanine	1.11	0.6	0.2
L-Aspartic acid	2.40	1.0	0.8
L-Glutamine	1.61	0.35	0.05
Propanoic acid	1.06	1.54	0.08
p-Tolyl-β-D-glucuronide	1.14	0.8	0.2
Serine	1.43	0.71	0.04
Xylitol	1.21	1.0	0.3
α-D-Glucopyranose	2.14	1.2	0.4
β-Alanine	1.81	0.6	0.3

¹Cociente de intensidades entre muestras esteatóticas/muestras control.

²El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*.

Tabla 3.3. Variables comunes identificadas con un VIP>1 en el análisis de muestras de células HepaRG con recarga y sin recarga lipídica analizadas por GC-MS.

HepaRG con y sin recarga lipídica
(2,3-Diphenylcyclopropyl)methyl phenyl sulfoxide
1-Monooleoylglycerol
3-(2-Hydroxyethyl)imidazole-2-thione
5-Methyluridine
D-Lactose
DL-Ornithine
α-D-Glucopyranose

La recarga lipídica inducida por la incubación de las células con concentraciones bajas de ácidos grasos (palmitato y oleato) de forma previa al tratamiento con los fármacos parece, por tanto, ser un modelo

Resultados

más adecuado para el estudio de los cambios metabólicos inducidos por los compuestos esteatóxicos sobre las células HepaRG. Este procedimiento ya se había descrito como una forma rápida y eficaz de estimular la acumulación de lípidos en células hepáticas en cultivo y acelerar el daño celular inducido por fármacos esteatogénicos [121,251]. En vista de los resultados obtenidos, decidimos continuar sólo con el estudio de las muestras de HepaRG con RL, e incorporar la recarga de lípidos en todos los experimentos posteriores.

En el análisis no supervisado conocido como *Heatmap* de las células HepaRG con RL, llevado a cabo usando las variables identificadas, se puede observar cómo se encuentran alterados distintos metabolitos según la naturaleza de los fármacos. En esta figura, la intensidad de los tonos azules indica niveles más bajos de cada uno de los metabolitos, mientras que tonos rojos indican niveles más altos de cada uno de los metabolitos (**Figura 3.5**).

En el dendograma observamos un agrupamiento de clases no óptimo al no separarse dos grupos de forma clara. Por tanto, podemos concluir que no hay un patrón metabólico que diferencie de un modo claro las clases, aunque sí que se observe una alteración en el metabolismo de los aminoácidos, con cambios significativos.

Las principales alteraciones encontradas en el estudio con células HepaRG con RL, fueron el incremento significativo en los niveles de algunos aminoácidos ramificados, tales como valina, leucina e isoleucina (**Figura 3.6**).

Resultados

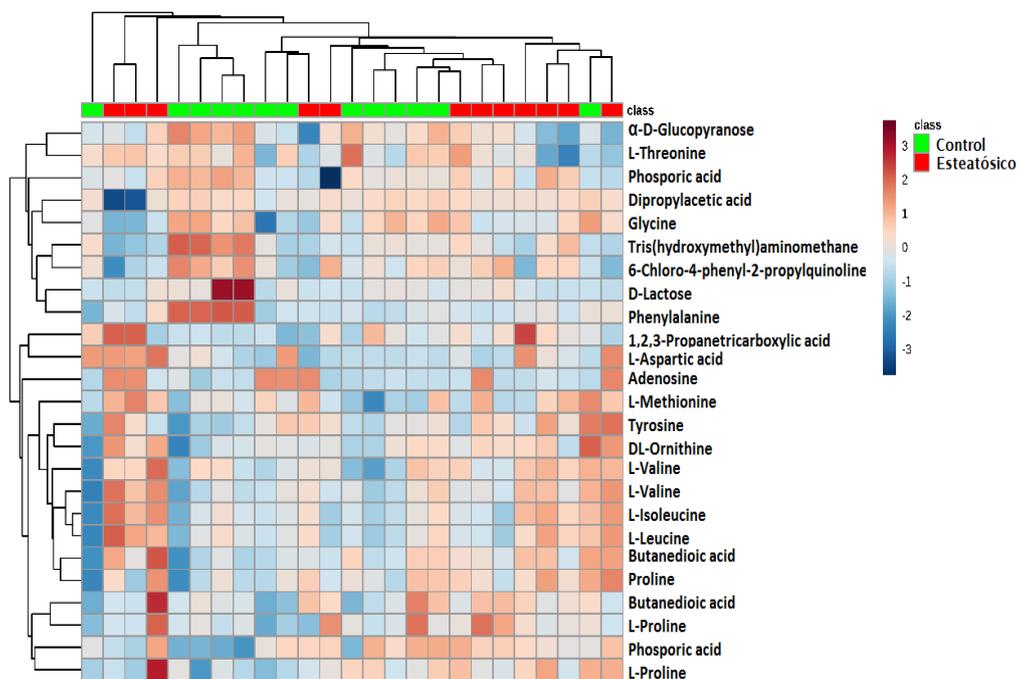


Figura 3.5. *Heatmap* realizado sobre las muestras de células HepaRG con recarga lipídica analizadas por GC-MS. Distancia Euclídea. Verde: Muestras tratadas con fármacos control; Rojo: Muestras tratadas con fármacos esteatósicos.

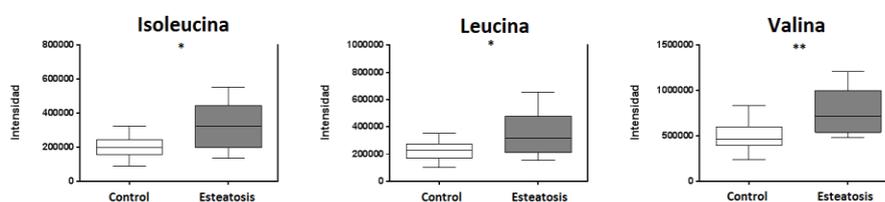


Figura 3.6. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con fármacos esteatósicos en células HepaRG con recarga lipídica analizadas mediante la estrategia de análisis metabólico no dirigido usando la plataforma GC-MS. Los valores están expresados como intensidad relativa. Las cajas denotan los rangos intercuartílicos, las líneas denotan las medianas y los bigotes denotan los percentiles 10 y 90. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Resultados

Para contextualizar los cambios metabólicos en un entorno biológico, se hizo un análisis de enriquecimiento funcional que reveló que las rutas metabólicas significativamente alteradas fueron: i) la biosíntesis de proteínas, ii) metabolismo de la fenilalanina y la tirosina y iii) la degradación de la valina, leucina e isoleucina (**Tabla 3.4**).

Tabla 3.4. Rutas metabólicas alteradas obtenidas mediante un análisis de enriquecimiento funcional de las células HepaRG analizadas por GC-MS.

Ruta metabólica	Total	Hits	<i>p</i> -valor
Biosíntesis de proteínas	19	7	4.32E-08
Metabolismo de la fenilalanina y tirosina	13	2	0.0337
Degradación de la valina, leucina e isoleucina	36	3	0.0457

3.2.2 Células HepG2

Si bien las HepaRG son el modelo más cercano a los hepatocitos en cultivo, plantean ciertos inconvenientes a la hora de su uso en rutina, ya que para obtener las HepaRG diferenciadas se requiere tiempos de cultivo bastante prolongados (4 semanas). Por ello, exploramos un modelo alternativo como es la línea celular HepG2 que, a pesar de ser células menos diferenciadas que la HepaRG, son un modelo más manejable y constituyen un modelo ampliamente utilizado en el campo de la toxicología [121-123]. En nuestro laboratorio estas células han sido utilizadas con éxito para el estudio de la esteatosis inducida por fármacos mediante otras aproximaciones moleculares, tales como HCS (High Content Screening) y transcriptómica [121,122,269].

Los experimentos se hicieron con recarga de lípidos (tal y como habíamos concluido del experimento con células HepaRG descrito en la **sección 3.2.1**). Se estudiaron 25 compuestos: amitriptilina, citrato, buspirona, gentamicina, sorbitol, ketotifeno, clorpromazina, amikacina, simvastatina, clozapina, tilorona y maproptilina como compuestos no esteatósicos; acetilsalicílico, amiodarona, ciclosporina, doxiciclina,

Resultados

fungizona, tamoxifen, metotrexato, tetraciclina, tianeptina, zidovudina, valproato, irinotecan e ibuprofeno como compuestos esteatósicos. Se testaron dos concentraciones de cada uno de los compuestos (**Tabla 2.2**.) Las muestras se analizaron con dos plataformas analíticas, LC-MS y GC-MS, para aumentar la cobertura metabolómica y con el objetivo de profundizar en el estudio metabólico.

Análisis metabolómico no dirigido de HepG2 usando la plataforma GC-QTOF

Se realizó un estudio de las muestras de células HepG2 en la plataforma analítica GC-MS, al igual que en el caso de las HepaRG. El estudio del extracto celular realizado mediante esta plataforma, permitió la detección de 408 variables.

El análisis multivariante de estos datos por PLS-DA ofreció una separación evidente entre los dos grupos de muestras, aunque con el solapamiento de algunas de ellas, usando 2 CP. Fue necesario el uso de 3 CP para separar de manera completa los dos grupos de muestras (**Figura 3.7**).

Los parámetros de ajuste del modelo se comprobaron mediante CV (**Tabla 3.5**).

Tabla 3.5. Validación cruzada del modelo PLS-DA con 3 CP obtenido para las muestras de células HepG2 analizadas por GC-MS.

HepG2	
PLS-DA (3 CP)	
R ²	Q ²
0.86	0.39

Resultados

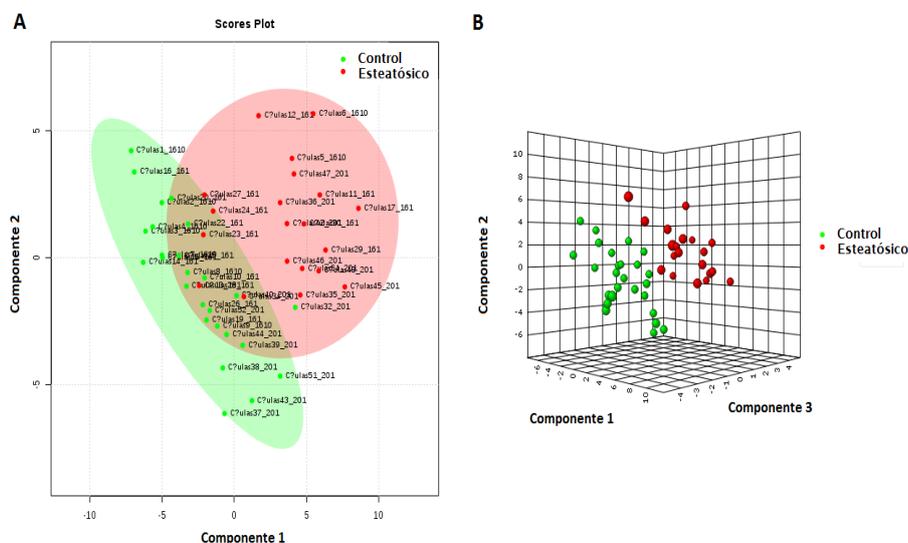


Figura 3.7. A) Diagrama de scores con dos componentes principales y B) con tres componentes principales del análisis PLS-DA realizado sobre las muestras de células HepG2 analizadas por GC-MS. Verde: Muestras tratadas con fármacos control; Rojo: Muestras tratadas con fármacos esteatósicos.

El valor de R^2 fue aceptable, siendo cercano a 1, indicando que el modelo explicaba un alto porcentaje de la varianza de los datos. El valor de Q^2 fue inferior y más alejado de 1, indicando que la capacidad predictiva del modelo no era aceptable.

Se identificaron 103 posibles marcadores, 27 con un $VIP > 1$, en las células HepG2, usando 3 CP, siendo 7 de ellos comunes con los obtenidos en HepaRG (Tabla 3.6 y Tabla 3.7). La mayoría de ellos, al igual que en las células HepaRG, resultaron ser aminoácidos y ácidos orgánicos.

Resultados

Tabla 3.6. Variables identificadas con un VIP>1 en el análisis de muestras de células HepG2 por GC-MS.

Compuesto	VIP	S/C ¹	p-valor ²
1,5-Anhydro-D-sorbitol	1.97	0.73966	0.12
2-Monopalmitoylglycerol	1.62	0.818	0.06
2-Monostearin	1.07	1.85	0.05
Butanedioic acid	1.62	0.652	0.13
Cystathionine	1.56	0.647	0.07
D-Altro-2-Heptulose	1.72	0.752	0.015
D-Galactofuranose	1.33	0.76	0.07
D-Galactopyranuronic acid	1.56	0.73	0.03
D-Gluconic acid	2.01	0.6114	0.0003
Dimethirimol	1.76	0.734	0.007
D-Ribofuranose	1.85	0.645	0.03
Ethanimidic acid	1.85	0.9	0.2
Glycyl-L-glutamic acid	1.26	0.85	0.04
Hexadecanoic acid	1.50	0.621	0.11
Lactic acid	1.37	0.93	0.04
L-Asparagine	1.16	1.1	0.5
L-Glutamine	1.62	0.778	0.005
L-Leucine	1.32	1.470	0.010
Inositol	1.23	2.093	0.008
L-Proline	1.05	0.780	0.05
L-Threonine	1.06	1.15	0.15
L-Tyrosine	1.75	0.8801	0.05
L-Valine	1.30	1.1	0.4
Pantothenic acid	1.22	0.8	0.7
Pentanedioic acid	1.61	0.780	0.05
Phtalic acid	1.29	1.1996	0.015
Propanoic acid	1.60	0.674	0.05

¹Cociente de intensidades entre muestras esteatóxicas/muestras control.

²El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*.

Resultados

Tabla 3.7. Variables comunes identificadas con un VIP>1 en el análisis de muestras de células HepG2 y HepaRG por GC-MS.

HepG2 y HepaRG
Butanedioic acid
Ethanimidic acid
L-Leucine
L-Proline
L-Threonine
L-Valine
Pantothenic acid

En el *Heatmap* generado con las variables identificadas, se puede ver la variación en los niveles de algunos de los biomarcadores según la naturaleza de los fármacos utilizados para el tratamiento. En este caso, la separación de los dos grupos de muestras fue mejor que la obtenida en las células HepaRG (**Figura 3.8**).

En cuanto a las alteraciones encontradas, cabe destacar el incremento en los niveles de inositol, así como la disminución en los niveles de glutamina, ácido láctico y ácido glucónico, todas ellas de manera significativa (**Figura 3.9**).

Resultados

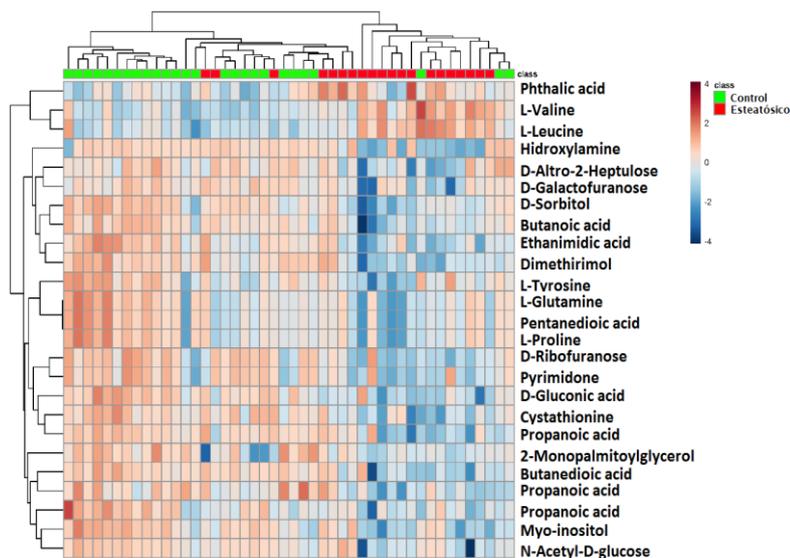


Figura 3.8. Heatmap realizado sobre las muestras de células HepG2 analizadas por GC-MS. Distancia Euclídea. Verde: Muestras tratadas con fármacos control; Rojo: Muestras tratadas con fármacos esteatósicos.

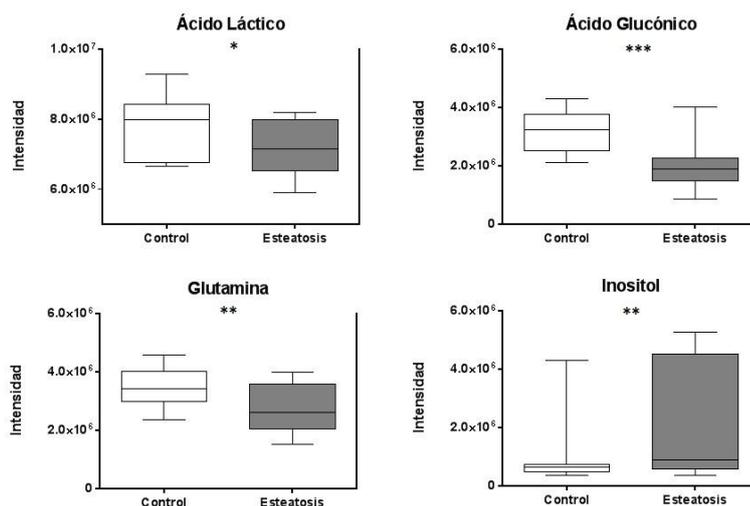


Figura 3.9. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con fármacos esteatósicos en células HepG2 analizadas mediante la estrategia de análisis metabólico no dirigido usando la plataforma GC-MS. Los valores están expresados como intensidad relativa. Las cajas denotan los rangos intercuartílicos, las líneas denotan las medianas y los bigotes denotan los percentiles 10 y 90. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Resultados

Finalmente, un análisis de enriquecimiento funcional reveló que la única ruta metabólica significativamente alterada fue la biosíntesis de proteínas (**Tabla 3.8**).

Tabla 3.8. Rutas metabólicas alteradas obtenidas mediante un análisis de enriquecimiento funcional de las células HepG2 analizadas por GC-MS.

Ruta metabólica	Total	Hits	<i>p</i> -valor
Biosíntesis de proteínas	19	6	2.78E-06

Análisis metabolómico no dirigido de HepG2 usando la plataforma LC-QTOF

Para completar el estudio de las muestras de células HepG2 tratadas con fármacos esteatósicos y analizadas por GC-MS, se realizó un estudio de las mismas en otra plataforma analítica (LC-MS) con el fin de complementar y obtener información sobre otro tipo de metabolitos, en este caso de carácter lipídico. El estudio lipidómico del extracto celular de las HepG2 realizado mediante la plataforma LC-MS, permitió la detección de 1478 variables.

El análisis multivariante de estos datos por PLS-DA ofreció una separación evidente entre los dos grupos de muestras con 2 CP (**Figura 3.10**).

Mediante CV se comprobaron los parámetros de ajuste del modelo (**Tabla 3.9**). Los valores obtenidos de R^2 y Q^2 para el modelo PLS-DA con 2 CP de las células HepG2 fueron aceptables, siendo superiores a 0.5 en ambos casos.

Resultados

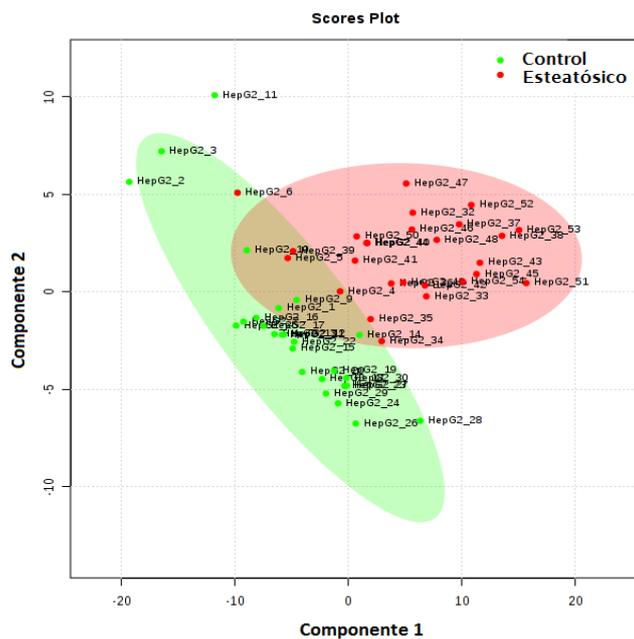


Figura 3.10. Diagrama de scores con dos componentes principales del análisis PLS-DA realizado sobre las muestras de células HepG2 analizadas por UPLC-MS de análisis lipidómico. Verde: Muestras tratadas con fármacos control; Rojo: Muestras tratadas con fármacos esteatósicos.

Tabla 3.9. Validación cruzada del modelo PLS-DA con 2 CP obtenido para las muestras de células HepG2 analizadas por UPLC-MS.

HepG2	
PLS-DA (2 CP)	
R ²	Q ²
0.86	0.54

Se identificaron 246 posibles marcadores lipídicos en las células HepG2, de los cuales 106 metabolitos tenían un VIP>1 (**Tabla 3.10**). Estos fueron en su mayoría TG, diglicéricos (DG), ceramidas (Cer), ésteres de colesterol (ChE), fosfolípidos (PL) (fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilserinas (PS)...) y lisofosfolípidos (LisoPC).

Resultados

Tabla 3.10. Variables identificadas con un VIP>1 en el análisis de muestras de células HepG2 por LC-MS de análisis lipidómico.

Compuesto	VIP	S/C ¹	<i>p</i> -valor ²
Carnitinas		2.370	0.006
Carnitine(14:0)	1.84	3.935	0.002
Carnitine(16:0)	1.29	2.53	0.04
Ésteres de colesterol		2.2775	0.0015
ChE(14:0)	1.37	0.8	0.4
ChE(16:1)	1.59	1.69	0.13
ChE(18:1)	1.68	1.88	0.08
Ceramidas		1.49	0.04
Cer(d32:1)	1.27	1.61	0.07
Cer(d32:2)	1.26	1.936	0.016
Cer(d33:1)	1.50	1.479	0.017
Cer(d34:0)	1.17	1.1	0.7
Cer(d34:2)	1.61	1.29	0.15
Cer(d35:1)	1.35	1.54	0.04
Cer(d38:1)	1.00	1.1	0.4
Cer(d39:1)	1.57	1.6628	0.0002
Cer(d40:0)	1.62	2.408	0.0008
Cer(d40:1)	1.10	1.396	0.004
Cer(d42:2)	1.82	1.369	0.008
Diglicéridos		1.1	0.6
DG(30:0)	1.52	1.1	0.7
DG(32:0)	1.22	1.0	1.0
DG(32:1)	1.43	1.1	0.3
DG(34:2)	1.29	1.1	0.4
DG(36:2)	1.33	1.1	0.3
DG(36:3)	1.09	1.322	0.007
DG(40:1)	1.25	0.2	0.4
DG(40:7)	1.16	0.6	0.4
Glucoceramidas		1.0	0.8
GlucCer(d26:2)	1.20	0.34	0.06
GlucCer(d38:1)	1.39	0.45	0.09
GlucCer(d40:2)	1.55	1.42	0.07
Lisofosfatidilcolinas		1.2	0.3
LysoPC(20:0)	1.55	1.49	0.09
LysoPC(20:1)	1.37	1.31	0.15
LysoPC(20:3)	1.25	1.35	0.07
LysoPC(22:1)	1.04	1.28	0.07
LysoPC(24:0)	1.17	1.32	0.05

Continúa en la página siguiente

Resultados

Compuesto	VIP	S/C ¹	<i>p</i> -valor ²
Fosfatidilcolinas		1.22	0.05
PC(26:0)	1.40	2.00	0.08
PC(26:1)	1.27	1.217	0.013
PC(28:0)	1.40	1.343	0.004
PC(28:1)	1.27	1.7	0.2
PC(30:3)	1.47	1.35	0.11
PC(36:2)	1.02	0.8	0.6
PC(36:3)	1.15	0.9	0.8
PC(38:2)	1.42	1.3	0.2
PC(38:7)	1.43	1.29	0.14
PC(38:9)	1.03	1.2	0.2
PC(40:7)	1.12	0.64	0.04
PC(44:2)	1.19	1.28	0.03
PC(O-32:0)	1.33	1.23	0.03
Fosfatidiletanolaminas		1.31	0.04
PE(28:1)	1.49	1.2500	0.0007
PE(30:0)	1.59	1.3	0.2
PE(30:1)	1.24	1.327	0.007
PE(32:1)	1.16	1.291	0.010
PE(34:1)	1.32	1.197	0.015
PE(34:2)	1.52	1.21	0.03
PE(36:2)	1.60	1.316	0.012
PE(38:1)	1.02	1.38491	0.00012
PE(38:2)	1.53	1.2554	0.0002
PE(38:3)	1.04	1.3419	0.0008
PE(42:3)	1.66	1.1	0.2
PE(42:4)	1.31	1.269	0.008
PE(O-32:2)	1.54	1.2	0.4
PE(O-34:2)	1.34	1.1	0.6
PE(O-36:6)	1.31	1.14	0.04
Fosfatidilserinas		1.71	0.02
PS(36:1)	1.06	1.537	0.002
PS(36:3)	1.44	0.7	0.6
PS(36:5)	1.55	1.1	0.6
PS(40:5)	1.08	1.31	0.15
PS(O-36:0)	1.70	1.93217	0.00007
Esfingomielinas		1.2	0.5
SM(d30:1)	1.01	0.8	0.1
SM(d32:1)	1.64	1.0	0.5
SM(d34:0)	1.19	0.763	0.006
SM(d34:2)	1.20	1.268	0.003
SM(d38:2)	1.30	1.198	0.010
SM(d42:2)	1.64	1.250	0.006

Continúa en la página siguiente

Resultados

Compuesto	VIP	S/C ¹	p-valor ²
Triglicéridos		3.29272	0.00004
TG(38:2)	1.09	2.95	0.06
TG(40:0)	1.75	2.585	0.006
TG(40:1)	1.80	4.322	0.004
TG(42:0)	1.56	2.5273	0.0019
TG(42:1)	1.74	3.3141	0.0002
TG(42:4)	1.36	1.0	0.9
TG(44:0)	1.48	2.05	0.08
TG(44:1)	1.42	2.0388	0.0013
TG(44:2)	1.67	2.9476	0.0003
TG(46:0)	1.04	1.4	0.6
TG(46:1)	1.14	1.67	0.04
TG(46:2)	1.10	2.1583	0.0011
TG(48:1)	1.35	1.51	0.19
TG(48:2)	1.16	1.901	0.003
TG(48:3)	1.70	2.903478	0.000003
TG(50:0)	1.35	1.3	0.5
TG(50:1)	1.40	1.5	0.2
TG(50:2)	1.29	1.56	0.10
TG(50:3)	1.20	2.31049	0.00012
TG(50:4)	1.56	2.73073	0.00017
TG(52:1)	1.46	1.5	0.3
TG(52:2)	1.15	1.71	0.07
TG(52:3)	1.29	2.146	0.002
TG(52:7)	1.48	2.9034	0.0009
TG(54:2)	1.13	2.376	0.004
TG(54:3)	1.44	2.7276	0.0002
TG(54:7)	1.40	2.7806	0.0017
TG(54:8)	1.68	3.18193	0.00003
TG(56:3)	1.41	2.817	0.003
TG(56:8)	1.60	4.30243	0.00017
TG(58:4)	1.39	2.796	0.004
TG(58:8)	1.53	3.4669	0.0003
TG(58:9)	1.65	4.1103	0.0003
TG(60:11)	1.76	2.961	0.004
TG(O-50:5)	1.08	0.9	0.9

¹Cociente de intensidades entre muestras esteatóticas/muestras control (metabolitos agrupados según su clase).

²El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*.

En el *Heatmap* llevado a cabo con las variables identificadas se puede observar como algunas de las especies encontradas se encuentran alteradas según la naturaleza de los fármacos. Tonos azules indican niveles más bajos de cada uno de los metabolitos, correspondiendo

Resultados

generalmente a muestras tratadas con fármacos control. Tonos rojizos indican niveles más altos de cada uno de los metabolitos, correspondiendo generalmente a muestras tratadas con fármacos esteatósicos. Además, se observa una separación de los dos grupos de muestras bastante importante (**Figura 3.11**).

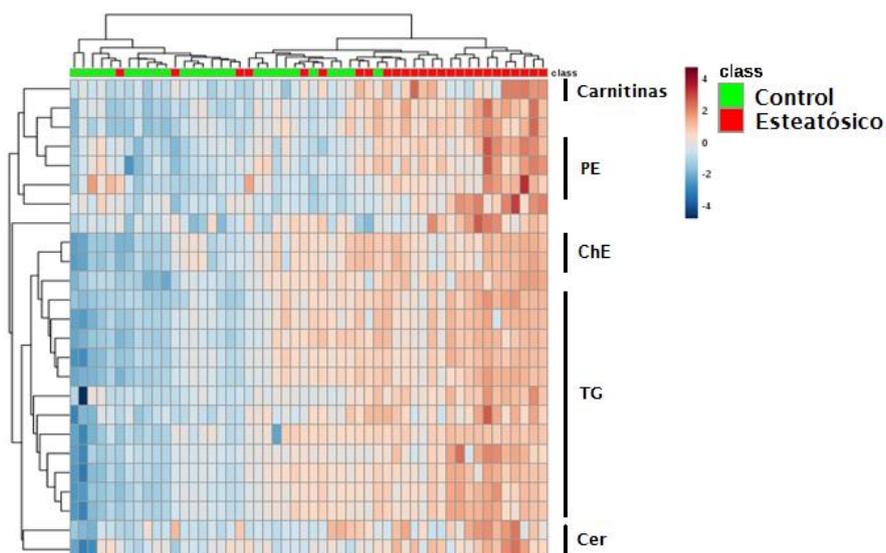


Figura 3.11. *Heatmap* realizado sobre las muestras de células HepG2 analizadas por UPLC-MS de análisis lipidómico. Distancia Euclídea. Verde: Muestras tratadas con fármacos control; Rojo: Muestras tratadas con fármacos esteatósicos. Cer: ceramidas; ChE: ésteres de colesterol; PE: fosfatidiletanolaminas; TG: triglicéridos.

Las principales alteraciones metabólicas relacionadas con especies lipídicas observadas en células HepG2 tratadas con fármacos esteatósicos fueron el incremento en los niveles de carnitinas, ceramidas (Cer), diglicéridos (DG), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilserinas (PS), ésteres de colesterol (ChE) y triglicéridos (TG), casi todas ellas de manera significativa (**Figura 3.12**).

Resultados

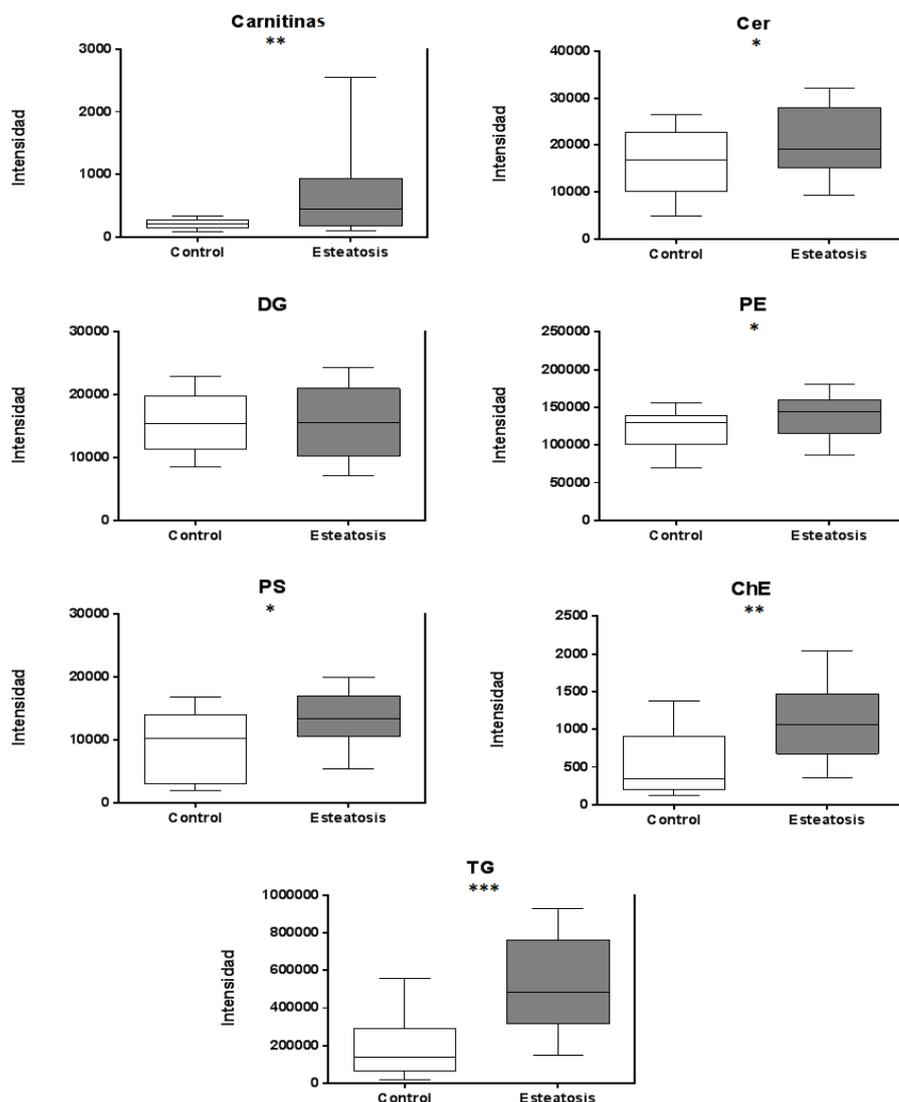


Figura 3.12. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con fármacos esteatóticos en células HepG2 analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma UPLC-MS y condiciones de análisis lipidómico. Los valores están expresados como intensidad relativa. Las cajas denotan los rangos intercuartílicos, las líneas denotan las medianas y los bigotes denotan los percentiles 10 y 90. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Cer: ceramidas; ChE: ésteres de colesterol; DG: diglicéridos; PE: fosfatidiletanolaminas; PS: fosfatidilserinas; TG: triglicéridos.

Resultados

3.2.3 Hepatocitos Humanos

Las líneas celulares HepaRG y HepG2, aunque son muy útiles y presentan ventajas (fácil manejo, disponibilidad ilimitada) sobre el cultivo primario de hepatocitos, no son totalmente equivalentes a éstos, lo que puede resultar en un comportamiento diferente. Dichas células son de origen tumoral, no suficientemente diferenciadas y su comportamiento funcional no es siempre un reflejo del hepatocito/hígado. Por ello consideramos necesario comprobar en qué medida los efectos observados en las células HepaRG y/o HepG2 se reproducen también en un modelo celular más cercano al hígado. Los hepatocitos humanos en cultivo primario son el modelo *in vitro* más aproximado al hígado humano *in vivo*. No obstante, su utilización como modelo experimental es bastante limitada dada su escasa disponibilidad y el hecho de que no es un modelo fácilmente accesible. Nuestro grupo tiene amplia experiencia en la utilización de este modelo celular, por lo que decidimos incorporarlo a nuestro estudio, pero con algunas limitaciones condicionadas por el escaso número de células disponibles. Por este motivo se testó un número más reducido de fármacos, a única concentración de los mismos y el análisis sólo se realizó mediante la plataforma LC-MS.

Se usaron 12 compuestos incluyendo fármacos esteatósicos y no esteatósicos: amitriptilina, citrato, ketotifeno, clorpromazina y clozapina como compuestos no esteatósicos; acetilsalicílico, ciclosporina, doxiciclina, tamoxifen, metotrexato, tetraciclina, valproato como compuestos esteatósicos. El resumen de los compuestos y las concentraciones usadas para cada uno puede verse en la **Tabla 2.4**.

El estudio lipidómico del extracto celular de los hepatocitos humanos permitió la detección de 1801 variables. El análisis multivariante de estos datos por PLS-DA ofreció una separación muy buena entre los dos grupos de muestras con 2 CP (**Figura 3.13**).

Resultados

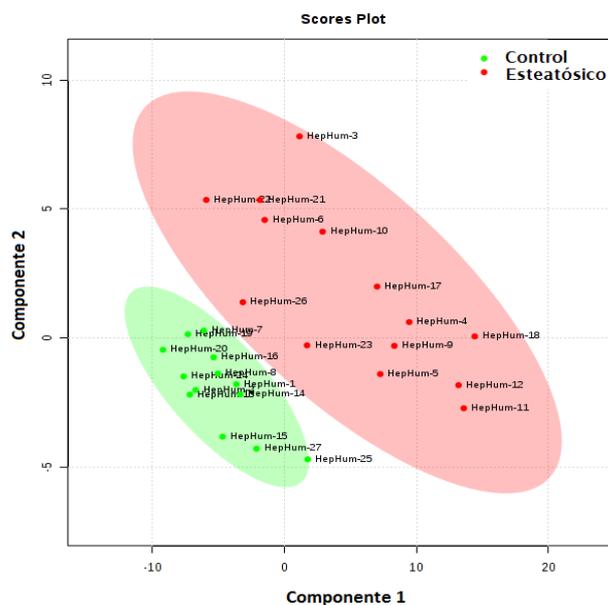


Figura 3.13. Diagrama de scores con dos componentes principales del análisis PLS-DA realizado sobre las muestras de hepatocitos humanos analizadas por UPLC-MS de análisis lipidómico. Verde: Muestras tratadas con fármacos control; Rojo: Muestras tratadas con fármacos esteatósicos.

Los parámetros de ajuste del modelo se comprobaron mediante CV (Tabla 3.11). El valor cercano a 1 de R^2 indica lo bien que el modelo explica la varianza de los datos.

Tabla 3.11. Validación cruzada del modelo PLS-DA con 2 CP obtenido para las muestras de hepatocitos humanos analizadas por UPLC-MS.

Hepatocitos humanos	
PLS-DA (2 CP)	
R^2	Q^2
0.85	0.44

Se identificaron 243 posibles marcadores lipídicos en los hepatocitos humanos, de los cuales 99 metabolitos tenían un $VIP > 1$ (Tabla 3.12). La mayoría de ellos fueron PL, TG y esfingomielinas (SM), al igual que en el caso de las células HepG2 (Tabla 3.13). **Tabla 3.12.** Variables

Resultados

identificadas con un VIP>1 en el análisis de muestras de hepatocitos humanos por LC-MS de análisis lipidómico.

Compuesto	VIP	S/C¹	p-valor²
Ésteres de colesterol		1.25	0.11
ChE(16:1)	1.53	4.20	0.02
ChE(18:2)	1.04	0.73	0.07
ChE(18:3)	1.28	0.65	0.03
Ceramidas		1.15	0.12
Cer(d34:1)	1.41	1.30	0.02
Cer(d38:1)	1.12	1.26	0.08
Cer(d38:4)	1.29	1.57	0.04
Cer(d40:4)	1.55	1.30	0.02
Cer(d42:5)	1.18	1.34	0.06
Cer(d44:4)	1.81	0.7380	0.0017
Diglicéridos		2.17	0.08
DG(32:1)	1.19	0.63	0.12
DG(36:1)	1.43	4.32	0.02
DG(38:1)	1.03	3.35	0.13
Glucoceramidas		1.1	0.2
GlucCer(d38:1)	1.68	1.801	0.006
GlucCer(d40:5)	1.68	0.609	0.010
Lisofosfatidilcolinas		0.57	0.03
LysoPC(16:0)	1.05	0.58	0.04
LysoPC(18:0)	1.39	0.47	0.02
LysoPC(18:1)	1.27	0.61	0.04
LysoPC(18:3)	1.24	0.537	0.013
LysoPC(20:3)	1.21	0.71	0.08
Ácidos grasos		1.39	0.07
Palmitic acid	1.06	1.52	0.07
Fosfatidilcolinas		0.871	0.007
PC(24:1)	1.28	1.27	0.03
PC(28:0)	1.06	0.72	0.11
PC(30:1)	1.10	0.72	0.06
PC(32:4)	1.23	0.66	0.04
PC(34:3)	1.59	0.753	0.005
PC(36:3)	1.16	0.82	0.02
PC(36:4)	1.52	0.888	0.013
PC(36:5)	1.46	0.6567	0.0007
PC(38:0)	1.25	0.73	0.06
PC(38:1)	1.66	0.651	0.003
PC(40:4)	1.40	1.498	0.009
PC(40:6)	1.12	1.286	0.015
PC(42:7)	1.11	1.31	0.05
PC(O-34:5)	1.79	0.751	0.004

Continúa en la página siguiente

Resultados

Compuesto	VIP	S/C ¹	<i>p</i> -valor ²
Fosfatidiletanolaminas		0.72704	0.00003
PE(34:1)	1.08	0.77	0.06
PE(34:4)	1.40	0.647	0.011
PE(36:2)	1.04	0.78	0.13
PE(36:3)	1.07	0.82	0.08
PE(36:5)	1.54	0.652	0.006
PE(36:6)	1.20	0.76	0.05
PE(38:7)	1.04	1.55	0.11
PE(40:3)	1.03	0.7	0.2
PE(40:5)	1.39	0.668	0.010
PE(40:7)	1.73	0.547	0.008
PE(40:9)	1.18	1.58	0.09
PE(46:8)	1.00	0.67	0.04
PE(O-34:1)	1.17	0.80	0.05
PE(O-36:1)	1.00	0.4	0.3
PE(O-36:2)	1.03	0.82	0.07
PE(O-36:5)	1.17	0.77	0.08
PE(O-38:0)	1.10	0.70	0.07
PE(O-38:1)	1.02	0.54	0.08
PE(O-38:5)	1.04	0.81	0.16
PE(O-38:6)	1.14	0.8	0.2
Fosfatidilserinas		0.6818	0.0009
PS(34:0)	1.46	0.724	0.002
PS(38:2)	1.12	0.69	0.08
PS(O-38:0)	1.42	0.65	0.02
Esfingomielinas		0.6308	0.0016
SM(d32:1)	1.42	0.79	0.03
SM(d32:6)	1.25	1.33	0.04
SM(d34:1)	1.57	0.807	0.009
SM(d34:4)	1.46	0.730	0.015
SM(d36:0)	2.00	0.3775	0.0011
SM(d36:1)	1.60	0.618	0.013
SM(d36:2)	1.36	0.76	0.03
SM(d36:5)	1.58	0.760	0.012
SM(d38:1)	1.74	0.6443	0.0011
SM(d38:2)	1.86	0.720	0.002
SM(d40:2)	1.83	0.4461	0.0004
SM(d40:4)	1.74	0.7161	0.0012
SM(d42:0)	1.44	0.631	0.007
SM(d42:1)	1.65	0.494	0.004
SM(d42:4)	1.59	0.627	0.009
SM(d44:4)	1.62	0.600	0.006
SM(d44:5)	1.79	0.629	0.002
SM(d46:4)	1.50	0.758	0.011
SM(d46:5)	1.47	0.745	0.011

Continúa en la página siguiente

Resultados

Compuesto	VIP	S/C ¹	<i>p</i> -valor ²
Triglicéridos		1.1	0.3
TG(36:0)	1.47	2.60	0.02
TG(36:1)	1.30	2.55	0.04
TG(36:2)	1.05	0.83	0.10
TG(38:0)	1.71	3.081	0.005
TG(38:1)	1.61	2.928	0.013
TG(38:2)	1.30	1.96	0.03
TG(40:0)	1.36	2.148	0.013
TG(40:1)	1.22	2.057	0.012
TG(40:2)	1.85	3.822	0.003
TG(40:3)	1.54	2.260	0.010
TG(42:3)	1.78	4.174	0.005
TG(42:4)	1.87	3.448	0.003
TG(44:3)	1.18	1.89	0.02
TG(44:5)	1.72	2.602	0.004
TG(44:6)	1.80	3.322	0.006
TG(44:9)	1.38	0.71	0.08
TG(46:10)	1.86	0.5413	0.0010
TG(46:4)	1.08	0.69	0.06
TG(46:5)	1.27	0.435	0.004
TG(48:4)	1.17	0.580	0.010
TG(48:5)	1.73	0.611	0.003
TG(54:5)	1.31	0.72	0.05
TG(58:11)	1.17	2.33	0.03

¹Cociente de intensidades entre muestras esteatóticas/muestras control (metabolitos agrupados según su clase).

²El valor estadístico *p* fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*.

Resultados

Tabla 3.13. Variables comunes identificadas con un VIP>1 en el análisis de muestras de hepatocitos humanos y HepG2 por LC-MS de análisis lipidómico.

HepG2 y Hepatocitos Humanos	
Ésteres de colesterol	Fosfatidiletanolaminas
ChE(16:1)	PE(34:1)
Ceramidas	PE(36:2)
Cer(d38:1)	Esfingomielinas
Diglicéridos	SM(d32:1)
DG(32:1)	SM(d38:2)
Glucoceramidas	Triglicéridos
GlucCer(d38:1)	TG(38:2)
Lisofosfatidilcolinas	TG(40:0)
LysoPC(20:3)	TG(40:1)
Fosfatidilcolinas	TG(42:4)
PC(28:0)	
PC(36:3)	

En el *Heatmap* mostrado de la **Figura 3.14** se puede observar cómo los hepatocitos tratados con fármacos esteatósicos presentan niveles más elevados de TG (tonos rojizos) y más bajos de SM (tonos azules), mientras que en las muestras tratadas con fármacos control ocurre al contrario (**Figura 3.14**).

Las principales alteraciones relacionadas con especies lipídicas encontradas en los hepatocitos humanos tratados con fármacos esteatósicos fueron el incremento en los niveles de DG, TG (como en el modelo celular HepG2) y ácido palmítico, y la disminución en los niveles de PC, LysoPC, PE, PS y SM (**Figura 3.15**)

Resultados

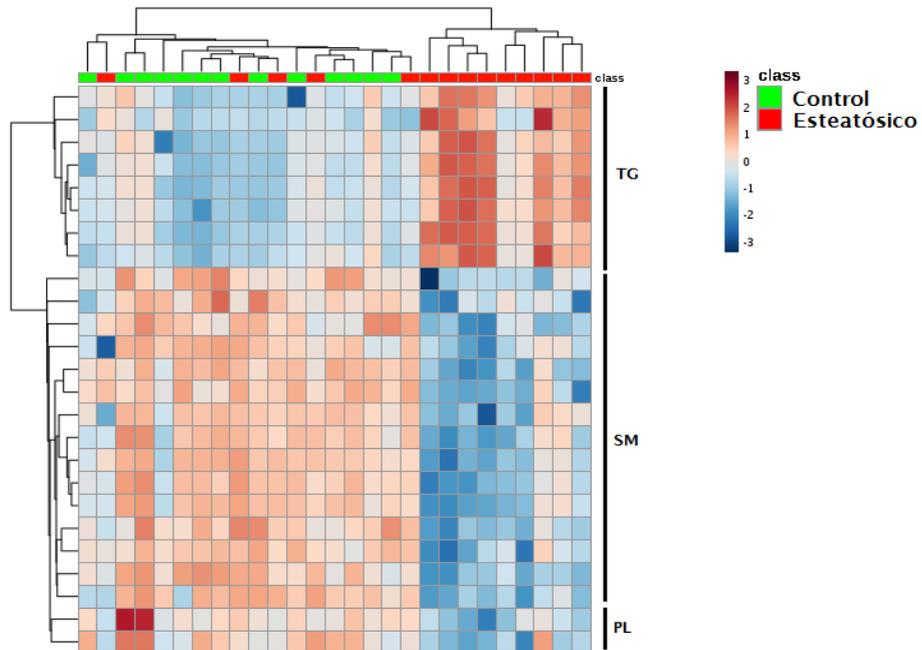


Figura 3.14. *Heatmap* realizado sobre las muestras de hepatocitos humanos analizadas por UPLC-MS de análisis lipidómico. Distancia Euclídea. Verde: Muestras tratadas con fármacos control; Rojo: Muestras tratadas con fármacos esteatósicos. PL: fosfolípidos; SM: esfingomielinas; TG: triglicéridos.

Resultados

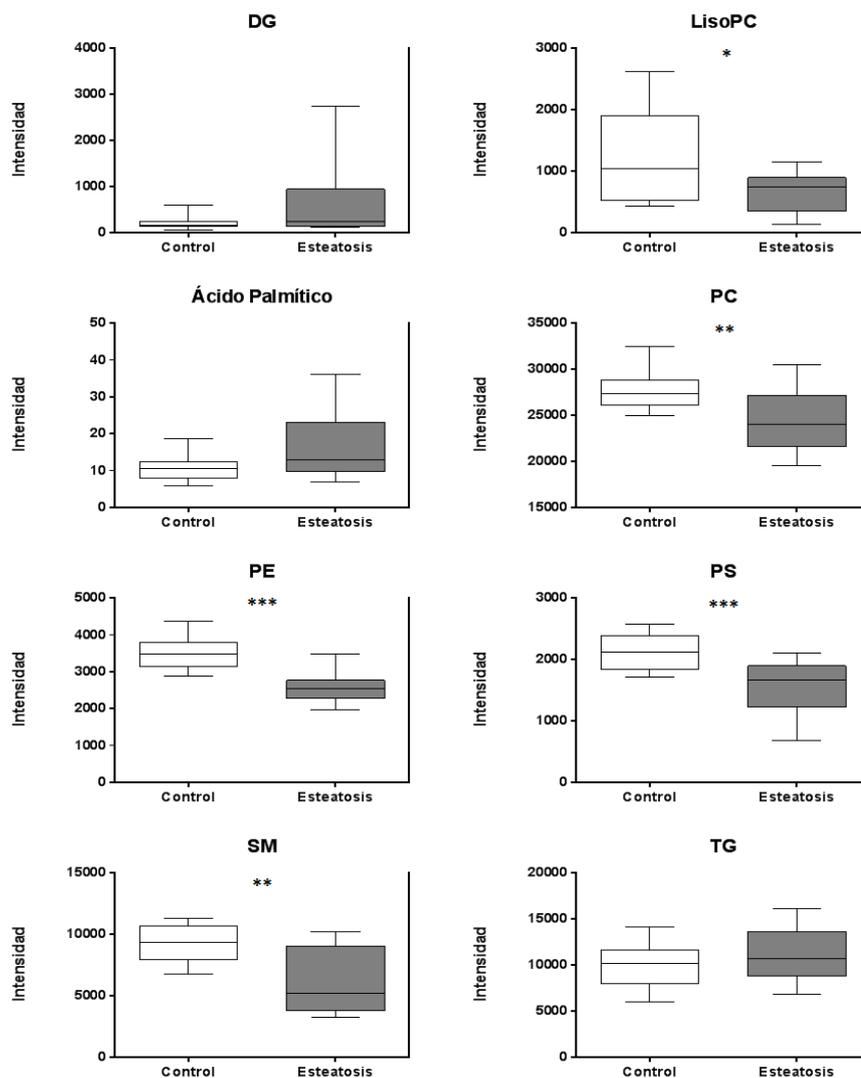


Figura 3.15. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con fármacos esteatóticos en hepatocitos humanos analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma UPLC-MS y condiciones de análisis lipidómico. Los valores están expresados como intensidad relativa. Las cajas denotan los rangos intercuartílicos, las líneas denotan las medianas y los bigotes denotan los percentiles 10 y 90. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. DG: diglicéridos; LisoPC: lisofosfatidilcolina; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolaminas; PS: fosfatidilserinas; SM: esfingomielinas; TG: triglicéridos.

Resultados

3.3 Estudios *in vivo*. Esteatosis inducida por iatrogenia y dieta en ratas

Para dar un paso más allá en el estudio de la esteatosis hepática y comprobar la posible extrapolación de los modelos *in vitro* a los modelos *in vivo*, proseguimos con estudios usando rata como modelo animal experimental. Aplicamos nuestra estrategia de análisis metabolómico para ver los cambios metabólicos en muestras de tejido hepático y suero en ratas expuestas a tetraciclina, un reconocido compuesto con capacidad esteatótica. El principal inconveniente de este modelo experimental es la limitación en el número de animales utilizados en el estudio debido a razones éticas, de estabulación, etc. Por ello, sólo se utilizó un compuesto representativo de esteatosis, como es la tetraciclina. También se estudiaron los cambios metabólicos producidos en animales alimentados con una dieta rica en grasas (esteatosis inducida por dieta).

Los datos bioquímicos obtenidos tras el análisis de muestras de suero de las ratas tratadas con cada una de las condiciones se muestran en la **Tabla 3.14**. Como alteración principal destaca el incremento en los valores de bilirrubina total en suero en los animales tratados con tetraciclina, lo que sugiere un posible daño hepatobiliar, si bien este resultado no vino acompañado de cambios en otros parámetros hepáticos (ALT y AST). No se observaron alteraciones significativas en los otros parámetros analizados tras la exposición al fármaco, a excepción del aumento de glucosa en el caso de las ratas alimentadas con dieta control.

Además, se determinaron los niveles de lípidos totales en tejido hepático de todos los grupos de tratamiento (**Tabla 3.14**). Los resultados muestran que tanto la dieta rica en grasa como la tetraciclina dieron lugar a un aumento significativo de la acumulación de lípidos en el hígado, corroborando la inducción de esteatosis.

Resultados

Tabla 3.14. Análisis clínico de las muestras de suero de ratas tratadas con tetraciclina.

Parámetro	Dieta control Sin tetraciclina	Dieta control Con tetraciclina	Dieta esteatósica Sin tetraciclina	Dieta esteatósica Con tetraciclina
Glucosa (mg/dL)	110 ± 40	180 ± 60*	140 ± 50	140 ± 70
TG (mg/dL)	65 ± 19	40 ± 30	40 ± 18	60 ± 30
Colesterol total (mg/dL)	82 ± 11	90 ± 40	80 ± 13	76 ± 10
Colesterol HDL (mg/dL)	45 ± 9	58 ± 18	44 ± 10	34 ± 13
Bilirrubina total (mg/dL)	0.15 ± 0.03	0.4 ± 0.2*	0.15 ± 0.01	0.65 ± 0.11***
ALT (U/L)	57 ± 13	42 ± 10*	46 ± 5	50 ± 20
AST (U/L)	260 ± 60	190 ± 50*	180 ± 40	150 ± 90
Lípidos en hígado (mg/g de tejido)	9.9 ± 4.9	28.9 ± 9.6*	27.0 ± 14.1	37.8 ± 14.9

Datos expresados como media ± desviación estándar. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 comparando valores sin y con tetraciclina dentro del mismo tipo de dieta. ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; HDL: lipoproteína de alta densidad.

Análisis metabolómico no dirigido mediante LC-QTOF

Las muestras de suero y de tejido hepático de las ratas incluidas en los cuatro grupos de tratamiento (muestras tratadas con dieta control y sin tetraciclina, muestras tratadas con dieta control y con tetraciclina, muestras tratadas con dieta rica en grasas y sin tetraciclina, muestras tratadas con dieta rica en grasas y con tetraciclina) se analizaron mediante LC-MS con las condiciones de análisis lipidómico y general (tejido y suero) e HILIC (tejido). El estudio de las muestras permitió la detección de 1911 variables en las muestras de tejido hepático y 1898 en las muestras de suero.

Resultados

El análisis multivariante de estos datos por PLS-DA ofreció una separación evidente entre los cuatro grupos (**Figura 3.16**). Si bien la separación de grupos con 2 CP fue correcta, tanto en muestras de suero como de tejido hepático, con 3 CP se obtuvo una mejor separación de las clases, por lo que decidimos quedarnos con 3 CP.

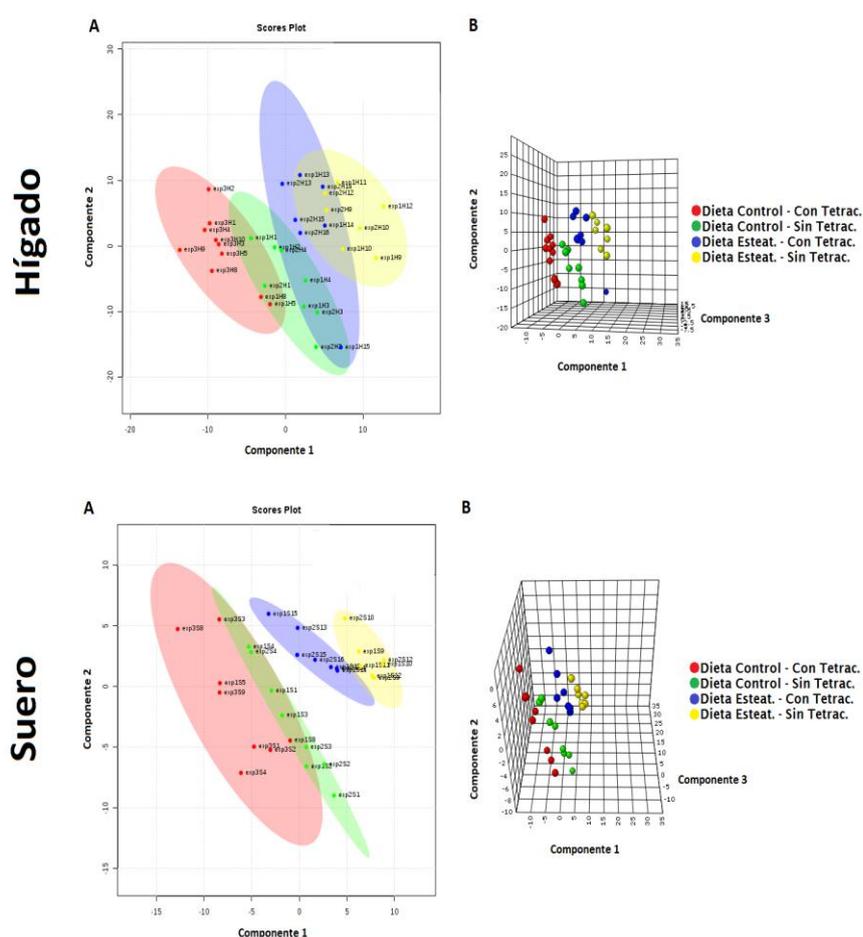


Figura 3.16. A) Diagrama de scores con dos componentes principales y B) con tres componentes principales del análisis PLS-DA realizado sobre las muestras de hígado y suero de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por UPLC-MS con condiciones de análisis lipidómico, general e HILIC. Verde: Muestras tratadas con dieta control y sin tetraciclina; Rojo: Muestras tratadas con dieta control y con tetraciclina; Amarillo: Muestras tratadas con dieta rica en grasas y sin tetraciclina; Azul: Muestras tratadas con dieta rica en grasas y con tetraciclina.

Resultados

Los parámetros de ajuste del modelo se comprobaron mediante CV. En la **Tabla 3.15** pueden verse los valores obtenidos de estos parámetros (R^2 y Q^2) para el modelo PLS-DA con 3 CP, tanto para las muestras de tejido hepático como de suero.

Tabla 3.15. Validación cruzada del modelo PLS-DA obtenido para las muestras de tejido hepático y suero de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por UPLC-MS con condiciones de análisis lipidómico, general e HILIC.

Tejido hepático		Suero	
PLS-DA (3 CP)		PLS-DA (3 CP)	
R^2	Q^2	R^2	Q^2
0.97	0.79	0.98	0.56

En ambos modelos los valores son aceptables. Los valores muy cercanos a 1 de R^2 indican que los modelos explican la varianza de los datos de manera casi completa. Los valores de Q^2 también son buenos, indicando la capacidad predictiva de los modelos, siendo mejor el modelo obtenido a partir de las muestras de tejido hepático.

Muestras de tejido hepático

Tras la identificación de 458 posibles marcadores, obtuvimos 137 biomarcadores con un $VIP > 1$. Estos compuestos fueron en su mayoría compuestos lipídicos (PL, LisoPL, TG...), sales biliares, aminoácidos y compuestos relacionados con EO. En la **Tabla 3.16** puede verse un listado de los compuesto identificados con un $VIP > 1$, agrupados por clases.

Resultados

Tabla 3.16. Variables identificadas con un VIP>1 en el análisis de muestras de tejido hepático de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por UPLC-MS con condiciones de análisis lipidómico, general e HILIC.

Compuesto	Efecto del tratamiento				Efecto de la dieta			
	Dieta Control		Dieta Esteateat.		Sin Tetraciclina		Con Tetraciclina	
	T/C ¹	p-valor ³	T/C ¹	p-valor ³	S/C ²	p-valor ³	S/C ²	p-valor ³
Sales biliares y conjug.								
2OHCA	0.022	0.004	0.09	0.03	0.35	0.07	1.44	0.05
G2OHCA	0.107	0.002	0.07	0.02	1.5	0.4	0.9	0.7
G3OHCA	0.133	0.002	0.149	0.003	1.3	0.7	1.50	0.16
N-linoleoyl taurine	4.9458	0.0009	3.501	0.004	0.9	0.5	0.62	0.11
N-oleoyl taurine	3.289	0.014	4.057	0.003	0.8	0.3	0.9	1.0
N-palmitoyl taurine	3.289	0.008	3.308	0.005	0.42	0.15	0.421	0.06
Sulfoglycolithocholate	0.101491	0.000011	0.148	0.007	0.6	0.3	0.9	0.6
T2OHCA	3.743	0.003	1.1	0.4	1.47	0.09	0.44	0.10
T3OHCA	2.2464	0.0014	2.10	0.03	1.0	0.6	0.9	0.9
Taurine	4.278995	0.000006	4.14109	0.00015	0.9	0.7	0.9	0.5
Aminoácidos y derivados								
Alanine	1.18	0.12	1.478	0.006	0.723	0.11	0.9	0.4
Dimethylglycine	0.274	0.005	0.352	0.005	1.2	0.3	1.6	0.6
Dimethyl-L-arginine	1.2	0.5	1.1	0.8	0.6	0.2	0.60	0.06
Glutamyl-Arginine	1.0	0.8	0.9	0.9	0.7	0.3	0.7	0.2
Glutamyl-Hydroxyproline	5.11	0.08	1.4	0.3	1.45	0.15	0.4	0.8
Tyrosine	0.9	0.8	1.1	0.9	0.65	0.18	0.7	0.3
Compuestos lipídicos								
Carnitines	1.1	0.4	1.0	0.5	1.0	0.8	1.0	0.8
Cer	1.2	0.3	1.1	0.6	0.9	0.3	0.8	0.2
DG	1.387	0.006	1.1	0.6	1.0	0.7	0.733	0.016
AG	0.82	0.03	1.0	0.7	0.733	0.012	0.87	0.16
MG	1.23	0.17	0.9	0.5	1.1	0.7	0.74	0.11
PC	1.0	0.9	1.0	0.6	0.86	0.05	0.9	0.3
PE	1.0	0.7	1.0	0.8	0.9	0.2	0.9	0.6
PG	0.6927	0.0004	1.1	0.5	1.0	0.7	1.63608	0.00010
PI	0.310782	0.000002	1.0	0.8	0.73	0.10	2.3291	0.0004
PS	0.240294	0.000002	0.8	0.5	0.8	0.2	2.596	0.003
SM	1.436	0.019	1.80	0.02	0.9	0.8	1.1	0.5
TG	1.3	0.8	2.02	0.03	1.4	0.4	2.2634	0.0006
LysoPC	1.1	0.6	0.75	0.14	1.27	0.09	0.9	0.7
LysoPE	1.0	0.8	0.78	0.05	1.1	0.3	0.9	0.3
LysoPG	0.542221	0.000006	0.54246	0.00018	1.0	1.0	1.0	1.0
LysoPI	0.310782	0.000002	1.0	0.8	0.73	0.10	2.3291	0.0004
LysoPS	0.8	0.4	0.75	0.17	0.58	0.02	0.542	0.017

Continúa en la página siguiente

Resultados

Compuesto	Efecto del tratamiento				Efecto de la dieta			
	Dieta Control		Dieta Esteat.		Sin Tetraciclina		Con Tetraciclina	
	T/C ¹	p-valor ³	T/C ¹	p-valor ³	S/C ²	p-valor ³	S/C ²	p-valor ³
Estrés Oxidativo								
NAD	0.5182	0.0013	0.6	0.3	1.36	0.15	1.68	0.07
NADP	0.604	0.003	0.54	0.11	1.56	0.07	1.39	0.14
Oxidized Glutathione	1.35	0.13	1.37	0.12	1.0	0.8	1.0	0.7
S-AdenosylHomocysteine	1.329	0.003	1.29	0.05	1.0	0.9	1.0	0.6
Varios								
AMP	0.81	0.08	0.6	0.4	1.39	0.14	1.1	0.3
Ascorbic acid	0.1477	0.0007	0.399	0.012	1.0	1.0	2.7	0.2
Betaine aldehyde	1.2	0.4	1.2	0.3	0.67	0.07	0.71	0.06
Betaine	0.7517	0.0008	0.751	0.014	1.0	0.9	1.0	1.0
Cholesterol sulfate	0.4923	0.0004	0.8	0.4	1.1	0.3	1.895	0.011
Citicoline	0.5	0.4	0.8	0.8	1.93	0.4	2.99	0.05
FAD	1.0	0.8	0.9	0.3	1.15	0.05	1.1	0.3
FMN	1.1	0.5	0.9	0.6	0.8	0.3	0.67	0.05
Galactonic acid	0.41222	0.00004	1.0	0.9	0.8	0.6	1.999	0.003
GMP	0.84	0.10	0.6	0.4	1.94	0.15	1.4	0.2
Guanosine	0.9	1.0	0.8	1.0	2.22	0.05	1.94	0.19
Hydroxykynurenine	1.0	0.9	0.64	0.10	2.59	0.03	1.7	0.6
Hypoxanthine	1.1	0.3	1.0	0.9	0.9	0.2	0.87	0.07
IMP	0.6	0.4	0.4	0.4	1.5	0.2	0.9	0.5
L-Urobilin	0.01402	0.00014	0.02387	0.00019	0.61	0.15	1.0	0.8
Niacinamide	1.0	0.8	1.5	0.2	0.55	0.05	0.8	0.4
Pantothenate	1.20	0.07	1.434	0.009	0.740	0.010	0.9	0.3
Pentose-phosphate	0.8	0.3	0.90	0.12	1.1	0.3	1.3	0.3
Propionylcholine	2.25	0.03	1.41	0.17	1.1	0.6	0.7	0.2
UDP-glucose	0.35	0.03	0.43	0.09	2.12	0.09	2.62	0.06
UDP-N-acetylglucosamine	0.8	0.6	0.9	0.7	2.04	0.05	2.3	0.5
UMP	0.8	0.8	0.5	0.7	2.35	0.11	1.5	0.2
Uric acid	0.5391	0.0008	0.567	0.004	1.1	0.6	1.1	0.6
Uridine	0.9	0.3	1.0	0.6	1.0	0.8	1.2	0.2
Xanthine	1.0	0.5	0.9	0.6	0.9	0.5	0.9	0.3
Xanthosine	1.3	0.3	1.0	0.9	0.8	0.3	0.59	0.08

¹Cociente de intensidades entre muestras con tetraciclina/sin tetraciclina dentro del mismo tipo de dieta.

²Cociente de intensidades entre muestras con dieta esteatósica/dieta control dentro del mismo tipo de tratamiento.

³El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*.

Resultados

En el análisis no supervisado (*Heatmap*) llevado a cabo con las variables identificadas (**Figura 3.17**) podemos observar que la principal separación entre muestras se debe al tratamiento con o sin fármaco esteatósico, es decir, con o sin tetraciclina. A la izquierda del gráfico (colores rojo y azul) encontramos las muestras correspondientes a ratas tratadas con tetraciclina, mientras que a la derecha del gráfico (colores amarillo y verde) encontramos las muestras correspondientes a ratas tratadas con vehículo control. El *Heatmap* también es capaz de separar de forma secundaria, dentro de un mismo tipo de tratamiento con el fármaco, entre dieta control o rica en grasas. Por último, se puede observar como algunas de las especies más significativas (TG, PL, BAs...) se encuentran alteradas según el tratamiento y/o dieta recibida. Tonos azules indican niveles más bajos de cada uno de los metabolitos mientras que tonos rojizos indican niveles más altos de cada uno de los metabolitos (**Figura 3.17**).

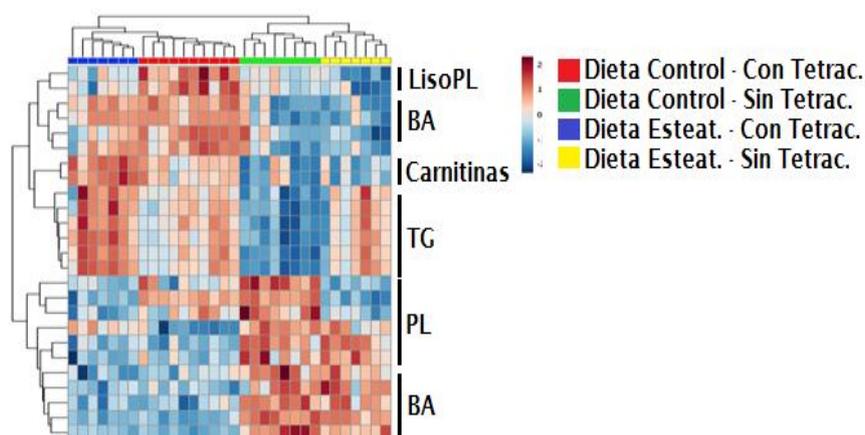


Figura 3.17. *Heatmap* realizado sobre las muestras de hígado de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por UPLC-MS con condiciones de análisis lipídómico, general e HILIC. Distancia Euclídea. Verde: Muestras tratadas con dieta control y sin tetraciclina; Rojo: Muestras tratadas con dieta control y con tetraciclina; Amarillo: Muestras tratadas con dieta rica en grasas y sin tetraciclina; Azul: Muestras tratadas con dieta rica en grasas y con tetraciclina. LisoPL: lisofosfolípidos; BA: ácidos biliares; TG: triglicéridos; PL: fosfolípidos.

Resultados

Las alteraciones más significativas encontradas en las muestras fueron el incremento en los niveles de TG, taurina, sales biliares conjugadas con taurina, GSSG y SAH, así como la disminución en los niveles de AG, dimetilglicina, sales biliares conjugadas con glicina, NAD⁺ y ácido úrico (Figura 3.18).

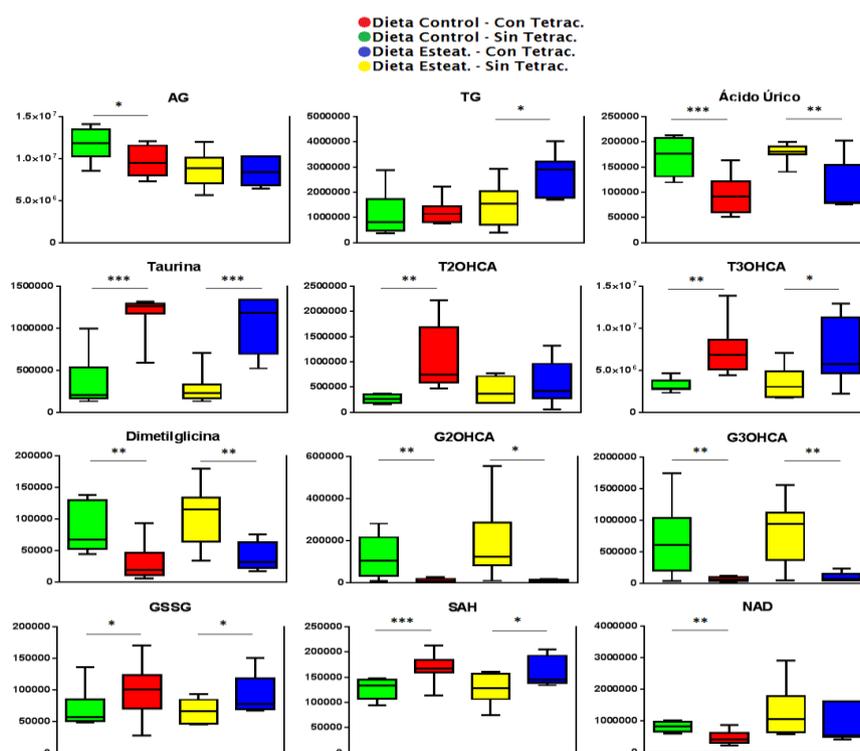


Figura 3.18. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con tetraciclina de las muestras de hígado de ratas analizadas mediante la estrategia de análisis metabólico no dirigido usando la plataforma UPLC-MS y condiciones de análisis lipidómico, general e HILIC. Los valores están expresados como intensidad relativa. Las cajas denotan los rangos intercuartílicos, las líneas denotan las medianas y los bigotes denotan los percentiles 10 y 90. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparando valores sin y con tetraciclina dentro del mismo tipo de dieta. Verde: Dieta control y sin tetraciclina; Rojo: Dieta control y con tetraciclina; Amarillo: Dieta rica en grasas y sin tetraciclina; Azul: Dieta rica en grasas y con tetraciclina. AG: ácidos grasos; TG: triglicéridos; GSSG: glutatión oxidado; SAH: S-(5-adenosyl)-L-homocisteína; NAD: nicotinamida adenina dinucleótido.

Resultados

Muestras de suero

Se identificaron 392 compuestos, de los cuales 109 tenían un VIP>1. Estos compuestos fueron en su mayoría compuestos lipídicos (PL, LisoPL, carnitinas, SM, TG...) y aminoácidos. En la **Tabla 3.17** puede verse un listado de los compuestos identificados con un VIP>1, agrupados por clases.

Mediante un análisis no supervisado (*Heatmap*) llevado a cabo con las variables identificadas (**Figura 3.19**) podemos observar que la principal separación entre muestras se debe al tratamiento con tetraciclina. A la izquierda del gráfico (colores rojo y azul) encontramos las muestras correspondientes a ratas tratadas con tetraciclina y a la derecha (colores amarillo y verde) las muestras de las ratas tratadas con vehículo control. En este caso la separación según el tipo de dieta no se logró en las muestras de tratamiento con tetraciclina pero sí en las no tratadas con el fármaco. Por último, se puede observar como algunos de los metabolitos (AG, BA, carnitinas...) se encuentran alterados según el tratamiento recibido. Tonos azules indican niveles más bajos de cada uno de los metabolitos mientras que tonos rojizos indican niveles más altos de cada uno de los metabolitos (**Figura 3.19**).

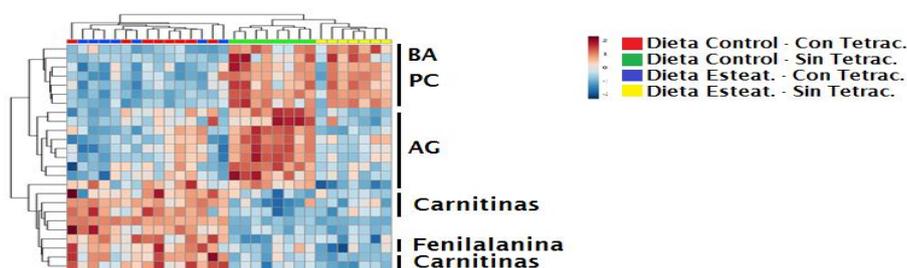


Figura 3.19. *Heatmap* realizado sobre las muestras de suero de ratas tratadas con tetraciclina analizadas por UPLC-MS de análisis lipídico y general. Distancia Euclídea. Verde: Muestras tratadas con dieta control y sin tetraciclina; Rojo: Muestras tratadas con dieta control y con tetraciclina; Amarillo: Muestras tratadas con dieta rica en grasas y sin tetraciclina; Azul: Muestras tratadas con dieta rica en grasas y con tetraciclina. BA: ácidos biliares; PC: fosfatidilcolinas; AG: ácidos grasos.

Resultados

Tabla 3.17. Variables identificadas con un VIP>1 en el análisis de muestras de suero de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por UPLC-MS con condiciones de análisis lipídico y general.

Compuesto	Efecto del tratamiento				Efecto de la dieta			
	Dieta Control		Dieta Esteat.		Sin Tetraciclina		Con Tetraciclina	
	T/C ¹	p-valor ³	T/C ¹	p-valor ³	S/C ²	p-valor ³	S/C ²	p-valor ³
Sales biliares y conjugados								
G2OHCA	0.0590	0.0017	0.063	0.016	1.1	0.7	1.2	0.4
G3OHCA	0.45	0.05	0.18	0.07	2.33	0.16	0.9	0.4
T3OHCA	6.251	0.002	6.595	0.010	0.9	0.5	0.9	0.9
Aminoácidos y derivados								
Glycine	1.367	0.018	1.27	0.04	1.0	1.0	0.9	0.4
Leucine	1.43	0.05	1.54	0.02	0.9	0.4	0.9	0.6
N-palmitoyl histidine	0.009	0.004	0.02	0.01	0.45	0.12	0.9	0.5
Phenyl-alanine	1.566	0.012	1.645	0.003	0.86	0.04	0.9	0.5
Tyrosine	1.12	0.04	1.2	0.5	0.8	0.2	0.80	0.12
Compuestos lipídicos								
Carnitinas	1.30	0.08	1.673	0.014	0.76	0.02	1.0	0.9
ChE	1.2	0.8	0.9	0.4	0.8	0.3	0.64	0.17
Cer	1.0	0.9	1.0	0.6	0.6	0.2	0.63	0.07
DG	1.28	0.05	1.2	0.2	0.9	0.4	0.81	0.12
AG	0.5293	0.0008	0.9	0.4	0.469	0.006	0.79	0.15
MG	0.9	0.7	1.1	0.6	0.705	0.007	0.78	0.06
PC	0.9	0.3	1.0	0.7	1.0	0.8	1.20	0.10
PE	0.8	0.3	0.9	0.6	0.8	0.3	0.9	0.4
PI	1.36	0.07	1.333	0.019	0.77	0.10	0.75	0.08
PS	0.145	0.005	0.23	0.07	1.0	0.8	1.7	0.3
SM	0.9	1.0	1.26	0.07	0.9	0.4	1.2	0.5
TG	0.57	0.17	1.4	0.3	0.32	0.04	0.8	0.3
Lysine	1.30	0.04	1.13	0.16	1.0	1.0	0.9	0.2
LysoPC	0.64	0.07	0.73	0.18	0.7	0.2	0.78	0.19
LysoPE	0.9	0.4	0.9	0.4	0.9	0.4	0.9	0.5

Continúa en la página siguiente

Resultados

Compuesto	Efecto del tratamiento				Efecto de la dieta			
	Dieta Control		Dieta Esteat.		Sin Tetraciclina		Con Tetraciclina	
	T/C ¹	p-valor ³	T/C ¹	p-valor ³	S/C ²	p-valor ³	S/C ²	p-valor ³
Estrés Oxidativo								
S-AdenosylHomocysteine	1.36	0.04	1.4	0.4	0.6	0.2	0.67	0.10
Varios								
Betaine	1.0	0.8	1.1	0.5	0.74	0.04	0.83	0.15
Cholesterol sulfate	0.297	0.010	0.34	0.08	1.3	0.6	1.5	0.3
Dihydroxycholesterol	0.077	0.008	0.118	0.002	0.7	0.4	1.1	0.5
Propionylcholine	4.048	0.006	1.40	0.08	1.2	0.6	0.42	0.05
Ricinoleic acid	1.0	0.4	0.9	0.5	0.6594	0.13	0.6	0.3
Tryptophan	1.514	0.016	1.34	0.06	1.0	1.0	0.9	0.4

¹Cociente de intensidades entre muestras con tetraciclina/sin tetraciclina dentro del mismo tipo de dieta.

²Cociente de intensidades entre muestras con dieta esteatósica/dieta control dentro del mismo tipo de tratamiento.

³El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*.

Las alteraciones más significativas encontradas en las muestras de suero fueron el incremento en los niveles de carnitinas, fenilalanina y sales biliares conjugadas con taurina, así como la disminución en los niveles de AG y sales biliares conjugadas con glicina (**Figura 3.20**).

Resultados

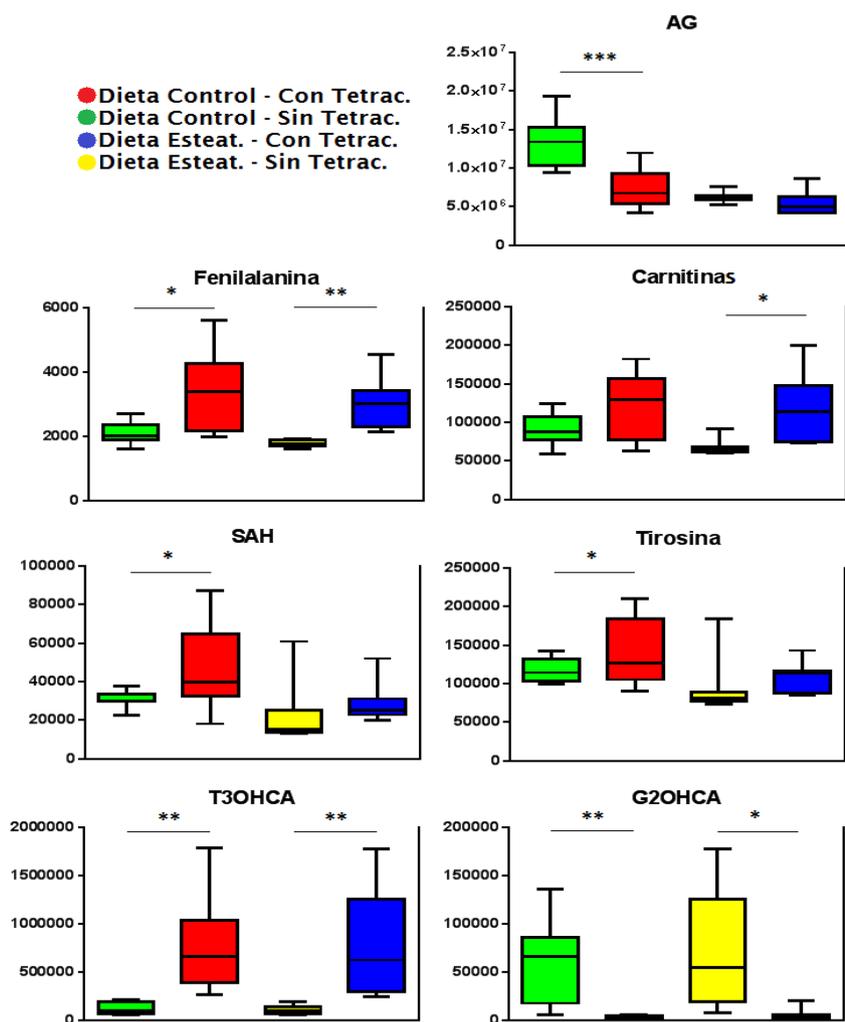


Figura 3.20. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con tetraciclina de las muestras de suero de ratas analizadas mediante la estrategia de análisis metabólico no dirigido usando la plataforma UPLC-MS y condiciones de análisis lipidómico y general. Los valores están expresados como intensidad relativa. Las cajas denotan los rangos intercuartílicos, las líneas denotan las medianas y los bigotes denotan los percentiles 10 y 90. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparando valores sin y con tetraciclina dentro del mismo tipo de dieta. Verde: Dieta control y sin tetraciclina; Rojo: Dieta control y con tetraciclina; Amarillo: Dieta rica en grasas y sin tetraciclina; Azul: Dieta rica en grasas y con tetraciclina. AG: ácidos grasos; SAH: S-(5-adenosyl)-L-homocisteína.

Resultados

Análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma GC-QTOF

Para completar el estudio de las muestras de suero e hígado de ratas tratadas con tetraciclina y analizadas por LC-MS, se realizó un estudio metabólico paralelo usando la plataforma analítica GC-MS.

El estudio de las muestras permitió la detección de 283 variables en las muestras de tejido hepático y 260 en las muestras de suero.

El análisis multivariante de estos datos por PLS-DA reveló que con 2 CP se producía solapamiento de clases, mientras que con 3 CP había una separación evidente entre los cuatro grupos de muestras (**Figura 3.21**). Por lo tanto, nos quedamos con 3 CP.

Los parámetros de ajuste del modelo se comprobaron mediante CV. En la **Tabla 3.18** pueden verse los valores obtenidos de los parámetros R^2 y Q^2 para el modelo PLS-DA con 3 CP, tanto para las muestras de tejido hepático como de suero.

Tabla 3.18. Validación cruzada del modelo PLS-DA obtenido para las muestras de tejido hepático y suero de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por GC-MS.

Tejido hepático		Suero	
PLS-DA (3 CP)		PLS-DA (3 CP)	
R^2	Q^2	R^2	Q^2
0.96	0.44	0.97	0.61

En ambos modelos los valores de R^2 son muy cercanos a 1, indicando que los modelos explican la varianza de los datos de manera casi completa. Los valores de Q^2 son aceptables, indicando una capacidad predictiva de los modelos adecuada.

Resultados

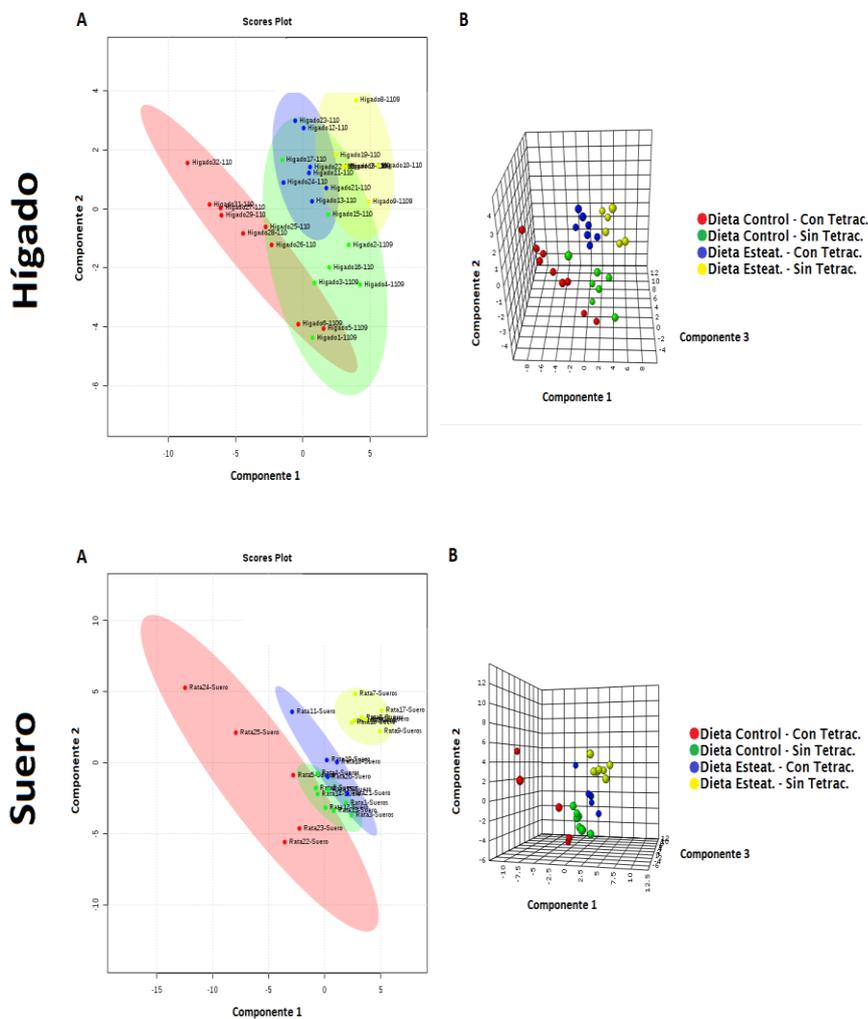


Figura 3.21. A) Diagrama de scores con dos componentes principales y B) con tres componentes principales del análisis PLS-DA realizado sobre las muestras de hígado y suero de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por GC-MS. Verde: Muestras tratadas con dieta control y sin tetraciclina; Rojo: Muestras tratadas con dieta control y con tetraciclina; Amarillo: Muestras tratadas con dieta rica en grasas y sin tetraciclina; Azul: Muestras tratadas con dieta rica en grasas y con tetraciclina.

Resultados

Muestras de tejido hepático

Se identificaron 110 posibles marcadores, 30 de ellos con un $VIP > 1$. Estos compuestos fueron en su mayoría aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos. En la **Tabla 3.19** puede verse un listado de los compuesto identificados con un $VIP > 1$.

Mediante un análisis no supervisado de los datos (*Heatmap*) con las variables identificadas, podemos observar que la principal separación entre muestras se debe al tratamiento con o sin tetraciclina (**Figura 3.22**). A la izquierda del gráfico (colores amarillo y verde) encontramos las muestras correspondientes a ratas no tratadas con el fármaco, mientras que a la derecha (colores rojo y azul) encontramos las muestras correspondientes a ratas tratadas con tetraciclina. En este caso también se observa una tendencia en la separación de las muestras según el tipo de dieta administrada, aunque no de forma tan evidente. Por último, se puede observar cómo algunos de los metabolitos se encuentran alterados según el tratamiento recibido. Tonos azules indican niveles más bajos de cada uno de los metabolitos mientras que tonos rojizos indican niveles más altos de cada uno de los metabolitos (**Figura 3.22**).

Resultados

Tabla 3.19. Variables identificadas con un VIP>1 en el análisis de muestras de tejido hepático de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por GC-MS.

Compuesto	Efecto del tratamiento				Efecto de la dieta			
	Dieta Control		Dieta Esteat.		Sin Tetraciclina		Con Tetraciclina	
	T/C ¹	p-valor ³	T/C ¹	p-valor ³	S/C ²	p-valor ³	S/C ²	p-valor ³
1-2-3-Propanetricarboxilic	0.8	0.5	0.9	0.8	1.23	0.19	1.3	0.3
13-Octadecenoic-acid	0.8	0.3	1.25	0.03	0.63	0.09	1.0	0.6
1-5-Anhydro-D-sorbitol	0.83	0.08	0.803	0.019	1.1	0.4	1.0	0.9
2-Butenoic-acid	0.9	0.2	0.9	0.3	1.0	0.8	1.1	0.5
2-Ketoglutaric-acid	0.9	0.8	0.83	0.19	1.26	0.20	1.2	0.7
4-hydroxypyridine	0.75	0.02	0.7306	0.0008	1.23	0.02	1.19	0.17
4-methylbenzoate	1.58	0.07	1.3	0.3	0.8	0.4	0.7	0.4
5-β-cholestan-3α-ol-propionate	1.83	0.13	0.7	0.3	1.0	1.0	0.41	0.08
9-17-Octadecadienal	1.67	0.09	1.2	0.6	0.8	0.4	0.55	0.05
Adonitol	0.8	0.6	1.1	1.0	1.2	0.4	1.57	0.12
β-Alanine	0.647	0.007	0.705	0.005	1.1	0.4	1.2	0.2
D-Allose	0.8	0.6	1.3	0.5	1.1	0.5	1.89	0.09
Diheptylpentylamine	0.69	0.19	0.8	0.3	1.4	0.5	1.55	0.10
DL-Ornithine	0.68	0.03	0.75	0.06	1.0	0.8	1.1	0.6
D-Galactose	2.6134	0.0007	2.2	0.4	1.0	0.2	0.9	0.5
D-Lyxose	0.632	0.006	0.9	0.4	0.9	0.4	1.35	0.09
D-Ribofuranose-phosphate	0.6	0.3	0.562	0.014	1.4	0.6	1.2	0.9
D-Ribose-phosphate	0.8	0.3	0.59	0.09	1.4	0.3	1.0	0.9
Glycylglycine	0.685	0.013	0.73	0.15	1.1	0.6	1.2	0.2
L-Arabitol	1.3	0.03	1.2	0.5	1.68	0.07	1.60	0.07
L-Isoleucine	0.701	0.012	0.729	0.018	1.0	0.9	1.0	1.0
L-Leucine	0.3747	0.0008	0.7	0.4	0.8	0.8	1.52	0.19
L-Methionine	9.4141	0.0005	2.07	0.19	1.2	0.3	0.27	0.15
L-threonine	0.8	0.2	1.22	0.13	1.0	0.7	1.42	0.03
L-Valine	0.2191	0.0007	0.46	0.12	0.7	0.7	1.6	0.4
N-Acetyl-D-galagalactosaminitol	0.67	0.08	1.1	0.5	1.1	0.5	1.7	0.3
N-Acetyl-D-glucosamine	0.661	0.014	0.54156	0.00019	1.28	0.06	1.1	0.9
Pantothenic-acid	1.0	0.9	1.0	0.7	1.3	0.2	1.3	0.3
Phosphoric-acid-monomethyl	0.66	0.04	1.2	0.3	1.1	0.7	1.96	0.10
Uridine	1.41	0.20	0.57	0.05	1.1	1.0	0.45	0.02

¹Cociente de intensidades entre muestras con tetraciclina/sin tetraciclina dentro del mismo tipo de dieta.

²Cociente de intensidades entre muestras con dieta esteatósica/dieta control dentro del mismo tipo de tratamiento.

³El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*.

Resultados

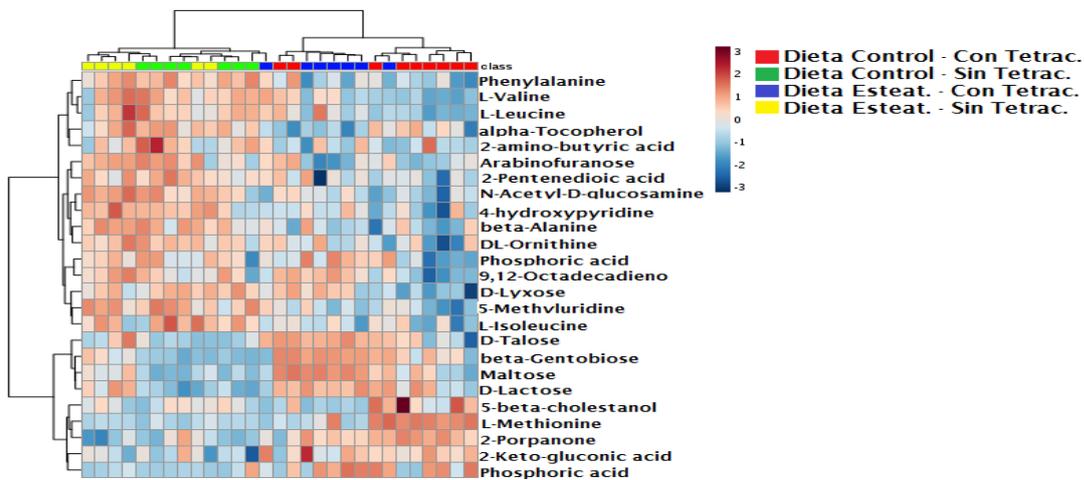


Figura 3.22. *Heatmap* realizado sobre las muestras de hígado de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por GC-MS. Distancia Euclídea. Verde: Muestras tratadas con dieta control y sin tetraciclina; Rojo: Muestras tratadas con dieta control y con tetraciclina; Amarillo: Muestras tratadas con dieta rica en grasas y sin tetraciclina; Azul: Muestras tratadas con dieta rica en grasas y con tetraciclina.

Las principales alteraciones significativas encontradas fueron el aumento en los niveles de algunos azúcares como el arabitol o la galactosa, así como la disminución en los niveles de algunos aminoácidos (alanina, isoleucina, leucina, valina...) y en los niveles de N-acetilglucosamina (**Figura 3.23**).

Resultados

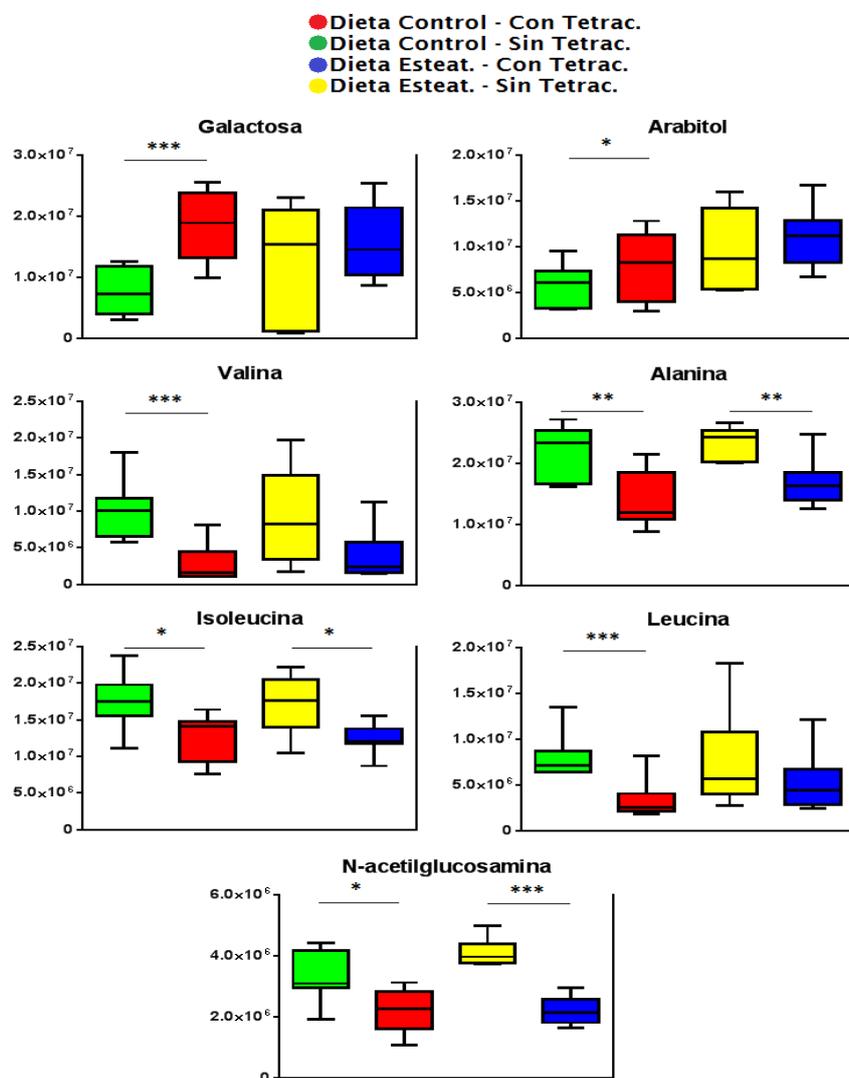


Figura 3.23. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con tetraciclina de las muestras de hígado de ratas analizadas mediante la estrategia de análisis metabólico no dirigido usando la plataforma GC-MS. Los valores están expresados como intensidad relativa. Las cajas denotan los rangos intercuartílicos, las líneas denotan las medianas y los bigotes denotan los percentiles 10 y 90. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparando valores sin y con tetraciclina dentro del mismo tipo de dieta. Verde: Dieta control y sin tetraciclina; Rojo: Dieta control y con tetraciclina; Amarillo: Dieta rica en grasas y sin tetraciclina; Azul: Dieta rica en grasas y con tetraciclina.

Resultados

Finalmente, un análisis de enriquecimiento funcional reveló que las rutas metabólicas más alteradas, de manera significativa, fueron la biosíntesis de proteínas, la ruta de degradación de la valina, leucina e isoleucina, así como el metabolismo del propanoato (**Tabla 3.20**).

Tabla 3.20. Rutas metabólicas alteradas obtenidas mediante un análisis de enriquecimiento funcional de las muestras de hígado de ratas analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma GC-MS.

Ruta metabólica	Total	Hits	<i>p</i> -valor
Biosíntesis de proteínas	19	5	9.61E-06
Degradación de la valina, leucina e isoleucina	36	3	0.0242
Metabolismo del propanoato	18	2	0.0399

Muestras de suero

Se identificaron 179 posibles marcadores, 38 de ellos con un VIP>1. Estos compuestos fueron en su mayoría, al igual que en las muestras de hígado, aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos. En la **Tabla 3.21** puede verse un listado de los compuesto identificados con un VIP>1.

Resultados

Tabla 3.21. Variables identificadas con un VIP>1 en el análisis de muestras de suero de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por GC-MS.

Compuesto	Efecto del tratamiento				Efecto de la dieta			
	Dieta Control		Dieta Esteat.		Sin Tetraciclina		Con Tetraciclina	
	T/C ¹	p-valor ³	T/C ¹	p-valor ³	S/C ²	p-valor ³	S/C ²	p-valor ³
1H-Indole-3-ethanamine	0.8	0.6	0.9	0.4	1.395	0.014	1.5	0.2
2-3-Dihydroxybutanoic-acid	0.50	0.07	1.30	0.09	0.9	0.3	2.32	0.12
2-3H-Furanone	2.56	0.14	2.62	0.11	0.7	0.5	0.7	0.5
2- α -Mannobiose	1.4	0.5	2.52	0.05	0.70	0.17	1.3	0.4
2-Butenedioic-acid	0.58	0.09	1.30	0.09	0.9	0.3	1.99	0.05
2-Keto-3-methylvaleric-acid	1.3	0.3	1.2	0.2	0.74	0.20	0.7	0.3
2-Keto-l-gluconic-acid	1.0	0.8	1.50	0.11	0.9	0.6	1.3	0.4
2-Propenoic-acid	0.6	0.2	1.3	0.3	1.0	0.8	1.96	0.10
Alanine	0.8	0.2	1.37	0.19	0.9	0.4	1.5	0.2
α -Tocopherol	0.472	0.003	0.720	0.003	0.87	0.15	1.3	0.4
Benzeneacetic-acid	1.0	0.7	1.5	0.2	0.6	0.2	1.0	0.6
Butanal	1.0	0.8	1.3	0.4	0.60	0.03	0.8	0.4
Butanoic-acid	2.83	0.02	2.55	0.14	1.3	0.5	1.1	0.9
Butyric-acid	1.1	0.7	1.41	0.05	0.57	0.05	0.74	0.10
D-Glucopyranose	0.26	0.06	0.50	0.12	0.9	0.8	1.7	0.5
D-Glucose	0.9	0.7	0.6	0.4	1.88	0.18	1.4	0.5
D-Ribofuranose	0.8	0.4	1.2	0.3	1.1	0.6	1.66	0.20
D-Sorbitol	1.857	0.014	1.46	0.09	1.1	0.2	0.9	0.6
D-Talose	0.8	0.7	1.4	0.6	1.3	1.0	2.1	0.4
Hexanedioic-acid	0.18	0.08	0.126	0.011	1.3	1.0	0.9	1.0
Inositol	0.65	0.05	0.5370	0.0004	1.0	0.5	0.9	0.4
Lactose	0.32	0.08	1.0	0.7	0.9	0.8	2.91	0.08
L-Aspartic-acid	0.6	0.4	2.4	0.3	1.3	0.6	5.54	0.06
L-Cystine	1.70	0.02	2.02	0.16	0.9	0.2	1.0	0.6
L-Isoleucine	0.64	0.12	0.9	0.6	1.2	0.8	1.70	0.12
L-Lactic-acid	0.73	0.04	0.9	0.4	1.1	0.5	1.33	0.09
L-Leucine	0.9	0.3	1.23	0.13	1.0	0.6	1.32	0.11
L-Lysine	1.0	0.7	1.1	1.0	0.8	0.3	0.9	0.5
L-Methionine	0.9	0.4	0.9	0.8	1.1	0.8	1.2	0.3
L-Proline	0.592	0.003	0.9	0.9	0.9	0.5	1.41	0.18
L-Threonine	1.62	0.04	1.2	0.4	0.9	0.5	0.66	0.10
L-Valine	0.83	0.14	1.21	0.12	1.0	0.6	1.39	0.05
Maltose	1.61	0.15	0.9	0.9	0.9	0.8	0.5	0.2
N-Acetyltyrosine	0.69	0.17	1.0	0.9	0.39	0.14	0.5	0.7
N- α -Acetyl-L-Lysine	0.6	0.5	1.3	0.5	1.4	0.2	2.90	0.10
Ornithine	1.3	0.5	2.54	0.19	0.5	0.3	0.9	0.7
Pyrimidine	0.58	0.09	1.30	0.09	0.9	0.3	1.989	0.012
Quinoline	0.8	0.5	1.3	0.5	1.1	0.7	1.83	0.15
Serine	1.3	0.9	1.57	0.14	1.0	0.8	1.3	0.3

Resultados

¹Cociente de intensidades entre muestras con tetraciclina/sin tetraciclina dentro del mismo tipo de dieta.

²Cociente de intensidades entre muestras con dieta esteatósica/dieta control dentro del mismo tipo de tratamiento.

³El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*.

Mediante un análisis no supervisado de los datos (*Heatmap*), llevado a cabo con las variables identificadas, podemos observar que la principal separación entre muestras se debe al tratamiento con o sin tetraciclina (**Figura 3.24**). A la izquierda del gráfico (colores rojo y azul) encontramos las muestras de las ratas tratadas con tetraciclina, mientras que a la derecha del gráfico (colores verde y amarillo) encontramos las muestras correspondientes a las ratas no tratadas. El Heatmap también es capaz de separar de forma secundaria, dentro de un mismo tipo de tratamiento con el fármaco, entre dieta control o rica en grasas casi de forma completa. Por último, se puede observar como algunos de los metabolitos se encuentran alterados según el tratamiento recibido. Tonos azules indican niveles más bajos de cada uno de los metabolitos mientras que tonos rojizos indican niveles más altos de cada uno de los metabolitos (**Figura 3.24**).

Resultados

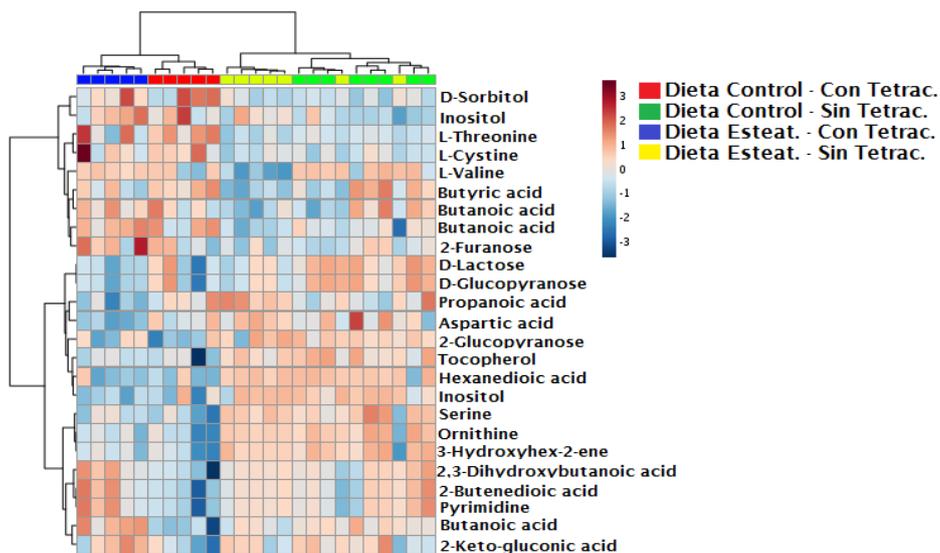


Figura 3.24. *Heatmap* realizado sobre las muestras de suero de ratas tratadas con tetraciclina y dieta, analizadas por GC-MS. Distancia Euclídea. Verde: Muestras tratadas con dieta control y sin tetraciclina; Rojo: Muestras tratadas con dieta control y con tetraciclina; Amarillo: Muestras tratadas con dieta rica en grasas y sin tetraciclina; Azul: Muestras tratadas con dieta rica en grasas y con tetraciclina.

Las alteraciones más significativas fueron el aumento en los niveles de algunos azúcares como el sorbitol, así como la disminución en los niveles de algunos aminoácidos esenciales (prolina...), al igual que pasaba en las muestras de hígado. También disminuyeron los niveles de tocoferol e inositol (**Figura 3.25**).

Finalmente, un análisis de enriquecimiento funcional reveló que las rutas metabólicas más alteradas, de manera significativa, fueron la biosíntesis de proteínas, el metabolismo de la galactosa y la degradación de valina, leucina e isoleucina (**Tabla 3.22**).

Resultados

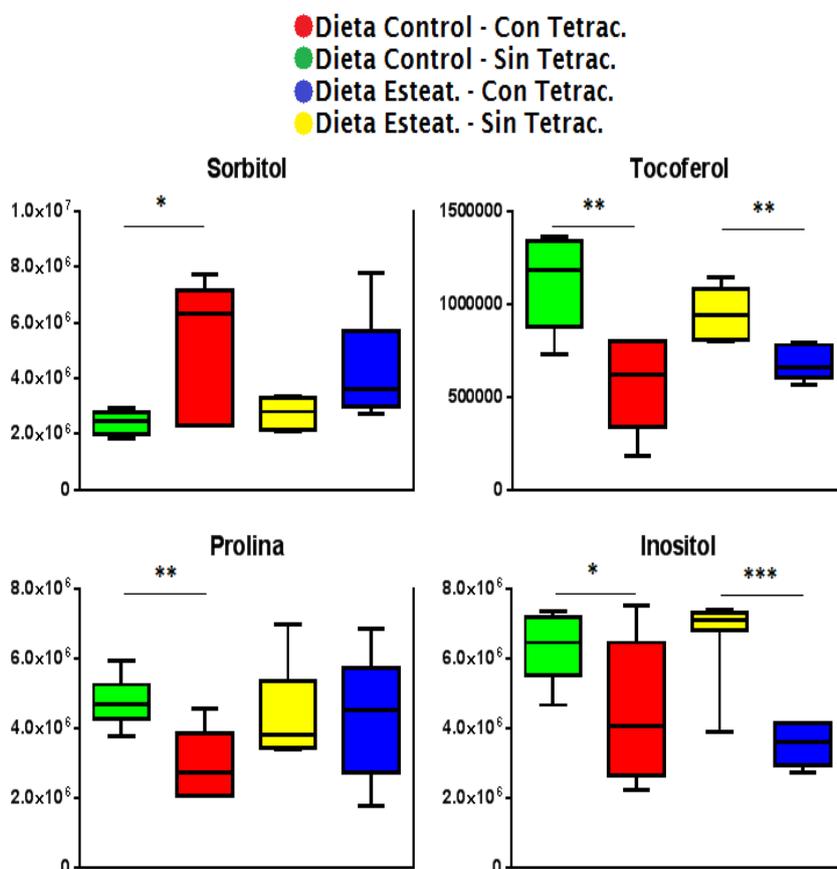


Figura 3.25. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes asociados al tratamiento con tetraciclina de las muestras de suero de ratas analizadas mediante la estrategia de análisis metabólico no dirigido usando la plataforma GC-MS. Los valores están expresados como intensidad relativa. Las cajas denotan los rangos intercuartílicos, las líneas denotan las medianas y los bigotes denotan los percentiles 10 y 90. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparando valores sin y con tetraciclina dentro del mismo tipo de dieta. Verde: Dieta control y sin tetraciclina; Rojo: Dieta control y con tetraciclina; Amarillo: Dieta rica en grasas y sin tetraciclina; Azul: Dieta rica en grasas y con tetraciclina.

Resultados

Tabla 3.22. Rutas metabólicas alteradas obtenidas mediante un análisis de enriquecimiento funcional de las muestras de suero de ratas analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma GC-MS.

Ruta metabólica	Total	Hits	<i>p</i> -valor
Biosíntesis de proteínas	19	7	9.71E-08
Metabolismo de la galactosa	25	3	0.0228
Degradación de la valina, leucina e isoleucina	36	3	0.0491

3.4 Estudios metabolómicos en pacientes diagnosticados con EHNA

Después de llevar a cabo estudios metabolómicos con modelos *in vitro* e *in vivo*, el siguiente paso fue analizar muestras humanas ya que en última instancia nuestro objetivo era estudiar la esteatosis hepática, así como las patologías más severas de la EHGNA, en humanos. Se llevó a cabo un estudio con muestras de suero humano de pacientes sin lesión hepática (control) y pacientes diagnosticados con EHNA mediante biopsia hepática y scan. En un primer estudio se utilizó un número reducido de muestras (10 de cada tipo) para comprobar si se apreciaban cambios metabólicos importantes que nos hicieran pensar si podía ser interesante ampliar el estudio a un mayor número de muestras.

El estudio metabolómico se llevó a cabo mediante la plataforma GC-MS. El estudio de las muestras de suero humano permitió la detección de 116 variables capaces de separar entre los dos grupos de estudio.

El análisis multivariante de estos datos por PLS-DA reveló que con 2 CP se producía una separación evidente de las dos clases de muestras (Figura 3.26).

Resultados

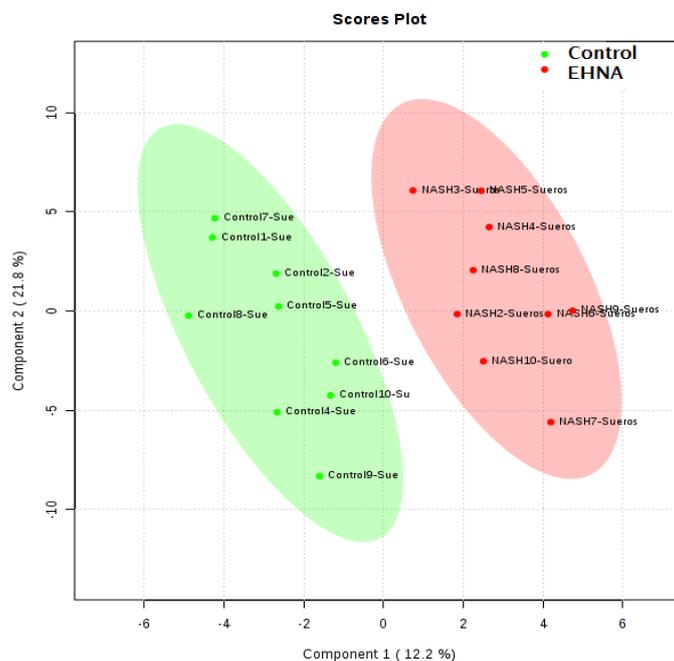


Figura 3.26. Diagrama de scores con dos componentes principales del análisis PLS-DA realizado sobre las muestras de suero humano de pacientes diagnosticados con EHNA analizadas por GC-MS. Verde: Muestras de pacientes control Rojo: Muestras de pacientes con EHNA.

Los parámetros de ajuste del modelo se comprobaron mediante CV (Tabla 3.23). El valor cercano a 1 de R^2 indica que el modelo explica la varianza de los datos de forma muy buena. El valor de Q^2 es aceptable e indica una correcta capacidad predictiva del modelo.

Tabla 3.23. Validación cruzada del modelo PLS-DA con 2 CP obtenido para las muestras de suero humano analizadas por GC-MS.

Suero humano	
PLS-DA (2 CP)	
R^2	Q^2
0.91	0.53

Resultados

A continuación, se buscaron posibles alteraciones en el metaboloma. Se identificaron 98 posibles marcadores en los sueros humanos, encontrándose 22 metabolitos con un VIP>1 (Tabla 3.24).

Tabla 3.24. Variables identificadas con un VIP>1 en el análisis de muestras de suero humano, analizadas por GC-MS.

Compuesto	VIP	EHNA/Control ¹	p-valor ²
Acetamide	1.9612	1.81	0.06
Alanine	1.6493	0.66	0.03
Butanoic acid	2.182	2.222	0.11
Cholesterol	1.3393	1.12	0.04
Dihydroxybutanoic acid	1.4552	2.98	0.06
D-Turanose	1.5404	0.68	0.07
Ethanedioic acid	2.1535	0.68	0.08
Glucaric acid	1.0942	1.48	0.15
Heptanedioic acid	1.6422	1.62	0.05
L-Isoleucine	1.2356	1.24	0.14
L-Leucine	1.3321	1.61	0.08
L-Norvaline	1.9614	1.81	0.05
L-Proline	1.7082	1.43	0.05
L-Threonic acid	1.7959	1.430	0.08
L-Tyrosine	1.2772	1.62	0.13
L-Valine	1.2484	1.23	0.15
Octadecenoic acid	1.467	2.81	0.11
Propanoic acid	1.1083	2.21	0.13
Purine	1.2155	1.5	0.3
Serine	2.1349	0.284	0.009

¹Cociente de intensidades entre muestras de pacientes con EHNA/muestras de pacientes control ²El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*.

Resultados

Mediante un análisis no supervisado de los datos (*Heatmap*), llevado a cabo con las variables identificadas, podemos observar una separación completa de los dos grupos de muestras, pacientes control y pacientes con EHNA (**Figura 3.27**). Tonos azules indican niveles más bajos de cada uno de los metabolitos mientras que tonos rojizos indican niveles más altos.

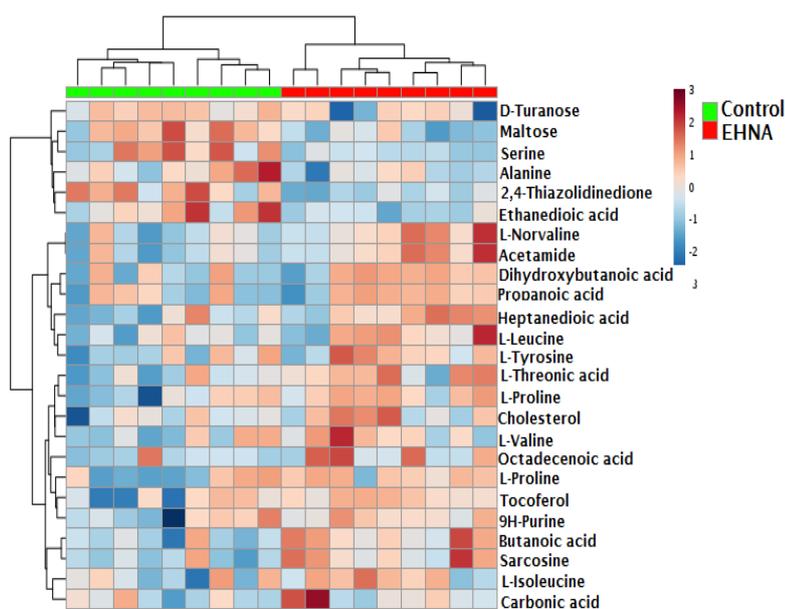


Figura 3.27. *Heatmap* realizado sobre las muestras de suero humano de pacientes diagnosticados con EHNA analizadas por GC-MS. Distancia Euclídea. Verde: Muestras de pacientes control; Rojo: Muestras de pacientes con EHNA.

Las alteraciones más significativas encontradas en las muestras de suero de los pacientes diagnosticados con EHNA fueron el aumento en los niveles de colesterol y la disminución en los niveles de algunos aminoácidos, tales como alanina o serina (**Figura 3.28**).

Resultados

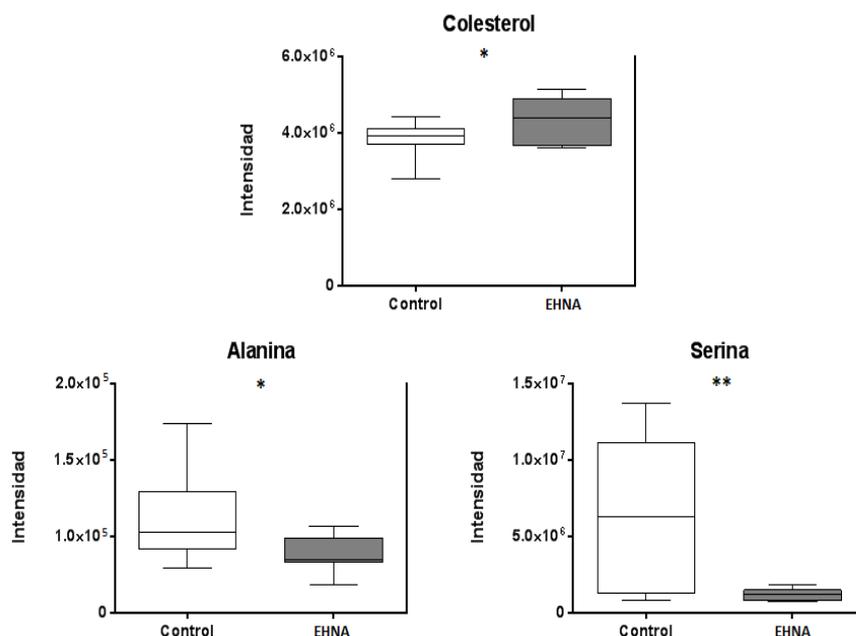


Figura 3.28. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes a las muestras de suero humano de pacientes diagnosticados con EHNA analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma GC-MS. Los valores están expresados como intensidad relativa. Las cajas denotan los rangos intercuartílicos, las líneas denotan las medianas y los bigotes denotan los percentiles 10 y 90. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Finalmente, un análisis de enriquecimiento funcional reveló que las rutas metabólicas alteradas de forma significativa fueron la biosíntesis de proteínas y el metabolismo de la fenilalanina y la tirosina (**Tabla 3.25**).

Tabla 3.25. Rutas metabólicas alteradas obtenidas mediante un análisis de enriquecimiento funcional de las muestras de suero humano analizadas mediante la estrategia de análisis metabolómico no dirigido usando la plataforma GC-MS.

Ruta metabólica	Total	Hits	<i>p</i> -valor
Biosíntesis de proteínas	19	6	3.78E-06
Metabolismo de la fenilalanina y tirosina	13	2	0.0443

Resultados

Mediante la plataforma GC-MS se obtuvo un modelo capaz de separar las muestras control de las diagnosticadas con EHNA, pero no se consiguió obtener una gran cantidad de información sobre la alteración del metaboloma. Por ello, se optó por llevar a cabo un estudio usando la plataforma analítica LC-MS, capaz de aportar una cobertura metabólica distinta. Se aplicó la plataforma LC-MS bajo las condiciones RP e HILIC para asegurar una mayor cobertura del metaboloma. Para que los resultados fuesen más consistentes, se amplió el número de muestras analizadas a 48 muestras diagnosticadas mediante biopsia hepática y scan con algún grado de EHGNA, y 15 muestras control. Vista la excelente separación entre muestras control y EHNA en el experimento anterior, comprobamos si éramos capaces de separar no sólo entre los dos tipos de muestra, sino también entre distintos estadios de EHGNA. Los datos más relevantes de la cohorte usada en el estudio pueden observarse en la **Tabla 3.26**.

Resultados

Tabla 3.26. Descripción de la cohorte en estudio. Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar o como número de casos.

	Control (N=15)	NAS<5 (N=28)	NAS \geq 5 (N=20)	<i>p</i> -valor ¹		
				Control NAS<5	Control NAS \geq 5	NAS<5 NAS \geq 5
Sexo						
Hombre	2	9	6			
Mujer	13	19	14			
Edad (años)	42 \pm 13	56 \pm 13	53 \pm 12	0.004	0.02	0.4
Esteatosis						
0	15	0	0			
1	0	19	0			
2	0	7	6			
3	0	2	14			
Fibrosis						
0	15	24	2			
1	0	4	3			
2	0	0	3			
3	0	0	10			
4	0	0	2			
Inflamación						
0	15	16	0			
1	0	12	14			
2	0	0	6			
Balonización						
0	15	22	0			
1	0	6	6			
2	0	0	14			
IMC (kg/m²)	26 \pm 5	31 \pm 7	32 \pm 6	0.011	0.03	0.5
Glucosa (mg/dl)	93 \pm 14	110 \pm 40	120 \pm 40	0.11	0.010	0.08
Colesterol total(mg/dl)	200 \pm 30	200 \pm 30	210 \pm 40	0.8	0.4	0.3
Colesterol HDL(mg/dl)	55 \pm 11	47 \pm 10	46 \pm 14	0.08	0.19	0.8
Triglicéridos (mg/dl)	110 \pm 70	140 \pm 60	220 \pm 120	0.019	0.0009	0.005
AST (IU/L)	16 \pm 5	26 \pm 14	70 \pm 50	0.002	< 0.0001	< 0.0001
<37	15	25	5			
37-74	0	1	7			
>74	0	1	8			
ALT (IU/L)	14 \pm 5	30 \pm 30	90 \pm 70	0.0002	< 0.0001	0.00015
<40	15	22	5			
40-80	0	3	7			
>80	0	2	8			
GGT (IU/L)	30 \pm 30	80 \pm 90	110 \pm 120	0.003	0.0003	0.14
FA (IU/L)	70 \pm 30	100 \pm 50	80 \pm 30	0.02	0.4	0.2
HOMA-IR	2.0 \pm 1.1	2.7 \pm 1.3	18 \pm 29	0.08	< 0.0001	< 0.0001

¹El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*

NAS: puntuación de la actividad de la EHGNA; IMC: índice de masa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidad; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; GGT: γ -Glutamyl transpeptidasa; FA: fosfatasa alcalina.

Resultados

El estudio de las muestras de suero humano permitió la detección de 98 variables capaces de separar los tres grupos de estudio.

El análisis multivariante por PLS-DA reveló que con 2 CP había un solapamiento de los grupos. Sin embargo, con 3 CP se consiguió una separación muy buena que permitía diferenciar entre los pacientes control y los pacientes con estadios de EHGNA más bajos (azul) y estadios de EHGNA más altos (rojo). Por ello decidimos quedarnos con 3 CP (Figura 3.29).

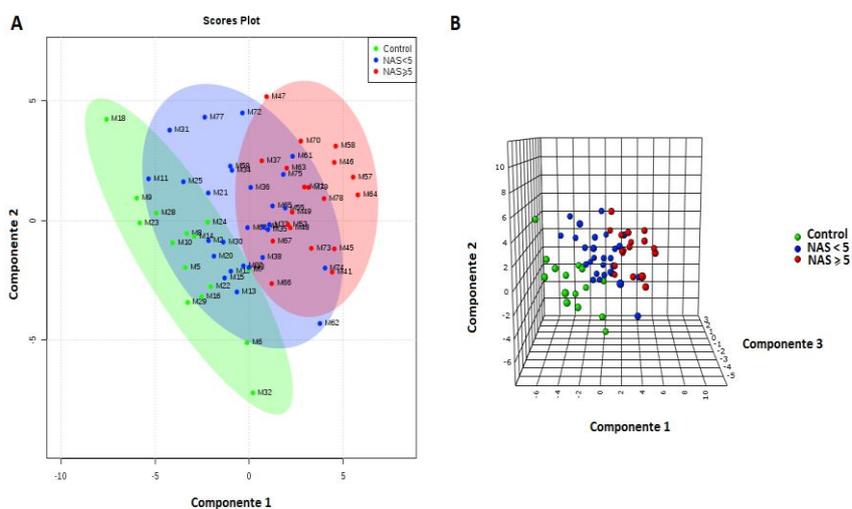


Figura 3.29. A) Diagrama de scores con dos componentes principales y B) diagrama de scores con tres componentes principales del PLS-DA realizado sobre las muestras de suero humano de pacientes diagnosticados con EHGNA analizadas por HILIC y RP por LC-MS. Verde: Muestras de pacientes control; Azul: Muestras de pacientes con NAS < 5; Rojo: Muestras de pacientes con NAS ≥ 5.

Los parámetros de ajuste del modelo se comprobaron mediante CV (Tabla 3.27). El valor de R^2 obtenido indica que el modelo explica la varianza de los datos de forma correcta. El valor de Q^2 es aceptable e indica una correcta capacidad predictiva del modelo.

Resultados

Tabla 3.27. Validación cruzada del modelo PLS-DA con 3 CP obtenido para las muestras de suero humano analizadas por LC-MS.

Suero humano	
PLS-DA (3 CP)	
R ²	Q ²
0.78	0.59

A continuación, se buscaron posibles alteraciones en el metaboloma. Se identificaron 81 posibles marcadores en los sueros humanos, encontrándose 20 metabolitos con un VIP>1 (**Tabla 3.28**).

En los *Volcano Plots* (**Figura 3.30**) se puede observar el número de metabolitos que se encuentran alterados de manera significativa, así como su naturaleza, comparando los distintos grupos (control, NAS<5 y NAS≥5) entre sí.

Resultados

Tabla 3.28. Variables identificadas con un VIP>1 en el análisis de muestras de suero humano, analizadas por LC-MS.

Compuesto	VIP	<i>p</i> -valor ¹		
		Control NAS < 5	Control NAS ≥ 5	NAS < 5 NAS ≥ 5
BisCysGly	1.2619	0.03	0.8	0.005
Cysteine	2.0454	0.0003	0.003	0.002
GCA	1.2258	0.03	0.6	0.012
GluCitr	1.0688	0.04	0.5	0.07
GluGln	1.3785	0.002	0.2	0.009
GluGlu	1.0449	0.015	0.04	0.31
Glulle	1.6575	0.003	0.04	0.04
GluLeu	1.3285	0.006	0.05	0.19
GluOrn	1.1561	0.03	0.08	0.6
Glutamate	1.441	0.0007	0.04	0.5
GluTyr	1.501	0.0013	0.0005	0.6
GluVal	1.7494	0.00016	0.009	0.03
Glycine conjugated	1.0275	0.11	0.7	0.02
GSH	1.182	0.003	0.5	0.06
GSSG	1.7561	0.0002	0.3	0.03
Methylthioadenosine	2.0222	0.00011	0.00019	0.07
AcOft	2.4376	< 0.0001	0.0011	0.0009
SAM	1.9354	0.0011	0.0005	0.05
Taurine conjugated	1.1666	0.11	0.7	0.019
TCA	1.4039	0.010	0.6	0.003

¹El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*. GCA: ácido glicocólico; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; AcOft: ácido oftálmico; SAM: S-(5-adenosil)-L-metionina; TCA: ácido taurocólico.

Resultados

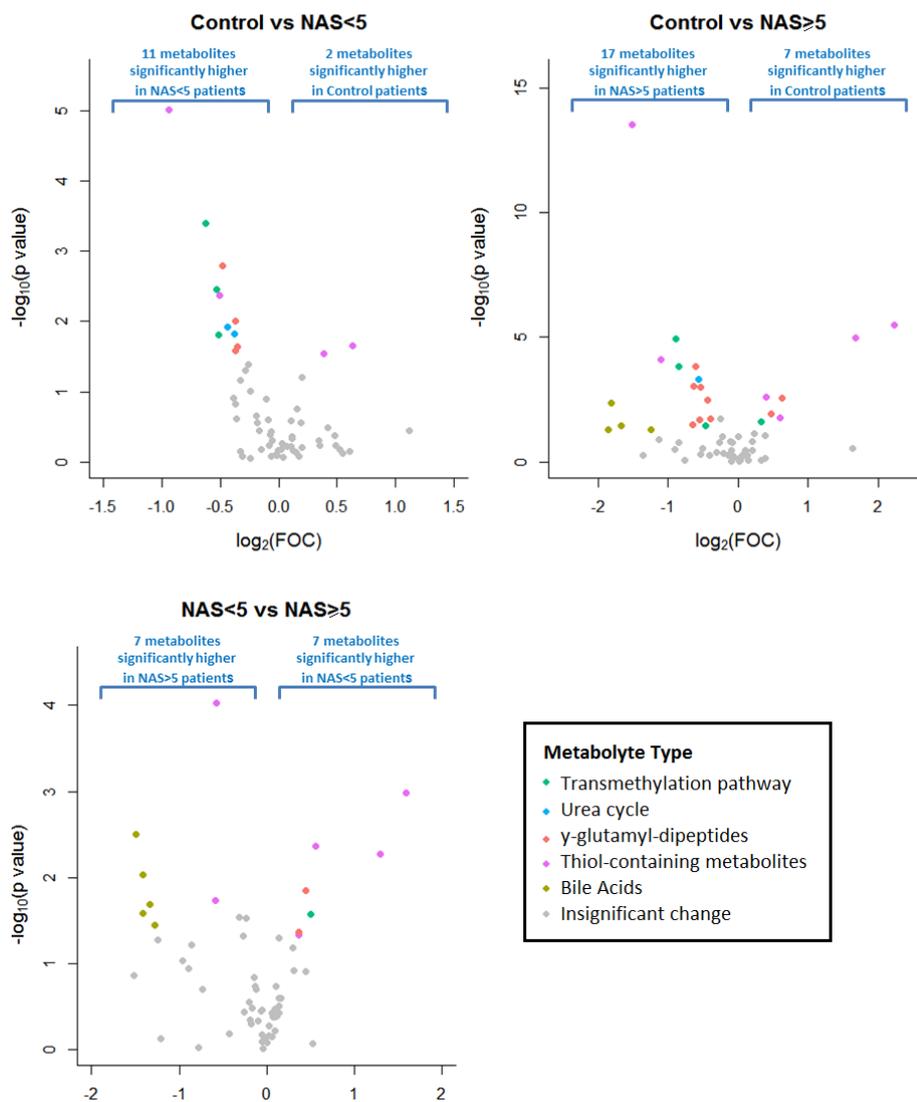


Figura 3.30. Volcano plots de los metabolitos alterados significativamente en las muestras de suero humano de pacientes diagnosticados con EHGNA analizadas por HILIC y RP por LC-MS. Comparación de metabolitos entre los grupos Control, NAS<5 y NAS>5; p valor < 0.05, fold change absoluto > 1.5. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*.

Resultados

Las alteraciones más significativas fueron el aumento en los niveles de betaína, cisteína, glutamato, algunos glutamil-dipéptidos (GluLeu, GluVal, GluPhe...), algunas sales biliares (TCA y GCA) y compuestos relacionados con EO (GSSG, SAM, AcOf) en los pacientes diagnosticados con EHGA (Figura 3.31).

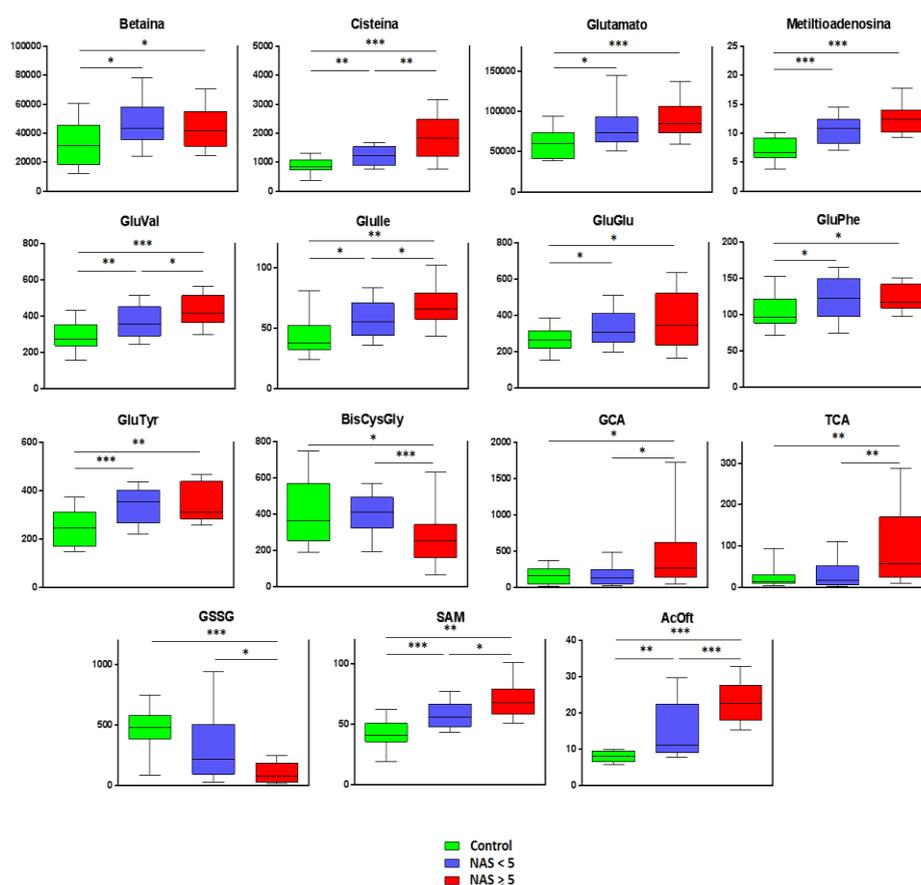


Figura 3.31. Diagramas de cajas mostrando los cambios más importantes en las muestras de suero humano de pacientes diagnosticados con EHGA analizadas mediante HILIC y RP por LC-MS. Los valores están expresados como intensidad relativa. Las cajas denotan los rangos intercuartílicos, las líneas denotan las medianas y los bigotes denotan los percentiles 10 y 90. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. GCA: ácido glicocólico; TCA: ácido taurocólico; GSSG: glutatión oxidado; SAM: S-(5-adenosil)-L-metionina; AcOf: ácido oftálmico.

Resultados

3.5 Desarrollo y validación de un método dirigido para evaluar marcadores de estrés oxidativo

3.5.1 Desarrollo del método UPLC-MS/MS

Como se ha comentado anteriormente, el EO tiene un papel destacado en la esteatosis hepática y en el daño hepatocelular asociado a ella [189]. De hecho, en los estudios metabolómicos no dirigidos, tanto en modelos experimentales *in vivo* como en modelos *in vitro* de esteatosis, pudimos comprobar la aparición de cambios significativos en algunos indicadores de EO. Es por ello que desarrollamos un método UPLC-MS/MS para el análisis dirigido de biomarcadores de EO en diferentes matrices biológicas. El objetivo era disponer de un método cuantitativo que de forma rápida permitiera identificar cambios en biomarcadores específicos de EO. Como marcadores se propusieron: i) sustancias que contenían azufre, como GSH, GSSG, SAM y SAH; ii) Phe y tirosinas (I-Tyr, N-Tyr, Cl-Tyr, o-Tyr, m-Tyr y p-Tyr) como marcadores de daño oxidativo a proteínas; iii) 8-OH-dG y 2-dG, como indicadores de daño a DNA; y iv) MDA y 8-IsoPGF, los cuales son marcadores de peroxidación lipídica. Además, se incluyó el AcOft como indicador de la disminución del glutatión.

El método analítico permitió la determinación de estos 16 analitos y de 2 PI deuterados (Phe-d5 y 8-IsoPGF-d4), los cuales se usaron para minimizar la imprecisión en las medidas y para compensar el posible efecto matriz [270]. La correcta separación cromatográfica de todos los compuestos se consiguió en 7 min usando cromatografía de fase reversa con agua desionizada y acetonitrilo (0.1% ácido fórmico) como eluyentes (Figura 3.32).

Resultados

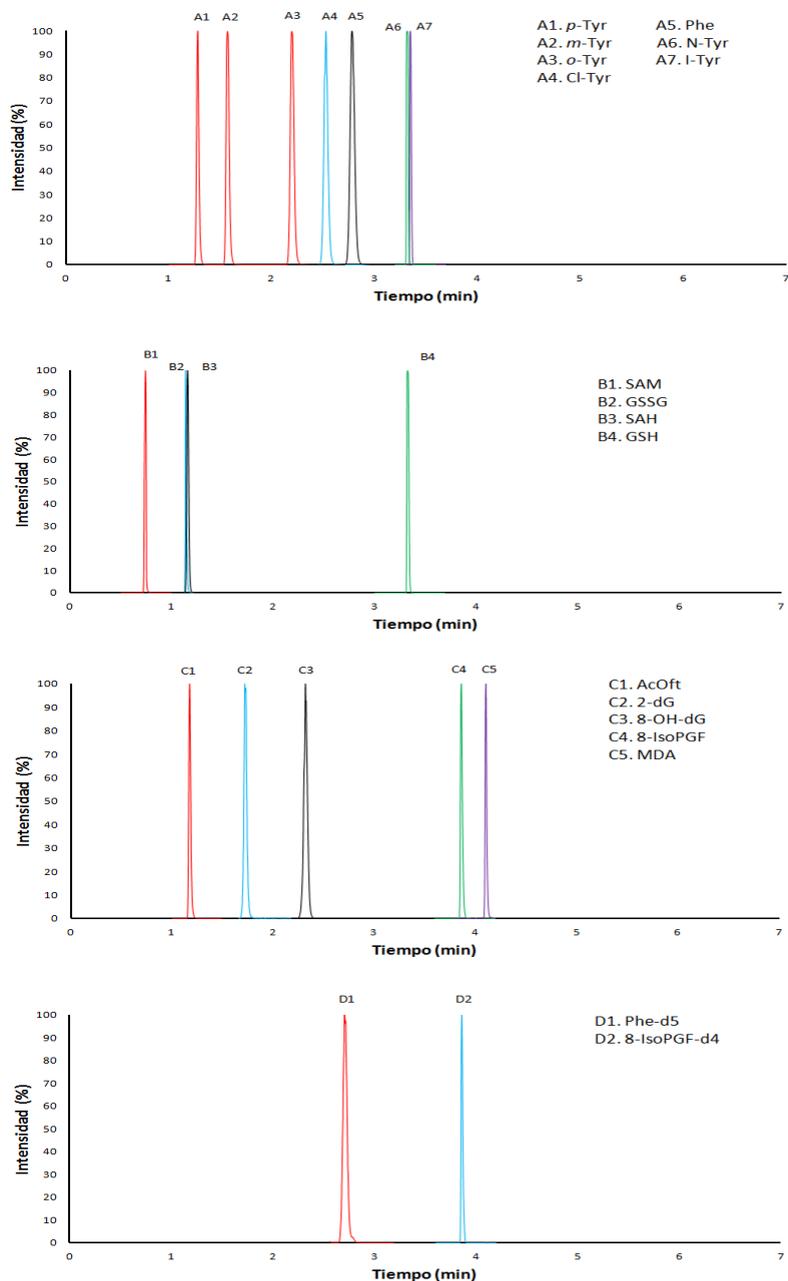


Figura 3.32. Cromatogramas SRM obtenidos a partir una disolución patrón mixta que contenía todos los biomarcadores de estudio y los patrones internos (1 µg/mL) aplicando el método UPLC-MS/MS descrito.

Resultados

Las condiciones de MS, incluyendo las transiciones MRM para cada compuesto, fueron obtenidas automáticamente por infusión directa de cada patrón preparado individualmente a 1 µg/mL en PBS, con la fuente de electrospray operando en modo positivo (ESI+) y negativo (ESI-) usando el software QuanOptimizer® (Tabla 3.29). La concentración de los metabolitos fue obtenida mediante las curvas de calibración (area analito/area PI vs concentración), usando 8-IsoPGF-d4 como PI de la 8-IsoPGF (analizados en ESI-) y Phe-d5 como PI del resto de analitos (analizados en ESI+).

Tabla 3.29. Parámetros MRM seleccionados para la determinación de los 16 biomarcadores de EO y los 2 PIs.

Compuesto	Modo ESI	Transición MRM ¹ :	Voltaje del cono (V)	Energía de colisión (eV)
GSSG	+	613.2 > 355.0	60	15
GSH	+	433.1 > 201.0	20	20
SAM	+	398.9 > 136.0	22	17
SAH	+	385.1 > 136.0	35	25
I-Tyr	+	308.1 > 291.0	40	15
AcOfit	+	290.2 > 161.1	15	15
8-OH-dG	+	284.0 > 168.0	30	15
2-dG	+	268.0 > 152.0	25	15
MDA	+	235.0 > 159.0	30	30
N-Tyr	+	227.1 > 181.0	25	10
Cl-Tyr	+	216.0 > 170.0	30	15
<i>o</i> -Tyr	+	182.1 > 136.0	20	10
<i>m</i> -Tyr	+	182.1 > 136.0	20	10
<i>p</i> -Tyr	+	182.1 > 136.0	20	10
Phe	+	166.1 > 120.1	20	20
8-IsoPGF	-	353.2 > 193.3	35	25
Phe-d5 ²	+	171.1 > 125.1	20	20
8-IsoPGF-d4 ²	-	357.2 > 197.3	35	25

¹(m/z) precursor > (m/z) producto

²Usados como patrones internos.

Resultados

3.5.2 Optimización de la detección de MDA y GSH

Durante el desarrollo del método se requirió de una etapa de derivatización para evitar la degradación de algunos analitos lábiles, mejorando así la estabilidad, detección y cuantificación de algunos compuestos. Por esta razón el MDA y el GSH se determinaron después de llevar a cabo una reacción con DNPH [229-231] NEM [79,232], respectivamente. Para optimizar el procedimiento de derivatización, se prepararon por separado disoluciones de MDA y de GSH en PBS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se analizaron después de la reacción con el reactivo de derivatización correspondiente a diferentes concentraciones (0,25 a 2 mM DNPH y 2,5 a 50 mM NEM) (Figura 3.33).

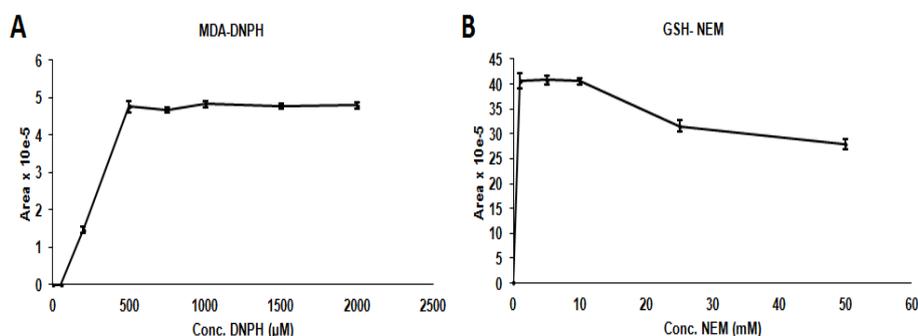


Figura 3.33. A) Efecto de la concentración de DNPH en la derivatización de la disolución de MDA preparada en PBS a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. B) Efecto de la concentración de NEM en la derivatización de la disolución de GSH preparada en PBS a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para el MDA, el mayor rendimiento en la derivatización se obtuvo usando una concentración de DNPH en el rango de 0.5 - 2 mM, mientras que la mayor respuesta para el GSH se obtuvo usando el NEM en un rango de concentración de 5 - 10 mM. En base a ello, y para asegurar una completa derivatización de MDA y GSH en las matrices biológicas estudiadas, se seleccionaron las concentraciones de DNPH 1 mM y NEM 10 mM como las óptimas.

Resultados

Además, se comprobó si la utilización de los reactivos de derivatización producía interferencias en la determinación de los otros analitos. Con este fin, diferentes disoluciones que contenían todos los analitos de estudio (desde 0,125 hasta 1 $\mu\text{g/mL}$) fueron tratadas con i) DNPH 1 mM, ii) NEM 10 mM, iii) ambos reactivos DNPH 1 mM y NEM 10 mM juntos, o iv) sin ningún reactivo de derivatización (**Figura 3.34**). Aparte del MDA y el GSH, la respuesta del resto de analitos no se vio afectada significativamente por la presencia de los reactivos de derivatización seleccionados.

3.5.3 Validación del método UPLC-MS/MS

Para tener en cuenta el posible efecto matriz y el sesgo, se preparó un pool de muestras para cada matriz biológica testada que se fortificó, con tres niveles de concentración diferentes para cada compuesto (baja (25 ng/mL), media (100 ng/mL) y alta (500 ng/mL)), de acuerdo con el procedimiento descrito por Matuszewski et al. [271]. El pool de muestras fortificadas y los blancos (pool de muestras sin fortificar) fueron analizadas mediante el método UPLC-MS/MS desarrollado y las recuperaciones obtenidas fueron evaluadas. El efecto matriz se midió en un rango de 80.0 a 124.2 % para todos los compuestos en todas las matrices biológicas testadas, lo que muestra una ausencia tanto de aumento de la ionización como de supresión iónica que afecte a la determinación de los analitos en estudio bajo las condiciones analíticas descritas (**Tabla 3.30**).

Resultados

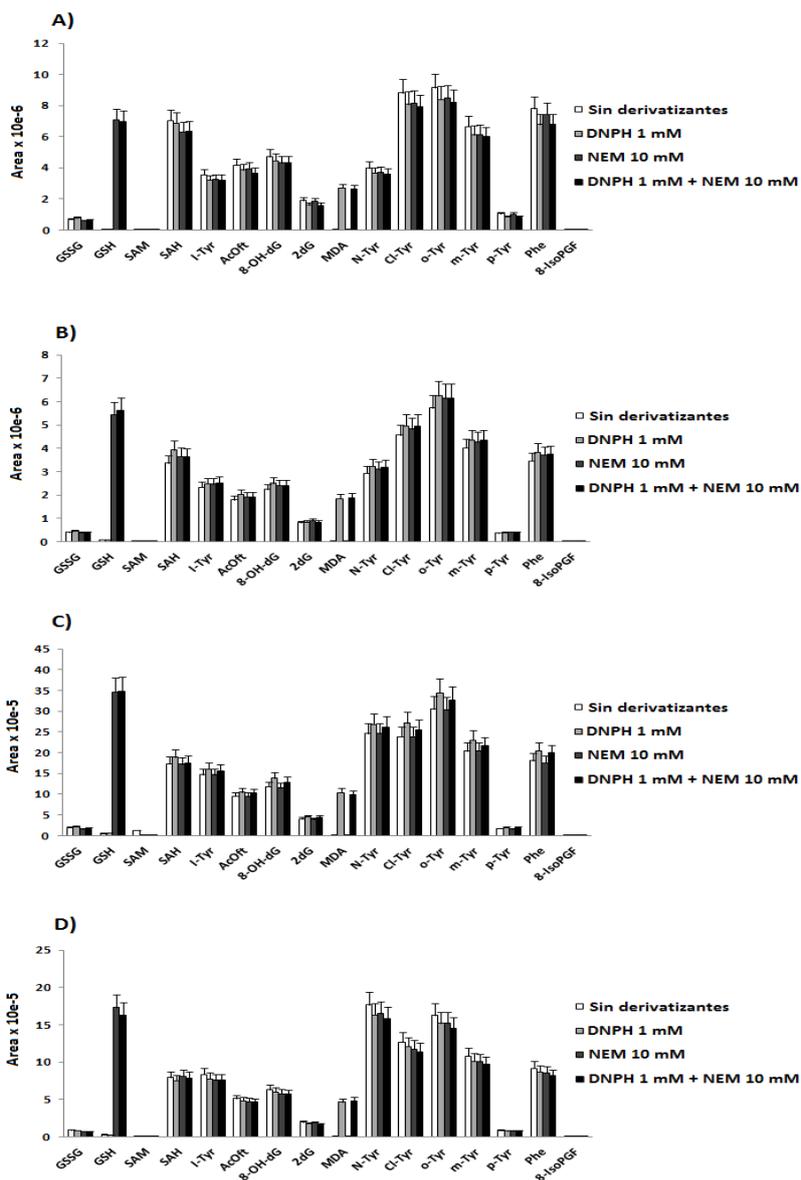


Figura 3.34. A) Efecto de la DNPH 1 mM y NEM 10 mM en la respuesta de los analitos en estudio preparados en PBS a una concentración de 1 µg/mL , B) 0.5 µg/mL, C) 0.25 µg/mL y D) 0.125 µg/mL.

Resultados

Tabla 3.30. Resultados obtenidos al evaluar el efecto matriz del método UPLC-MS/MS desarrollado cuando se analizan diferentes matrices biológicas.

Analito	Matriz Biológica ¹											
	Células de hapatocitos			Medio de cultivo de hepatocitos			Suero			Tejido hepático		
	% (A)	% (M)	% (B)	% (A)	% (M)	% (B)	% (A)	% (M)	% (B)	% (A)	% (M)	% (B)
GSSG ²				97.7	107.9	115.7	98.3	101.7	83.2			
GSSG ³	97.6	81.9	87.6							116.7	114.9	109.3
GSH ²				109.9	108.7	110.3	93.1	91.7	87.7			
GSH ³	99.4	95.9	86.0	109.6	106.6	106.6	102.0	102.0	101.9	106.6	108.9	115.2
SAM ²	110.6	117.7	111.8	80.4	91.0	81.9	86.5	99.8	83.6	118.4	109.8	118.0
SAM ³	82.4	97.9	96.9	117.8	112.6	111.0	106.7	101.1	93.1	105.3	105.0	107.1
SAH ²	99.9	117.7	110.3	107.6	114.0	123.3	109.6	106.3	84.9	113.3	105.0	81.6
SAH ³	82.3	83.7	101.8	83.7	89.7	91.3	86.3	82.3	96.4	86.8	84.6	82.1
I-Tyr ²	93.5	96.5	94.7	101.2	101.1	94.8	83.1	81.2	80.6	87.3	87.7	98.4
AcOfi ²	91.7	99.0	95.5	94.1	93.4	92.8	83.8	83.3	84.0			
AcOfi ³										96.1	89.8	91.2
8-OH-dG ²	87.7	93.4	92.0	86.1	86.4	87.9	81.4	80.0	79.7	101.8	91.0	93.0
2-dG ²	84.8	88.1	76.1	103.7	97.8	97.1	90.7	88.9	86.1	100.9	87.3	80.8
MDA ⁴	109.8	107.1	110.6	122.5	113.0	89.1	84.8	94.6	83.6	101.4	81.0	92.3
N-Tyr ²	108.9	104.6	100.1	106.7	101.5	101.0	94.4	89.7	99.3	97.1	80.1	88.6
Cl-Tyr ²	97.3	100.7	100.0	98.0	99.9	99.5	86.0	86.5	101.6	90.5	100.4	98.9
<i>o</i> -Tyr ²	91.8	97.1	95.7	98.1	95.5	99.5	87.5	84.2	92.4	97.2	94.7	102.5
<i>m</i> -Tyr ²	93.8	95.3	92.0	92.0	85.4	87.1	83.9	79.6	84.1	106.7	81.0	85.7
<i>p</i> -Tyr ³	89.4	97.0	94.6	92.0	91.6	103.1	90.5	90.1	88.1	100.5	97.3	124.2
Phe ³	93.2	89.3	85.4	93.3	86.5	80.6	97.5	84.8	88.9	101.6	102.5	112.4
8-IsoPGF ²	107.1	114.5	110.3	105.2	104.1	95.2	101.7	106.4	97.9	97.6	102.5	101.0

¹ Efecto matriz expresado como RME (%), calculado como el ratio: (respuesta del analito en una muestra fortificada - respuesta del analito en una muestra no fortificada)/respuesta del analito en el correspondiente QC, multiplicada por 100 (valores medios, n = 3). Las concentraciones nominales fueron 500 ng/mL (concentraciones altas o A), 100 ng/mL (concentraciones medias o M) y 25 ng/mL (concentraciones bajas o B).² Valores obtenidos analizando la Fracción 1 de la muestra (descrito en la sección de Tratamientos de muestras).³ Valores obtenidos analizando la Fracción 2 de la muestra (descrito en la sección de Tratamientos de muestras).⁴ Valores obtenidos analizando la Fracción 3 de la muestra (descrito en la sección de Tratamientos de muestras).

El método analítico se validó en términos de linealidad, LLOQ, ULOQ, exactitud y precisión siguiendo los criterios de cumplimiento establecidos en la “Guía para la validación de métodos para la industria bioanalítica” de la FDA [272]. La exactitud y la precisión fueron evaluadas aplicando el método desarrollado en el análisis de controles de calidad fortificados con cantidades conocidas de los biomarcadores estudiados. La **Tabla 3.31** muestra los resultados obtenidos en el estudio de la exactitud.

Resultados

Tabla 3.31. Resultados obtenidos al evaluar la exactitud del método UPLC-MS/MS desarrollado.

Analito	Exactitud ¹								
	Bloque 1			Bloque 2			Bloque 3		
	% (A)	% (M)	% (B)	% (A)	% (M)	% (B)	% (A)	% (M)	% (B)
GSSG	3.3	-6.5	-2.5	4.5	-7.3	-7.1	1.7	-5.4	-1.8
GSH	9.9	12.8	8.8	9.4	-6.5	-1.5	3.7	-8.2	-5.2
SAM	-9.2	-8.0	-15.6	-3.5	-5.4	-14.6	-12.5	-4.3	-13.7
SAH	0.7	-1.5	-3.2	1.8	-8.4	-9.4	1.3	-0.6	-6.5
I-Tyr	-0.3	6.3	6.5	4.2	0.5	13.1	-12.9	-6.1	-0.5
AcOfit	-2.5	-8.2	-9.0	9.9	9.1	12.9	6.5	13.0	11.7
8-OH-dG	2.4	-2.1	-16.6	-8.9	1.1	13.9	-11.2	1.3	19.8
2-dG	6.2	-5.8	-7.3	-2.8	5.7	-1.2	-2.8	5.7	-1.2
MDA	9.4	-0.5	5.3	-5.8	-15.0	3.4	3.1	-1.5	-5.2
N-Tyr	-3.1	-10.4	-11.3	-6.7	-7.7	2.5	-13.3	-12.4	-4.8
Cl-Tyr	-0.8	-5.1	-9.0	-1.3	-3.9	-7.6	-6.8	-10.0	-15.8
<i>o</i> -Tyr	-1.6	-2.4	-5.6	-2.3	-4.0	-6.1	-6.3	-7.3	-9.0
<i>m</i> -Tyr	-0.5	-3.0	-10.6	0.5	-2.5	7.0	-5.6	-1.0	18.8
<i>p</i> -Tyr	-3.0	-5.8	-7.3	-8.6	-8.5	-14.8	-7.2	-8.7	-17.4
Phe	0.9	-2.5	-6.7	-3.9	-2.6	-6.4	-4.2	-3.4	-5.9
8-IsoPGF	-9.1	-1.1	12.7	-5.8	-8.4	7.5	-6.1	-0.8	10.2

¹Expresada como Error de Media Relativo (RME %, Relative Measurement Error), calculado como el ratio: (concentraciones calculadas - concentraciones nominales)/concentración nominal, multiplicada por 100 (valores medios, n = 5). Las concentraciones nominales fueron 500 ng/mL (concentraciones altas o A), 100 ng/mL (concentraciones medias o M) y 25 ng/mL (concentraciones bajas o B).

El RME de los datos se encuentra en el rango -16.6 a 19.8 % mostrando que no hay diferencias significativas entre el valor buscado y el valor de concentración real obtenido. Además, como puede verse en la **Tabla 3.32**, también se evaluó la precisión. Los términos de repetibilidad y reproducibilidad fueron determinados a tres niveles de concentración (n=5) para todos los analitos, obteniendo una RSD máxima de 17.2 y 16.0 %, respectivamente.

Resultados

Tabla 3.32. Resultados obtenidos al evaluar la precisión del método UPLC-MS/MS desarrollado.

Análito	Repetibilidad ¹									Reproducibilidad ¹		
	Bloque 1			Bloque 2			Bloque 3			%(A)	%(M)	%(B)
	%(A)	%(M)	%(B)	%(A)	%(M)	%(B)	%(A)	%(M)	%(B)			
GSSG	5.6	4.2	9.1	4.9	5.5	8.6	3.0	2.9	5.4	4.5	4.1	7.7
GSH	3.5	3.3	3.1	4.3	3.8	11.0	2.0	3.4	10.7	4.2	10.4	10.1
SAM	2.5	2.7	8.6	5.6	9.5	7.8	6.0	6.3	3.0	6.2	6.5	6.4
SAH	3.1	3.0	2.4	1.8	2.1	4.6	1.3	1.5	2.4	2.1	4.3	4.1
I-Tyr	2.6	2.8	0.5	3.7	2.2	3.8	3.2	4.4	3.6	8.3	6.0	6.1
AcOf	2.5	1.4	1.6	1.5	1.7	2.4	2.4	4.2	3.5	5.5	9.5	10.2
8-OH-dG	3.3	3.2	5.6	6.2	2.6	3.1	6.9	1.3	2.7	8.3	2.8	16.0
2-dG	4.4	4.3	6.2	3.0	4.5	2.2	3.0	4.5	2.2	5.5	6.9	4.7
MDA	3.7	3.8	6.5	5.9	12.3	9.7	4.0	3.2	1.9	7.6	9.8	8.0
N-Tyr	1.3	3.5	2.9	1.7	2.5	2.2	2.7	3.1	2.7	5.1	3.6	6.5
Cl-Tyr	2.5	3.6	0.7	3.0	2.5	2.0	2.2	1.2	1.8	3.8	3.8	4.4
<i>o</i> -Tyr	1.3	1.5	4.2	4.3	2.6	1.5	1.5	1.9	1.7	3.4	2.9	3.1
<i>m</i> -Tyr	2.2	2.2	2.6	1.3	4.9	7.5	2.0	3.2	3.1	3.3	3.4	12.8
<i>p</i> -Tyr	2.3	3.4	2.8	2.3	4.7	17.2	2.0	0.5	6.0	3.3	3.5	10.9
Phe	1.2	1.5	1.2	1.6	1.4	3.1	2.5	1.3	2.9	3.0	1.3	2.4
8-IsoPGF	5.0	6.4	8.8	4.8	3.3	4.4	3.7	3.0	3.9	4.5	5.7	6.1

¹Expresado como RSD %. Valores medios de RSD (n = 5). Las concentraciones nominales fueron 500 ng/mL (concentraciones altas o A), 100 ng/mL (concentraciones medias o M) y 25 ng/mL (concentraciones bajas o B).

Por último, se evaluaron los parámetros de ajuste del método analítico. Las curvas de calibración fueron lineales para todos los analitos en un rango de concentraciones de 2 ó 3 órdenes de magnitud, dependiendo del compuesto, con un coeficiente de regresión > 0.994 en todos los casos. El límite de detección (LOD), el LLOQ y el ULOQ también fueron determinados (**Tabla 3.33**). El valor del LLOQ obtenido estaba en el rango de 1.2 a 19.5 ng/mL dependiendo del compuesto.

Resultados

Tabla 3.33. Parámetros de ajuste del método UPLC-MS/MS desarrollado.

Analito	ULOQ ¹	LLOQ ²	LOD ³	(R ²) ⁴
GSSG	625	9.8	4.9	0.994
GSH	1250	4.9	2.4	0.998
SAM	1250	4.9	2.4	0.997
SAH	1250	2.4	1.2	0.998
I-Tyr	1250	2.4	1.2	0.999
AcOfit	1250	2.4	1.2	0.9997
8-OH-dG	1250	4.9	2.4	0.998
2-dG	1250	19.5	9.8	0.996
MDA	1250	9.8	4.9	0.998
N-Tyr	1250	4.9	2.4	0.998
Cl-Tyr	1250	2.4	1.2	0.9992
<i>o</i> -Tyr	1250	1.2	0.6	0.9992
<i>m</i> -Tyr	1250	4.9	2.4	0.998
<i>p</i> -Tyr	1250	9.8	4.9	0.998
Phe	1250	9.8	4.9	0.998
8-IsoPGF	1250	9.8	4.9	0.997

¹ Límite de cuantificación superior (ULOQ), expresado como ng/mL. ² Límite de cuantificación inferior (LLOQ), expresado como ng/mL. ³ Límite de detección (LOD), expresado como ng/mL. ⁴ Coeficientes de regresión.

3.5.4 Aplicación del método UPLC-MS/MS desarrollado a sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo*.

3.5.4.1 Inducción de estrés oxidativo en cultivo de hepatocitos de rata

Se trataron hepatocitos de rata con cumene hidropéroxido 500 μ M, un conocido inductor de EO, durante 24h. A continuación, tanto el extracto celular como el sobrenadante fueron analizados con el método de EO propuesto, hallándose diferencias en los niveles de varios de los metabolitos estudiados (**Figura 3.35**).

Resultados

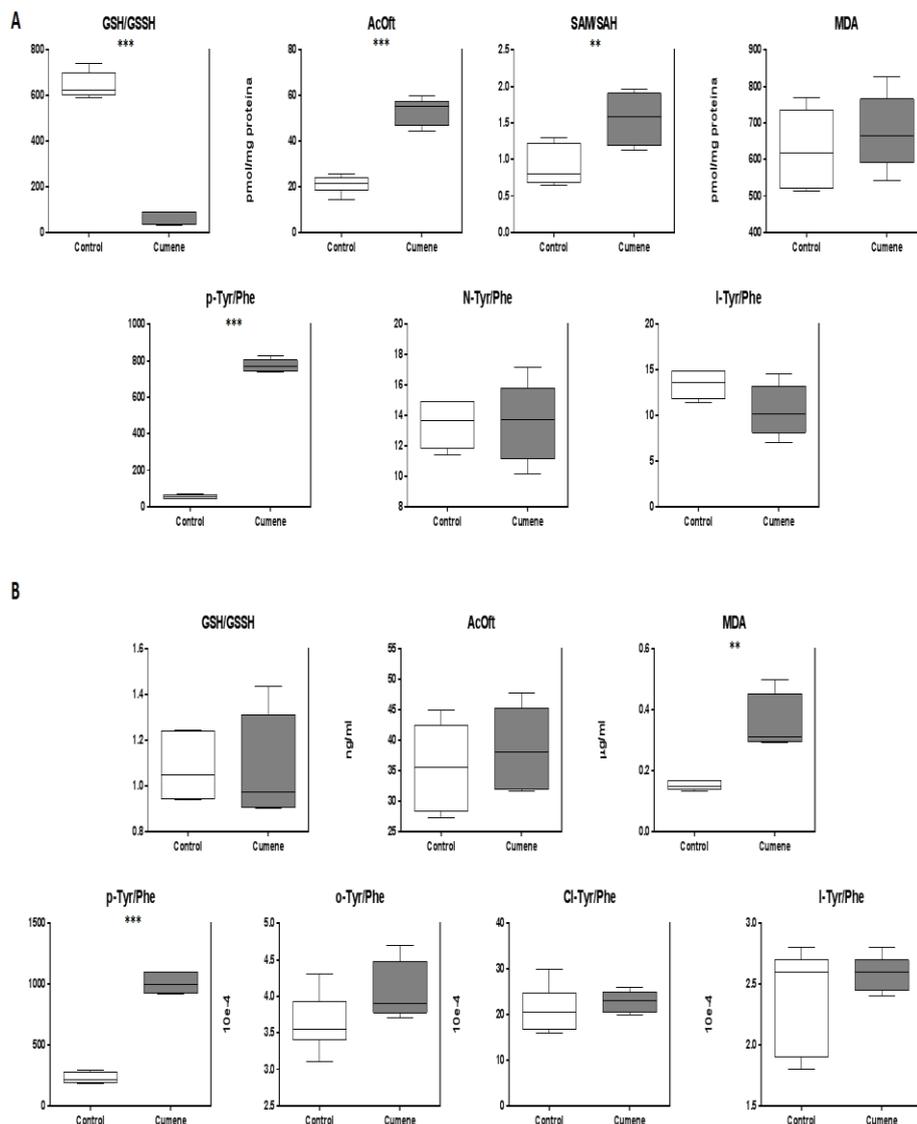


Figura 3.35. Biomarcadores de EO detectados en cultivo de hepatocitos de rata expuestos a cumene hidropéroxido 500 μM durante 24 h. **A)** Monocapa celular; **B)** Medio de cultivo. Los datos están expresados como media \pm DS (n=6). Réplicas analíticas n=2. Las cajas denotan los rangos intercuartílicos, las líneas denotan las medianas y los bigotes denotan los percentiles 10 y 90. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Los metabolitos por debajo del LOQ no están representados.

Resultados

3.5.4.2 Inducción de estrés oxidativo en ratas tratadas con paracetamol

Se trataron ratas con paracetamol por vía oral durante una semana y a continuación se analizaron las muestras de tejido hepático y suero con el método de EO propuesto. Tal y como muestra la **Figura 3.36**, el método analítico permitió identificar cambios significativos en los niveles de algunos de los metabolitos analizados, tanto en muestras de suero como de tejido hepático, tras el tratamiento con el fármaco.

3.5.5 Aplicación del método de EO desarrollado a muestras de tejido hepático y suero en pacientes con EHNA

Múltiples factores están relacionados con la progresión a esteatosis hepática, inflamación y fibrosis, siendo el EO considerado como un factor clave que favorece la progresión del hígado graso simple a EHNA [273]. Para demostrar la potencial utilidad de esta nueva aproximación analítica en la evaluación de muestras clínicas, se aplicó el análisis comparativo de muestras de tejido hepático y suero humano en pacientes con y sin EHNA. Se observaron cambios significativos en algunos de los marcadores de EO comparando muestras control frente a EHNA. Los resultados pueden verse en la **Figura 3.37**.

Resultados

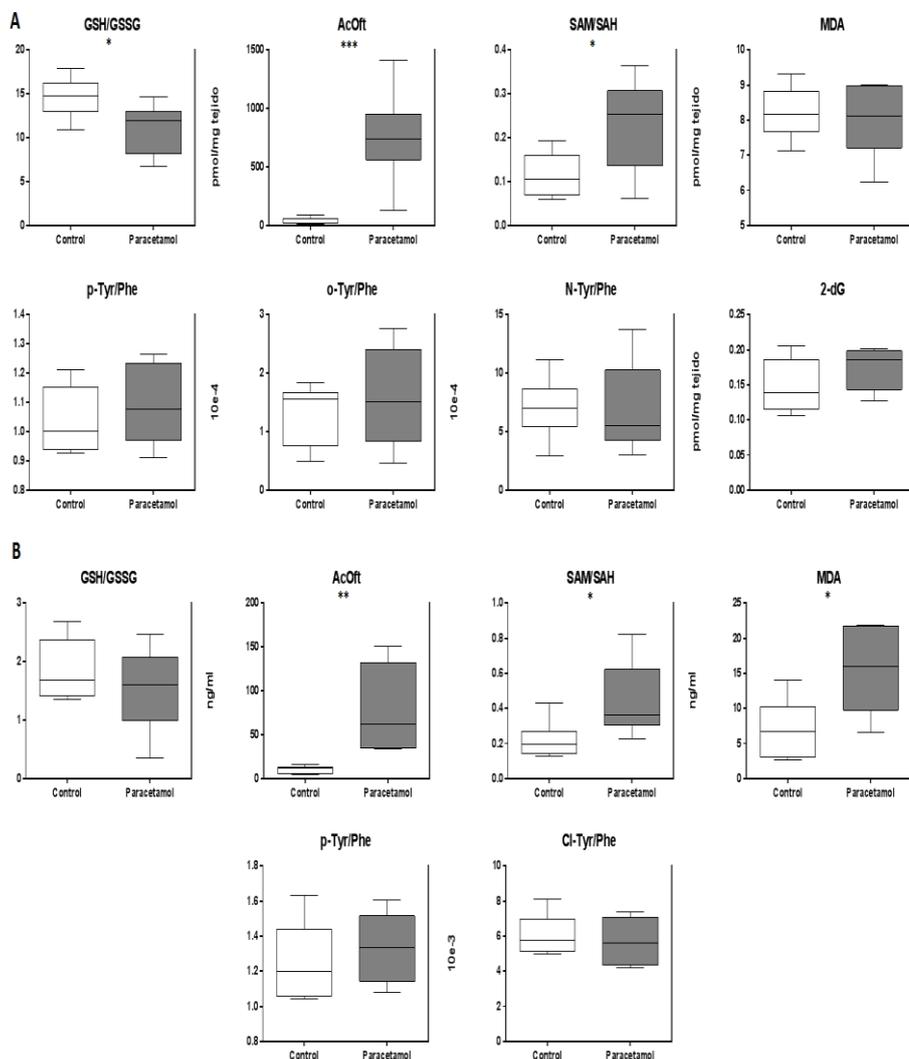


Figura 3.36. Biomarcadores de EO detectados en ratas tratadas con paracetamol durante una semana. **A)** Tejido hepático de ratas tratadas con vehículo control (n=8) y ratas tratadas con paracetamol (n=8); **B)** Muestras de suero de ratas tratadas con vehículo control (n=8) y ratas tratadas con paracetamol (n=8). Las cajas denotan los rangos intercuartílicos, las líneas denotan las medianas y los bigotes denotan los percentiles 10 y 90. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Los metabolitos por debajo del LOQ no están representados.

Resultados

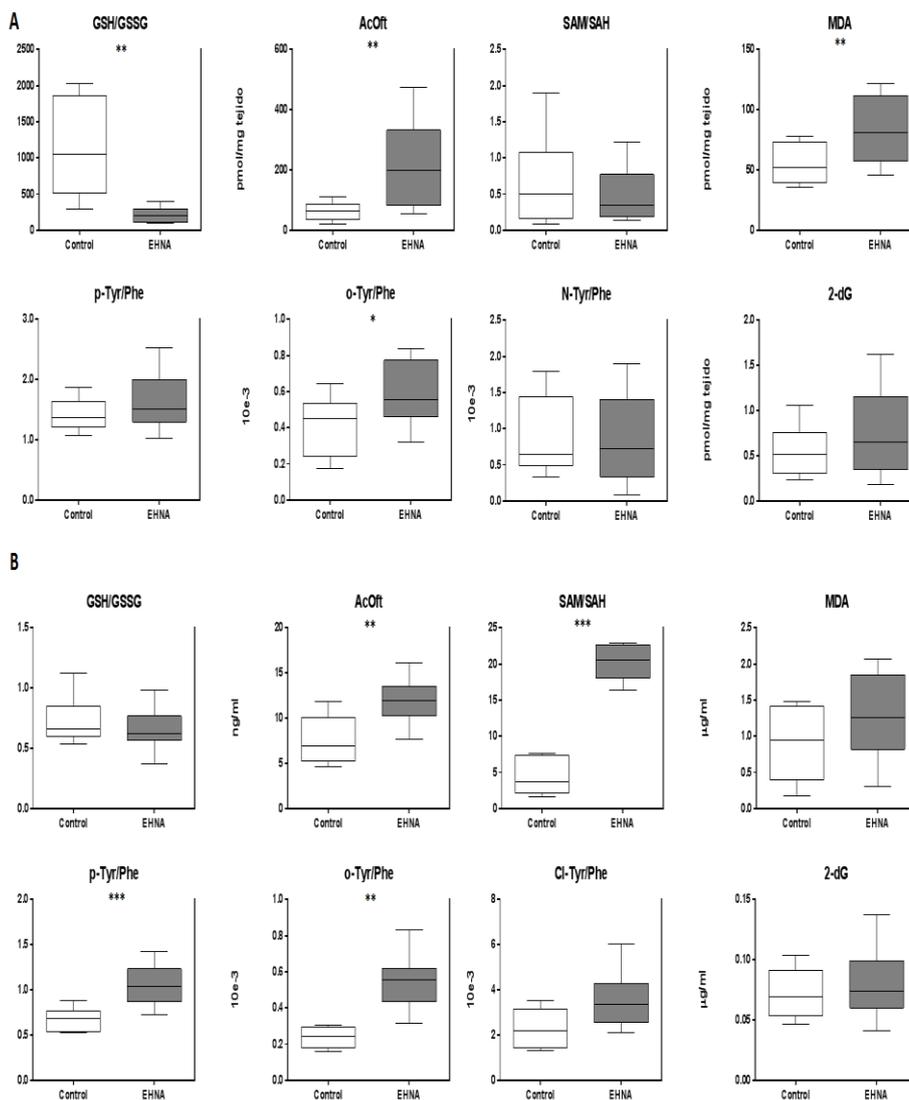


Figura 3.37. Biomarcadores de EO detectados en pacientes diagnosticados con EHNA. **A)** Tejido hepático humano de pacientes control (n=16) y pacientes con EHNA (n=17); **B)** Muestras de suero de pacientes control (n=7) y pacientes con EHNA (n=10). Las cajas denotan los rangos intercuartílicos, las líneas denotan las medianas y los bigotes denotan los percentiles 10 y 90. El valor estadístico p fue calculado usando el test *U de Mann-Whitney*. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Los metabolitos por debajo del LOQ no están representados.

Resultados

3.6 Uso del ácido oftálmico como potencial marcador sérico para el diagnóstico de la EHGNA

Con los estudios llevados a cabo en la **sección 3.5**, se puso en evidencia la potencial aplicabilidad clínica del ácido oftálmico para diferenciar entre muestras sin ningún tipo de lesión y muestras de pacientes con EHNA, por lo que quisimos estudiar la capacidad de este metabolito para ser usado como nuevo biomarcador a la hora de clasificar pacientes con esteatosis y estratificar los diferentes estadios de EHGNA. Para ello, se estudiaron las diferencias encontradas en los niveles de AcOft entre pacientes con algún tipo de grado de esteatosis (desde simple hasta esteatohepatitis) y pacientes sin esteatosis hepática (controles). El estudio se llevo a cabo con muestras de suero humano de dos grupos de pacientes distintos: i) pacientes sin obesidad mórbida, y ii) pacientes con obesidad mórbida.

Cohorte 1: Pacientes sin obesidad mórbida y con diferentes grados de EHNA

Se estudiaron 54 pacientes. 14 fueron pacientes control y 40 pacientes con esteatosis hepática y diferentes grados de EHGNA (8 no EHNA, 11 indeterminados y 21 con EHNA) según el criterio de Kleiner [51]. Las principales variables y características de los pacientes pueden observarse en la **Tabla 3.34**.

Resultados

Tabla 3.34. Descripción de la cohorte 1. Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar o como número de casos.

	CONTROL (N=14)	NAS 0-2 (N=8)	NAS 3-4 (N=11)	NAS 5-8 (N=21)
Edad (años)	37 \pm 14	52 \pm 14	54 \pm 11	51 \pm 12
Sexo				
Hombre	1	3	4	6
Mujer	13	5	7	15
Esteatosis				
0	14	0	0	0
1	0	8	4	0
2	0	0	5	6
3	0	0	2	15
Fibrosis				
0	14	8	3	2
1	0	0	4	3
2	0	0	2	4
3	0	0	1	10
4	0	0	1	2
Inflamación				
0	14	5	3	0
1	0	3	8	14
2	0	0	0	6
3	0	0	0	1
Balonización				
0	14	6	3	0
1	0	2	6	6
2	0	0	2	15
IMC (kg/m²)	28 \pm 6	28 \pm 4	32 \pm 7	32 \pm 6
Glucosa (mg/dl)	88 \pm 11	124 \pm 61	116 \pm 26	116 \pm 40
Colesterol total (mg/dl)	178 \pm 43	207 \pm 25	194 \pm 54	214 \pm 49
Colesterol HDL (mg/dl)	50 \pm 13	48 \pm 10	52 \pm 9	44 \pm 14
Triglicéridos (mg/dl)	90 \pm 69	118 \pm 94	128 \pm 74	192 \pm 114
AST (IU/L)	16 \pm 4	30 \pm 11	39 \pm 17	60 \pm 47
≤ 37	14	7	7	5
38-74	0	1	3	7
>74	0	0	1	9
ALT (IU/L)	13 \pm 3	36 \pm 36	45 \pm 33	69 \pm 69
≤ 40	14	6	6	5
41-80	0	1	3	8
>80	0	1	2	8
GGT (IU/L)	21 \pm 21	66 \pm 113	105 \pm 107	87 \pm 283
FA (IU/L)	71 \pm 21	96 \pm 48	108 \pm 24	83 \pm 39
HOMA	1.9 \pm 1.0	4 \pm 20	5 \pm 3	10 \pm 26

Resultados

Cohorte 2: Pacientes con obesidad mórbida y con diferentes grados de EHNA

Se estudiaron 85 pacientes: 19 control y 66 con esteatosis hepática y diferentes grados de EHGNA (23 no EHNA, 28 indeterminados y 15 con EHNA) según el criterio de Kleiner [51]. Las principales variables y características de los pacientes pueden observarse en la **Tabla 3.35**.

Tabla 3.35. Descripción de la cohorte 2. Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar o como número de casos.

	CONTROL (N=19)	NAS 0-2 (N=23)	NAS 3-4 (N=28)	NAS 5-8 (N=15)
Edad (años)	38 \pm 13	41 \pm 10	43 \pm 11	45 \pm 14
Sexo				
Hombre	7	4	16	9
Mujer	12	19	12	6
Esteatosis				
0	19	10	0	0
1	0	12	15	0
2	0	1	7	3
3	0	0	6	12
Fibrosis				
0	19	5	2	1
1	0	15	23	7
2	0	3	2	5
3	0	0	1	2
4	0	0	0	0
Inflamación				
0	19	15	8	0
1	0	8	18	11
2	0	0	1	3
3	0	0	1	1
Balonización				
0	19	21	9	1
1	0	1	12	6
2	0	1	7	8

Resultados

En la **Figura 3.38** pueden observarse los resultados obtenidos para los valores de AcOft y del ratio GSH/GSSG en la cohorte 1 (**Figura 3.38.A**) y en la cohorte 2 (**Figura 3.38.B**). En los dos experimentos se encontró una relación directa entre el nivel de AcOft hallado en las muestras de suero y el grado de NAS-Score de los pacientes, aumentando los niveles de dicho biomarcador conforme lo hacía el grado de la lesión. En el caso del ratio GSH/GSSG ocurrió al contrario, disminuyendo los niveles de éste conforme aumentaba el grado de lesión.

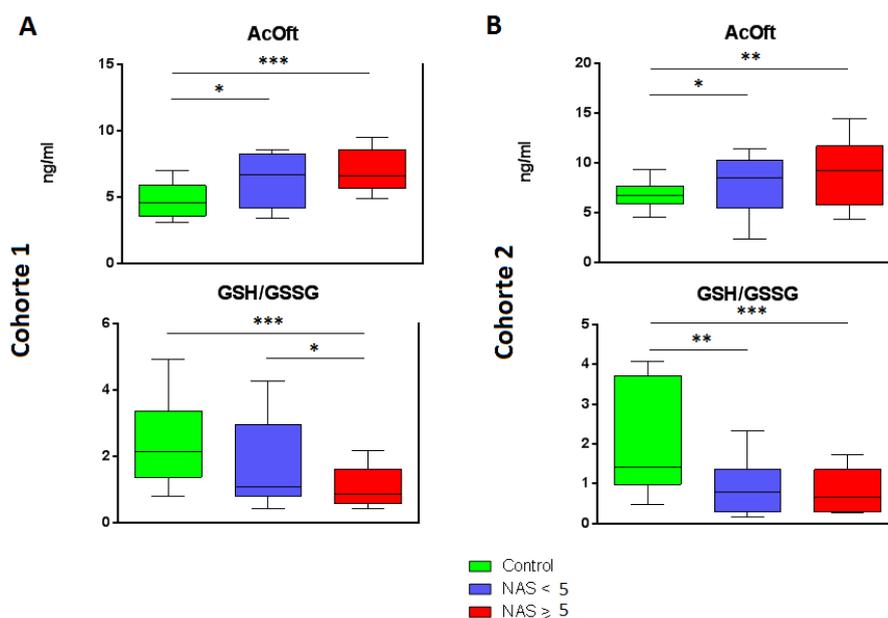


Figura 3.38. Niveles de AcOft (arriba) y del ratio GSH/GSSG (abajo) detectados en muestras de suero humano clasificadas según distintos estadios de EHGNA. **(A)** Cohorte 1: control (n=14), NAS < 5 (n=19), NAS ≥ 5 (n=21); **(B)** Cohorte 2: control (n=19), NAS < 5 (n=51), NAS ≥ 5 (n=15).

Además, se estudió la relación existente entre los valores medidos de AcOft y el grado de fibrosis de los pacientes. Se obtuvo de nuevo una

Resultados

muy buena correlación entre dichos valores y la progresión a estadios de fibrosis más severos (**Figura 3.39**).

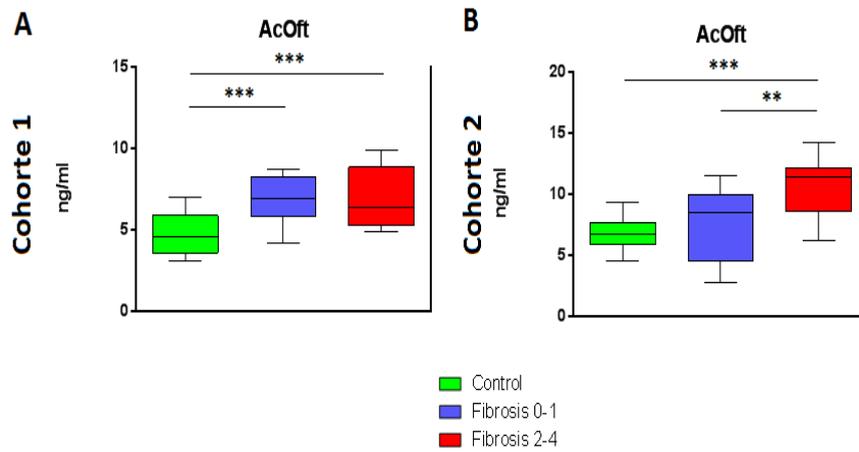


Figura 3.39. Niveles de AcOfT detectados en muestras de suero humano clasificadas según distintos grados de fibrosis. **A)** Cohorte 1: control (n=14), Fibrosis 0-1 (n=20) y Fibrosis 2-4 (n=20); **B)** Cohorte 2: control (n=19), Fibrosis 0-1 (n=53) y Fibrosis 2-4 (n=13).

4. Discusión

Discusión

4.1. Búsqueda de biomarcadores de la EHGNA mediante análisis metabolómico no dirigido en modelos *in vitro/in vivo*

Para llevar a cabo el análisis no dirigido de biomarcadores, nuestro laboratorio dispone de dos plataformas analíticas (LC-MS y GC-MS). Cada una de ellas ofrece una cobertura metabólica diferente y se usó en función de la cantidad de muestra disponible e interés en el seguimiento de metabolitos concretos o clases de estos (Tabla 4.1). De forma general, se usó la plataforma GC-MS para cubrir un amplio rango de analitos polares y la plataforma LC-MS para cubrir metabolitos de carácter menos polar, principalmente lípidos.

Tabla 4.1. Resumen de los estudios de análisis no dirigidos en modelos *in vitro/in vivo*.

		Plataforma GC-MS	Plataforma LC-MS
Modelos <i>in vitro</i>	Células HepaRG	●	
	Células HepG2	●	●
	Hepatocitos humanos		●
Modelos <i>in vivo</i>	Hígado de rata	●	●
	Suero de rata	●	●
	Suero humano	●	●

● Indica las plataformas utilizadas.

4.1.1 Alteraciones metabólicas más importantes detectadas en los modelos *in vitro*

La principal ventaja de los modelos *in vitro* en el estudio de la progresión de la EHGNA, u otras patologías, es que facilitan el estudio de los mecanismos bioquímico-moleculares implicados. Como contrapartida, estos modelos constituyen una aproximación simplista de la enfermedad y su evolución. En el caso concreto de la EHGNA, son muy escasos los estudios que han utilizado modelos *in vitro*, siendo los más

Discusión

usados los cultivos de células primarias (hepatocitos) y líneas de hepatoma (HepaRG, HepG2...) [89]. Estos estudios se han centrado fundamentalmente en el análisis de la esteatosis inducida por fármacos y en la propuesta de estrategias que permitan identificar moléculas con propiedades esteatogénicas. La importancia de identificar fármacos esteatósicos no sólo estriba en anticipar su capacidad para inducir daño tóxico de tipo esteatósico, sino también en la posibilidad de que contribuyan a aumentar la esteatosis iniciada por otros mecanismos o causas (síndrome metabólico, obesidad...) pudiendo acelerar o agravar la enfermedad. Fármacos de distintas clases se han asociado con esteatosis hepática en humanos y en modelos experimentales, y se ha sugerido que podrían favorecer el desarrollo de la esteatosis en pacientes susceptibles debido a otros factores de riesgo [123,269,274,275].

Mediante la plataforma GC-MS se analizaron los cambios metabolómicos inducidos por fármacos esteatósicos en células HepaRG y HepG2. Las alteraciones observadas afectaron principalmente a los niveles de aminoácidos, ácidos orgánicos y productos relacionados con el metabolismo de proteínas, encontrándose un número reducido de estos metabolitos comunes para ambos modelos (**Tabla 3.7**).

Las principales alteraciones metabólicas encontradas en el estudio con células HepaRG fueron el incremento en los niveles de aminoácidos ramificados, tales como valina, leucina e isoleucina (**Figura 3.6**). Estudios previos ya habían evidenciado el aumento de los niveles de aminoácidos esenciales en muestras de tejido hepático y suero humano de pacientes con esteatosis y EHNA [178], así como en muestras de hígado de roedores tratadas con dietas ricas en grasas [177,187], sugiriendo un desequilibrio en la tasa de recambio entre la síntesis y degradación de proteínas.

En cuanto a las principales alteraciones encontradas en el estudio con células HepG2, cabe destacar el incremento en los niveles de inositol y la disminución en los niveles de glutamina, así como en los niveles de

Discusión

ácido láctico y ácido glucónico (**Figura 3.9**). El inositol es esencial para el buen funcionamiento de las membranas celulares y las vías de señalización (mensajeros químicos) del organismo. Forma parte de la composición de las membranas y tiene la función de ayudar al hígado a procesar las grasas. Además, es necesario para el buen estado de las células y para el metabolismo de los lípidos [276]. No hemos encontrado estudios previos que relacionen la alteración de los niveles celulares de inositol con enfermedades hepáticas. Es posible que el aumento en los niveles que hemos observado pueda deberse al aumento de los niveles de lípidos y la implicación del inositol en el metabolismo de éstos. En cuanto a la disminución de los niveles de glutamina encontrados, está de acuerdo con información bibliográfica precedente, donde se asocia un déficit de glutamina a la esteatosis hepática [277]. Así mismo, algunos estudios relacionan la alteración en los niveles de glucosa con la esteatosis hepática [278], lo que podría explicar la alteración observada en los niveles de ácido glucónico, dado que éste se genera normalmente por oxidación de la glucosa. Por último, destacar que la esteatosis hepática se ha descrito como precursora de acidosis láctica [279], pudiendo ser la causa de la alteración en los niveles intracelulares de ácido láctico encontrados.

Las diferencias observadas en las rutas metabólicas alteradas en ambos tipos de células hepáticas tras el tratamiento con fármacos estatósicos, así como en los metabolitos con cambios más significativos (aminoácidos ramificados en HepaRG, y glutamina, ácido láctico, e inositol en HepG2) pueden deberse a que las HepaRG son células más diferenciadas, pudiendo verse reflejado este grado de diferenciación en diferencias metabólicas importantes. En este sentido, estudios previos realizados en nuestro laboratorio ya habían mostrado diferencias significativas en la respuesta de las células HepG2 y HepaRG a la exposición a fármacos esteatogénicos, lo que se traducía no sólo en diferencias en la acumulación de lípidos, sino también en parámetros

Discusión

celulares asociados a este mecanismo de toxicidad, tales como la generación de ROS o la disfunción mitocondrial [280]. Por otro lado, es necesario tener presente que las células HepaRG sólo se diferencian en cultivo si son mantenidas durante un periodo prolongado en presencia DMSO 2%. No existe un consenso generalizado sobre los efectos potenciales de este solvente sobre el metabolismo celular, pero se ha sugerido que la utilización de las concentraciones relativamente elevadas necesarias para la diferenciación de las células HepaRG puede alterar el metaboloma celular, e incluso inducir cierto nivel de citotoxicidad [281].

El número de variables detectadas fue mucho mayor en las células HepG2 que en las HepaRG (408 vs 103, respectivamente). Sin embargo, el número de metabolitos identificados con un VIP>1 fue muy similar (27 en ambos casos) y de idéntica naturaleza, en su mayoría aminoácidos y ácidos orgánicos. Debido a esto y al laborioso proceso experimental requerido a la hora de llevar a cabo los experimentos con células HepaRG (4 semanas de duración), frente a los experimentos con células HepG2 (5 días), optamos por ampliar el análisis de los cambios metabolómicos inducidos por los fármacos esteatóticos utilizando únicamente el modelo de células HepG2.

El estudio del lipidoma mediante la plataforma LC-MS, nos permitió centrarnos en las alteraciones metabólicas lipídicas en las células HepG2 y los hepatocitos humanos en cultivo. Cabe destacar que hasta el momento no hemos encontrado estudios dirigidos al estudio del lipidoma en estas células y su alteración por efecto de fármacos. Las principales alteraciones observadas en el estudio con células HepG2 fueron el incremento en los niveles de carnitinas, Cer, DG, PE, PS, ChE y TG (**Figura 3.12**). En cuanto a las principales alteraciones encontradas en hepatocitos humanos, relacionadas con especies lipídicas, fueron el incremento en los niveles de DG, TG (como en el modelo celular HepG2) y ácido palmítico, sin embargo también se observó una disminución en los niveles de PC, LisoPC, PE, PS y SM (**Figura 3.15**).

Discusión

La acumulación de TG en las células hepáticas es una de las principales características de la esteatosis. Nuestro estudio reveló un aumento de TG tras el tratamiento con fármacos esteatósicos tanto en células HepG2 (**Figura 3.12**) como en hepatocitos humanos (**Figura 3.15**). El incremento de los depósitos de TG es un hit en el desarrollo de esta patología y ha sido observado previamente en el hígado de pacientes con esteatosis [140,189,282], en modelos animales con dieta esteatósica [177,283-285] o tratados con fármacos esteatósicos [286-288], así como en modelos celulares de hepatoesteatosis *in vitro* [121,125,202]. Se han identificado diferentes mecanismos relacionados con la acumulación de TG y la esteatosis hepática inducida por fármacos [236,289]. Uno de los factores que más relevancia tiene es la reducción de la β -oxidación de AG debido a alteraciones mitocondriales [236,289-291]. Hay evidencias importantes que demuestran que el aumento de los niveles de AG libres puede favorecer el desarrollo de la enfermedad, incrementando el EO y activando rutas inflamatorias [292]. Por lo tanto, la mayor acumulación de AG en forma de TG se piensa que puede ser debida a una respuesta adaptativa y como mecanismo de protección de las células ante la disponibilidad excesiva de los AG libres del hígado [268,274,293]. Una deficiencia en la síntesis de TG ha demostrado producir una mejora (disminución) en la esteatosis hepática, pero también un incremento en la citotoxicidad, la fibrosis y el daño hepático [285,294].

Junto con la acumulación de TG, el incremento en los niveles de DG es el patrón lipídico más común asociado a la esteatosis hepática y ha sido descrito en muestras de tejido hepático [140,282,295] y suero [179,296,297] de pacientes con esteatosis. Este aumento de DG puede observarse en los modelos *in vitro* de HepG2 y hepatocitos humanos (**Figuras 3.12 y 3.15**). Los DG son intermediarios en la síntesis de TG y el aumento en sus niveles intracelulares pueden ser una consecuencia del elevado tráfico de AG libres y su conversión a monoglicéridos (MG), DG y

Discusión

finalmente TG (**Figura. 4.1**). Además, se ha demostrado que algunas transferasas específicas de DG están implicadas en la progresión de la EHGNA y la fibrosis hepática [298,299].

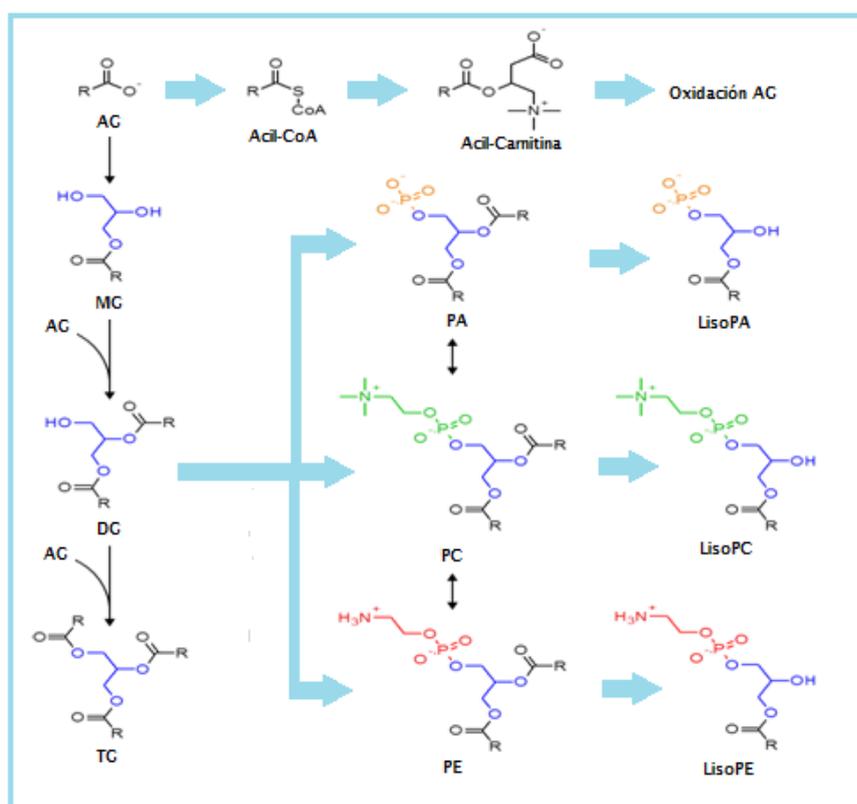


Figura 4.1. Principales rutas lipídicas. La parte correspondiente al enlace de glicerol está marcada en azul y los grupos polares de los diferentes fosfolípidos están marcados en diferentes colores. AG: ácido graso; MG: monoglicéridos; DG: diglicéridos; TG: triglicéridos; PA: ácido fosfatídico; PC: fosfatidilcolinas; PE: fosfatidiletanolamina. Figura adaptada de la referencia [217].

A diferencia de los TG, que están considerados como componentes no tóxicos en la esteatosis, la lista de posibles metabolitos lipotóxicos incluye AG, PL, ceramidas, DG, etc [274,293]. Además del aumento ya mencionado en DG, tras la exposición de células HepG2 a fármacos

Discusión

esteatogénicos también se observan incrementos en los niveles de algunas de estas moléculas lipídicas, incluyendo PL (PE, PS) (**Figura 3.12**). Estudios previos han mostrado niveles elevados de PL y LisoPL en muestras de biopsias de hígado y muestras de suero en pacientes con esteatosis hepática [179,189,282,296], en células HepaRG cargadas con palmitato [202] y en modelos de ratón con enfermedad del hígado graso y obesidad [177,180]. Un aumento en los niveles de PL y LisoPL (provenientes de la degradación hidrolítica de fosfolípidos por medio de la fosfolipasa A2) sugiere un mayor flujo de fosfolípidos [189]. Los niveles elevados de PL y LisoPL en hígado se han relacionado con el origen y progresión de un daño necro-inflamatorio de los hepatocitos y, en consecuencia, se ha encontrado una inducción de genes de la fosfolipasas A2 asociado a la EHNA [140,300]. A diferencia de lo observado en HepG2, se observó una disminución en los niveles de algunos PL (PE, PS, PC) en hepatocitos humanos expuestos a moléculas esteatóxicas (**Figura 3.15**). Estas diferencias pueden atribuirse no sólo a posibles diferencias existentes en el comportamiento funcional y el grado de diferenciación de ambos tipos de células (hepatocitos primarios vs. células de hepatoma), sino también a diferencias en el set de compuestos y las concentraciones de los mismos utilizadas en cada caso (**Tablas 2.3 y 2.5**). Para el tratamiento de los hepatocitos humanos se utilizó un número reducido de compuestos, dadas las limitaciones en la disponibilidad de estas células para el desarrollo de los experimentos. Las células HepG2 fueron tratadas con un número más amplio de compuestos y en el grupo de fármacos esteatóxicos se incluyeron algunos que no sólo inducen estatoxis, sino que también son fosfolipidósicos. Este es el caso de la amiodarona, un fármaco con propiedades esteatogénicas pero que también se ha descrito como un potente inductor de fosfolipidosis hepática [121,301]. De hecho la concentración de amiodarona que aumenta de forma significativa el

Discusión

contenido intracelular de fosfolípidos en células HepG2 es menor que la necesaria para inducir esteatosis (aumento de TG) [121,301].

A la hora de valorar estos resultados, hay que tener en cuenta que los hepatocitos humanos se obtienen a partir de pequeñas biopsias hepáticas de pacientes y por ello son muy escasos y difíciles de conseguir. Además, los hepatocitos humanos empleados en nuestro estudio se obtuvieron de un único donante, por lo que también habría que considerar que la respuesta observada puede estar condicionada por las características individuales del mismo y los resultados obtenidos deberían ser confirmados utilizando un mayor número de donantes.

Destacar finalmente que, hasta el momento, no se había abordado un estudio de la esteatosis inducida por fármacos en modelos *in vitro* de características similares al desarrollado en la presente Tesis, en la que se han comparado varios modelos celulares hepáticos (HepaRG, HepG2 y hepatocitos primarios), se ha incluido un número elevado de fármacos y se han usado tanto plataformas LC-MS como GC-MS como técnicas de análisis metabolómico. Nuestro estudio metabolómico permite abordar la esteatosis desde un enfoque diferente al aportado por otros estudios realizados anteriormente utilizando otras aproximaciones analíticas, proporcionando así información no accesible a través de otras técnicas alternativas (genómica, transcriptómica o la proteómica) [69,73]. El metaboloma y los cambios metabolómicos representan una aproximación más cercana al fenotipo que los genes, mRNA o proteínas [69, 74, 75], y por lo tanto, la metabolómica es más informativa del estado funcional de las células que otras técnicas de análisis y puede complementar la información aportada por las otras ómicas.

Discusión

4.1.2 Cambios metabólicos más importantes detectados en el modelo *in vivo* de rata

Como se ha destacado anteriormente, si bien los modelos *in vitro* aportan información de gran valor a la hora de establecer los mecanismos bioquímico-moleculares que subyacen en la EHGNA, ofrecen una visión muy simplificada de la misma. Los modelos experimentales en animales aportan una visión más completa de esta patología, posibilitando que se puedan integrar y relacionar los múltiples factores que condicionan su desarrollo y evolución. La esteatosis es una condición multifactorial, cuya aparición es el resultado de un conjunto de causas o factores desencadenantes de naturaleza farmacológica o de otra índole. En este sentido, ya se ha apuntado en un apartado anterior que el consumo de fármacos con capacidad esteatogénica podría actuar como un factor potenciador de la esteatosis de base que presentan determinados individuos, o incluso activar o desencadenar su progresión hacia formas más severas de la EHGNA. Con el objetivo de explorar este posible efecto adicional, se realizó un estudio metabólico exhaustivo en un modelo experimental *in vivo* de esteatosis (ratas alimentadas con una dieta rica en grasas) en combinación con la administración de un fármaco esteatósico (tetraciclina). Siguiendo la tendencia observada en los modelos *in vitro*, el tratamiento con tetraciclina y el uso de una dieta rica en grasas indujo un aumento en los niveles hepáticos de TG. En paralelo se observó una disminución en los niveles de AG (**Figura 3.18**). Estos cambios sugieren un incremento en el flujo de síntesis de TG a partir de AG, tal y como ha sido asociado previamente a la exposición a tetraciclina [121,289]. Sin embargo, la elevación de los niveles intrahepáticos de TG no estuvo acompañada de su aumento en suero (**Tabla 3.14**). Esto puede estar relacionado con la capacidad de la tetraciclina de inhibir la actividad de la proteína microsomal de transferencia de TG [302], clave en el ensamblaje y la exportación

Discusión

hepática de TG en forma de lipoproteínas, causando de este modo la disminución de los niveles plasmáticos de TG. También se detectaron cambios en los niveles hepáticos (**Figura 3.18**) y séricos (**Figura 3.20**) de sales biliares tras la exposición a la tetraciclina, en ausencia de efectos destacables debidos al tipo de dieta administrada. El tratamiento con tetraciclina indujo un incremento en los niveles de las sales biliares conjugadas con taurina (T2OHCA y T3OHCA) acompañado de un incremento en los niveles de taurina, así como una disminución de las sales biliares conjugadas con glicina (G2OHCA y G3OHCA) y de los niveles de glicina. Esta tendencia diferente de los niveles de sales biliares conjugadas con taurina y glicina se ha descrito en trabajos previos donde se estudiaba la síntesis, composición y toxicidad de BAs en muestras de tejido hepático humano, y se ha asociado a una mayor o menor hidrofobicidad (asociada a una mayor o menor toxicidad) de las mismas [188]. Además, ambos tipos de sales biliares no se encuentran en la misma proporción en el organismo, en concreto las conjugadas con taurina son la clase mayoritaria en el hígado de rata, pudiendo verse alteradas de forma diferente [87]. Estudios previos ya habían puesto de manifiesto las alteraciones en los niveles de distintas sales biliares en diferentes tipos de muestras, incluidas tejido hepático, suero u orina, en ratas tratadas con tetraciclina [170,172,303].

Se detectaron también cambios en los niveles de varios metabolitos relacionados con el EO. El tratamiento con tetraciclina indujo un incremento en los niveles hepáticos de GSSG y SAH (**Figura 3.18**) y en los niveles plasmáticos de SAH, tirosina y fenilalanina (**Figura 3.20**), indicando una disminución en la capacidad antioxidante global. Esto estaba conforme con las alteraciones en los niveles de metabolitos relacionados con EO descritas tanto en estudios celulares con fármacos esteatósicos como en muestras de tejido hepático y suero de pacientes con esteatosis hepática [270]. En el mismo sentido, la disminución observada en los niveles séricos de tocoferol (**Figura 3.25**) puede

Discusión

atribuirse a la situación de EO asociada a la esteatosis, en la que la célula debe compensar la producción de agentes oxidantes con un mayor consumo de agentes implicados en la defensa antioxidante. Es por ello que en pacientes con esteatosis, se han encontrado niveles reducidos de antioxidantes vitamínicos como el α -tocoferol debido probablemente al agotamiento de los mismos [304]. Otra alteración observada fue la disminución en los niveles hepáticos de NAD^+ (**Figura 3.18**), que puede estar relacionada con la alteración del estado redox causado por la inhibición de la β -oxidación mitocondrial, asociada al aumento de TG y a la esteatosis hepática [305]. Finalmente, se detectó un aumento en los niveles totales de carnitinas en suero (**Figura 3.20**). Resultados similares se han descrito en muestras de suero de ratas tratadas con tetraciclina [172] y en suero de pacientes con esteatosis [178].

El hígado es el órgano central en el metabolismo de los aminoácidos y el deterioro de su función se evidencia en la alteración de los niveles intrahepáticos de aminoácidos (**Figura 3.23**). Estos hallazgos están de acuerdo con resultados anteriores que indican un aumento de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano...) y una disminución de los aminoácidos ramificados (isoleucina, leucina, valina...) en pacientes con problema hepáticos, tales como esteatosis o estadios más severos [306-308]. Por otro lado, el aumento en los niveles hepáticos de azúcares (**Figura 3.23**), está en concordancia con la información bibliográfica disponible que sugiere que el aumento de glucosa y monosacáridos en general es una de las alteraciones metabólicas más comunes asociada a la esteatosis hepática [309]. Finalmente, se encontró una disminución en los niveles hepáticos de N-acetilglucosamina, que ha sido relacionada en estudios previos con enfermedades hepáticas [310].

En cuanto a la disminución en los niveles de inositol encontrados en suero (**Figura 3.25**), coincide con la información bibliográfica disponible. El inositol es una sustancia que actúa como mensajera en la vía de la

Discusión

insulina y que está involucrada en el metabolismo de grasas. La aparición de esteatosis puede afectar a la resistencia insulínica y se ha observado una disminución en los niveles de inositol en modelos de rata [311] y humanos [312] con problemas insulínicos.

En este estudio metabólico se planteó el análisis comparativo de los efectos metabólicos relacionados con la esteatosis hepática de origen iatrogénico (administración de tetraciclina) y de la inducida por una alimentación prolongada con una dieta rica en grasas. El análisis no supervisado de los datos (*Heatmap*) obtenido tras analizar las muestras de suero e hígado mediante las plataformas LC-MS y GC-MS reveló que la separación principal de los grupos es debida al efecto del fármaco (**Figuras 3.17, 3.19, 3.22 y 3.24**). En todos los casos se consigue una separación óptima de los grupos con y sin tratamiento con tetraciclina. Sin embargo, no ocurre lo mismo en el caso de la dieta, no observándose una separación completa de los grupos (dieta control y esteatósica), a excepción de las muestras de tejido hepático analizadas por LC-MS, para las que se logra una separación óptima de los 4 grupos mediante el *Heatmap* (**Figura 3.17**). A pesar de ello, esta separación sigue siendo secundaria, prevaleciendo el tipo de tratamiento farmacológico como separación principal.

En cuanto a los metabolitos discriminantes para cada una de las condiciones, puede observarse que en el caso de los análisis llevados a cabo mediante la plataforma LC-MS hay una gran cantidad de metabolitos (TG, AG, BA, compuestos relacionados con EO...) que presentan diferencias significativas al comparar muestras con y sin tetraciclina (**Figuras 3.18 y 3.20, Tablas 3.16 y 3.17**). Sin embargo, no ocurre así al analizar el efecto del tipo de dieta. Sólo en el caso de los TG y AG en las muestras de tejido hepático (**Figura 3.18, Tabla 3.16**) y de los AG en las muestras de suero (**Figura 3.20, Tabla 3.17**) se observan cambios significativos debidos al tipo de dieta, de forma adicional a los efectos inducidos por el tratamiento farmacológico. Por último, tras el

Discusión

análisis de las muestras mediante la plataforma GC-MS (**Figuras 3.23 y 3.25, Tablas 3.19 y 3.21**), las únicas diferencias significativas fueron debidas a la esteatosis de tipo iatrogénico. Estos resultados parecen indicar que los cambios metabolómicos observados son debidos fundamentalmente al tratamiento con tetraciclina y, en menor grado, al efecto de la dieta. Sin embargo, cabe resaltar, que la mayor acumulación de TG en el hígado se produce al sumar el efecto de la tetraciclina y la dieta, alcanzándose niveles de TG superiores a los obtenidos al estudiar el efecto del fármaco o de la dieta por separado (**Figura 3.18**). Este hecho apoyaría nuestra hipótesis inicial de que el tratamiento con fármacos esteatósicos puede potenciar la esteatosis hepática iniciada por otras causas.

4.1.3 Búsqueda de la firma metabólica de la EHNA en humanos

En el estudio inicial de muestras de suero humano llevado a cabo con la plataforma GC-MS, se compararon sueros de pacientes diagnosticados con EHNA y de pacientes sin lesión hepática (grupo control). Se encontraron diferencias significativas, tales como el aumento en los niveles de fenilalanina y colesterol, así como la disminución en la concentración de alanina y serina (**Figura 3.28**). Estas observaciones están de acuerdo con los hallazgos observados anteriormente en nuestros estudios con los modelos experimentales *in vitro* (cultivos celulares) e *in vivo* (ratas), así como con en estudios de otros autores, en los que se ha descrito un aumento en los niveles de aminoácidos aromáticos (fenilalanina) junto a la disminución de otros aminoácidos (alanina, serina) en pacientes con problemas hepáticos [306-308]. Los niveles ligeramente más elevados de colesterol hallados en los pacientes con EHNA son los esperados, si tenemos en cuenta que una acumulación excesiva de grasas en el hígado genera un aumento de la síntesis de apolipoproteínas LDL y VLD, que se traduce en una elevación del

Discusión

colesterol y los triglicéridos en sangre [313]. El modelo que se ha obtenido mediante la aplicación del análisis PLS-DA diferencia bien entre las dos clases de muestras (**Figura 3.26**), con unos parámetros bastante buenos en términos de explicación de la varianza de los datos y de la capacidad predictiva del modelo, encontrándose una firma metabólica capaz de diferenciar entre pacientes control y con EHNA.

Dado que el número de muestras disponibles para este estudio inicial no fue muy elevado, se optó por realizar un segundo estudio con un mayor número de muestras aplicando en este caso la plataforma analítica LC-MS, capaz de aportar una cobertura metabólica distinta. El objetivo era comprobar si éramos capaces de separar no sólo entre muestras de pacientes control o con EHNA, sino también discriminar entre muestras control y con distintos grados de EHGNA ($NAS < 5$ y $NAS \geq 5$), según el criterio de Kleiner [51], más detallado en la **sección 2.9.2**. En la **Figura 3.29** se puede ver una buena separación de los 3 grupos de muestras en base al modelo obtenido mediante PLS-DA; encontrándose una firma metabólica capaz de diferenciar entre pacientes con estadios de EHGNA bajos ($NAS < 5$), con estadios de EHGNA altos ($NAS \geq 5$) y pacientes control.

Se encontró un aumento en los niveles de betaína, cisteína, glutamato, algunos glutamil-dipéptidos (GluLeu, GluVal, GluPhe...), algunas sales biliares (TCA y GCA) y alteraciones en compuestos relacionados con EO (disminución de GSSG, aumento de SAM y AcOft) en los pacientes diagnosticados con algún grado de esteatosis (**Figura 3.31**). El incremento en los niveles de BAs y los cambios observados en los niveles de especies relacionadas con EO, son indicativos de alteración en la homeostasis de los ácidos biliares y disfunción mitocondrial. Asimismo, los cambios en los niveles de algunos aminoácidos, glutamato o glutamil-dipéptidos sugieren alteraciones en el metabolismo energético y el metabolismo y transporte de aminoácidos [87,189].

Discusión

En la **Figura 4.2** puede verse a modo de resumen un esquema de las alteraciones metabólicas que pueden tener lugar en el hígado humano durante la esteatosis.

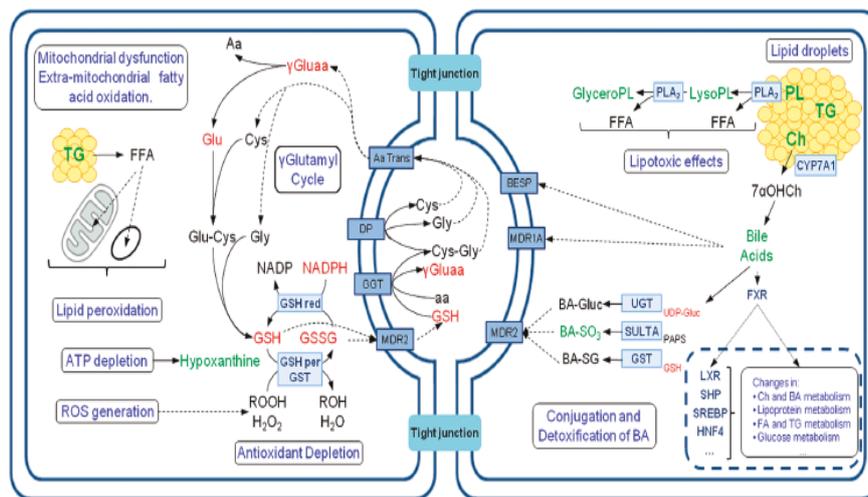


Figura 4.2. Alteraciones metabólicas en el tejido hepático esteatósico humano. Se observan alteraciones en lípidos, sales biliares, aminoácidos, glutamilo-dipeptidos y en la capacidad antioxidante como resultado de una acumulación excesiva de grasa en el hígado. Figura adaptada de la referencia [189].

La importancia de estos resultados radica en que hemos sido capaces de observar diferencias metabólicas significativas no sólo entre pacientes sin lesión hepática y pacientes con estadios de EHGNA más severa como la EHNA ($NAS \geq 5$), sino también con aquellos que presentan un estadio de EHGNA menos severo sin llegar a la EHNA ($NAS < 5$) (**Tabla 3.28** y **Figura 3.31**). Todo ello resulta prometedor con vistas a un posible uso futuro de herramientas metabolómicas para el pronóstico y diagnóstico de la EHGNA mediante procedimientos no invasivos.

Discusión

4.2. Búsqueda de biomarcadores de la EHGNA mediante análisis dirigido

Dada la importancia del EO en la esteatosis, en la presente Tesis nos propusimos el desarrollo de un método dirigido a la identificación de biomarcadores de EO en distintas matrices. El método permite la cuantificación simultánea de diferentes metabolitos que aportan información sobre el estatus oxidativo global y sobre daño oxidativo inducido a diferentes componentes celulares (lípidos, proteínas y DNA). Para la optimización y validación del método se aplicó a modelos experimentales *in vitro/in vivo* de EO.

4.2.1. Inducción de EO en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*

Como modelo *in vitro* se utilizaron hepatocitos de rata tratados con cumene hidroperóxido 500 μM , un conocido inductor de EO. Tras 24 h de tratamiento, se encontraron cambios significativos en las formas tanto oxidada como reducida de glutatión (GSSG y GSH) en la monocapa celular (**Figura 3.35.A**). El ratio intracelular GSH/GSSG disminuyó substancialmente, indicando una disminución en la capacidad antioxidante global de las células, que se confirmó con el aumento de AcOft observado en paralelo (**Figura 3.35.A**). Este metabolito endógeno es un análogo estructural no sulfurado del glutatión y ha sido propuesto recientemente como un marcador indirecto de disminución de GSH y de inducción de EO *in vivo* [86]. Sin embargo, la elevación de AcOft intracelular en células en cultivo expuestas a inductores químicos de EO no ha sido documentada hasta el momento. Nuestros resultados sugieren que el AcOft también podría ser considerado un marcador de EO en sistemas *in vitro*.

Otros efectos remarcables observados en los hepatocitos expuestos a cumene hidroperóxido son el incremento en el ratio SAM/SAH intracelular (**Figura 3.35.A**) y en los niveles extracelulares de MDA

Discusión

(Figura 3.35.B). El SAM es un importante precursor del GSH y participa en muchas rutas metabólicas claves de la homeostasis hepática actuando como un donante de metilo a diferentes moléculas (ADN, ARN, azúcares, fosfolípidos y proteínas) junto a la producción de SAH [314]. Un incremento similar en el ratio SAM/SAH ha sido documentado previamente en cultivos de células pulmonares humanas expuestas a altas concentraciones de peróxidos [315]. El incremento en los niveles de MDA evidencia que el cumene hidroperóxido induce daño oxidativo lipídico en cultivos de hepatocitos. Estos resultados están en concordancia con estudios *in vitro* previos que han demostrado la capacidad de este tóxico de inducir generación de ROS, disminución de GSH y peroxidación lipídica en células hepáticas [122,316].

También se evaluó la hidroxilación de la Phe para formar p-Tyr, m-Tyr y o-Tyr como un indicador de daño oxidativo a proteínas. Se encontró un importante incremento en el ratio p-Tyr/Phe en las células y en el medio de cultivo después de la exposición a cumene hidroperóxido, con un nulo o menor cambio en la producción de o-Tyr y m-Tyr (Figuras 3.35.A y 3.35.B). Estos resultados sugieren un potencial daño oxidativo a proteínas inducido por el cumene hidroperóxido, no documentado previamente en hepatocitos en cultivo. El método analítico también estaba diseñado para permitir la determinación de especies derivadas de p-Tyr, formadas potencialmente por el ataque de especies reactivas de cloro, bromo, yodo y nitrógeno a proteínas [317]. Se encontraron niveles intracelulares medibles de N-Tyr y I-Tyr en los hepatocitos en cultivo, mientras que se detectaron Cl-Tyr y I-Tyr en el medio de cultivo (Figuras 3.35.A y 3.35.B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los hepatocitos control y los tratados.

La administración de paracetamol, un conocido inductor de EO en rata tras un tratamiento prolongado, nos permitió explorar la idoneidad del método desarrollado en un modelo *in vivo*. Tras una semana de tratamiento, se encontraron cambios en los niveles hepáticos de GSSG y

Discusión

GSH, con disminución del ratio GSH/GSSG (**Figura 3.36.A**). En concordancia con este hallazgo, se observó un aumento en los niveles de AcOft tanto en tejido hepático como en suero (**Figuras 3.35.A y 3.36.B**). Otros efectos observados fueron el incremento en el ratio SAM/SAH en las muestras de tejido y suero (**Figura 3.36.A y Figura 3.36.B**) y en los niveles de MDA en suero (**Figura 3.36.B**). Estudios previos han mostrado una disminución de GSH y del ratio GSH/GSSG y un incremento de AcOft y MDA en condiciones de EO [78,85]. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en los marcadores de daño oxidativo a proteínas y DNA analizados (**Figura 3.36.A y Figura 3.36.B**)

En conjunto, nuestros resultados indican que la estrategia propuesta es adecuada para la detección de biomarcadores de daño de EO en células en cultivo, tanto a nivel intracelular como extracelular, así como en muestras de tejido hepático y suero.

4.2.2. Marcadores de EO en pacientes con EHNA

En el análisis de muestras de tejido hepático y suero, se encontraron diferencias significativas en el estado oxidativo entre los dos grupos (pacientes control y con EHNA). En particular, el ratio GSH/GSSG era significativamente más bajo en los hígados de pacientes con EHNA en comparación con los hígados control (**Figura 3.37.A**). Es importante tener en cuenta que un cambio en el ratio GSH/GSSG, y por lo tanto en el estado oxidativo, puede activar muchas rutas metabólicas de señalización, incluyendo proteína quinasa B, proteínas fosfatasa 1 y 2A, calcineurina, factor nuclear B, quinasa c-Jun N-terminal, señal regulada de la apoptosis quinasa 1 y la proteína quinasa activada por mitógeno, reduciendo de ese modo la proliferación celular y el aumento de la apoptosis [318].

En concordancia con la disminución del ratio GSH/GSSG, se observó un aumento en los niveles de AcOft en las muestras de EHNA tanto de

Discusión

hígado como de suero (**Figuras 3.37.A y 3.37.B**). En cuanto al ratio SAM/SAH, se encontró un valor muy similar en las muestras de tejido hepático de ambos grupos, mientras que se observó un aumento significativo en el suero de pacientes con EHNA (**Figura 3.37.B**). Este aumento en los niveles de SAM puede deberse a una deficiencia en la regulación de la glicina N-metiltransferasa (GNMT), la cual influye en el desarrollo de la hiperlipidemia y la esteatohepatitis [319]. Se observó un aumento de los niveles séricos y hepáticos de MDA en los pacientes con EHNA, aunque dicho aumento sólo fue estadísticamente significativo en las muestras de tejido. Nuestros resultados están de acuerdo con estudios previos que han mostrado una disminución de GSH y del ratio GSH/GSSG, así como un incremento de AcOft y MDA, bajo condiciones de EO [78,85]. La 8-IsoPGF ha sido presentada como un marcador de daño lipídico [320]. Sin embargo, en nuestras muestras los niveles estaban por debajo del LOD. Respecto al daño en proteínas, se encontraron diferencias significativas en los ratios p-Tyr/Phe y o-Thy/Phe entre las muestras control y de EHNA en suero. La N-Tyr sólo fue cuantificada en las muestras de tejido hepático, mientras que la Cl-Tyr solamente en muestras de suero. Sin embargo, sus respectivos ratios con la Phe no difirieron entre los dos grupos. Por último, el análisis de los biomarcadores seleccionados para estudiar el daño a ADN reveló niveles similares de 2-dG en ambos grupos (**Figuras 3.37.A y 3.37.B**) y niveles de 8-OH-dG indetectables en todas las matrices biológicas estudiadas. Los LOQs de nuestro método son comparables con los de otros métodos analíticos que no usan extracción en fase sólida [321,322] y, además, nuestro método permite la detección de 8-OH-dG en muestras de orina control (datos no mostrados), lo que concuerda con los estudios previos que sugieren que la orina es el fluido biológico ideal para cuantificación de 8-OH-dG [323].

En conjunto, estos resultados no sólo evidencian el daño oxidativo inducido en hígados con EHNA sino que también confirman la potencial

Discusión

utilidad del AcOft en suero como biomarcador para seguir la progresión de hígado graso a EHNA. Además, también revelan que el presente método es una herramienta analítica muy útil y versátil para analizar biomarcadores de EO en muestras de tejido y suero en pacientes con algún tipo de lesión hepática, demostrando la potencial utilidad de esta nueva aproximación analítica en la evaluación de muestras clínicas.

4.2.3. Ácido oftálmico como nuevo biomarcador sérico de EHGNA

En el estudio llevado a cabo con muestras de suero humano procedente de pacientes con distinto grado de EHGNA, se ha encontrado una relación directa entre el nivel sérico de AcOft y el grado de NAS-Score de los pacientes, aumentando los niveles de dicho biomarcador conforme lo hacía el grado de la lesión (**Figura 3.38**). Con este hallazgo se pone de manifiesto por primera vez la posible utilidad de este biomarcador para permitir diferenciar no sólo entre pacientes sanos y con esteatosis, sino también entre distintos grados de esteatosis, desde la simple hasta la EHNA. En otros estudios se ha hablado del uso de diversos γ -glutamil dipéptidos como biomarcadores de distintas enfermedades hepáticas [324], pero sin destacar el uso del AcOft como biomarcador capaz de diferenciar entre pacientes con esteatosis simple y EHNA. Además, para confirmar dichos resultados, se midió también el ratio GSH/GSSG. Como se ha comentado anteriormente, los niveles de AcOft y GSH están inversamente relacionados, asociándose un aumento de los niveles de AcOft con una disminución de GSH [86]. Esto se explica teniendo en cuenta el mecanismo de biosíntesis del AcOft. En condiciones reductivas, la enzima γ -glutamilcisteína sintetasa (GCS) está inhibida parcialmente por el GSH, haciendo que sólo una pequeña cantidad de 2-aminobutarato (2AB) pueda terminar sintetizándose en AcOft. Sin embargo, en condiciones oxidativas, se consume GSH y sus

Discusión

niveles disminuyen, permitiendo la activación de la GCS. Esto, a su vez, hace que se produzca una síntesis elevada de AcOft (**Figura 4.3**).

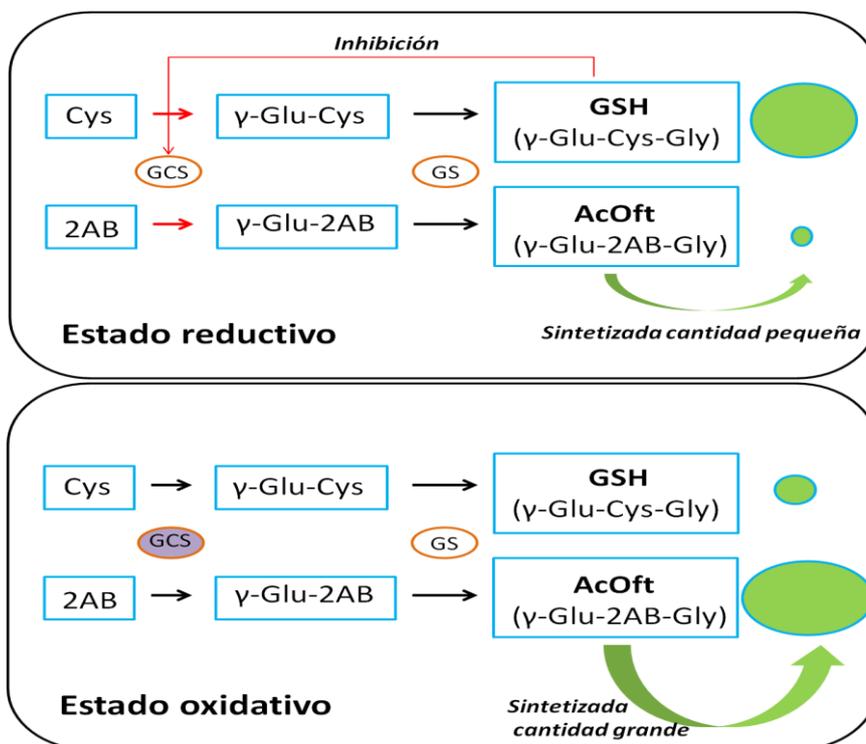


Figura 4.3. Mecanismo de la biosíntesis del ácido oftálmico. La enzima GCS está inhibida por el GSH en condiciones reductoras, sintetiéndose una pequeña cantidad de AcOft. Sin embargo, en condiciones oxidativas, se consume GSH, permitiendo la activación de la GCS. Esto permite la síntesis elevada de AcOft. GCS; γ -glutamilcisteína sintetasa; GS: glutatión sintetasa; 2AB: 2-aminobutarato. Figura adaptada de la referencia [86].

Por lo tanto, el aumento en los niveles de AcOft debería verse reflejado en una disminución de GSH y del ratio GSH/GSSG, tal y como se observa en la **Figura 3.38**. Finalmente, también de forma novedosa, se ha puesto de manifiesto la posible correlación de este biomarcador con el grado de fibrosis hepática (**Figura 3.39**).

Discusión

Todos estos resultados abren nuevas expectativas sobre la potencial utilidad de AcOft como un nuevo marcador de EHGNA con utilidad clínica. La finalidad última es la de facilitar el diagnóstico de patologías hepáticas de forma más sencilla y menos traumática que las biopsias hepáticas. Esto podría lograrse mediante, por ejemplo, una simple extracción de sangre y analizando las muestras de suero obtenidas, con el consiguiente beneficio directo tanto para las instituciones sanitarias como para los pacientes.

5. Conclusiones

Conclusiones

El trabajo expuesto en la presente tesis, basado en el estudio metabolómico de la EHGNA, se divide en dos partes. En primer lugar, la identificación y estudio del perfil metabolómico de la esteatosis mediante el uso de diferentes aproximaciones analíticas basadas en la espectrometría de masas y el uso de distintos modelos *in vitro* e *in vivo*. En segundo lugar, el desarrollo de métodos analíticos dirigidos, para la obtención de información de distintos estadios de la enfermedad y la estratificación de pacientes.

Basado en el trabajo descrito en la tesis podemos extraer las siguientes conclusiones:

- 1) El uso de PIs, QCs, junto a un cuidadoso diseño del método de análisis, define un marco de trabajo de calidad permitiendo estudiar el rendimiento de la plataforma analítica antes, durante y después del análisis de las muestras. Esto, junto al uso de herramientas uni- y multivariantes para el análisis de los datos, proporciona una estrategia robusta para la identificación de alteraciones metabolómicas y el desarrollo de modelos predictivos y/o clasificatorios.
- 2) La aplicación de plataformas LC-MS y GC-MS complementarias proporciona una mayor cobertura metabolómica de la firma metabólica de la EHGNA. La huella metabolómica característica de la enfermedad, en los modelos *in vitro* e *in vivo* estudiados, está compuesta fundamentalmente por aminoácidos, marcadores de EO y marcadores de origen lipídico, entre los que encontramos ácidos biliares, fosfolípidos, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas y esfingomielinas entre otros.

Conclusiones

- 3) Las alteraciones metabólicas observadas en el modelo de esteatosis en ratas, que afectan fundamentalmente a aminoácidos y compuestos lipídicos, están en concordancia con los resultados obtenidos en los modelos celulares, sugiriendo que el uso complementario de ambas estrategias experimentales, *in vivo* e *in vitro*, puede constituir una alternativa adecuada para el estudio de la EHGNA.
- 4) El análisis metabolómico en el modelo experimental de esteatosis en ratas sugiere que los fármacos esteatogénicos (tetraciclina) potencian la esteatosis inducida por otras causas (dieta).
- 5) Los estudios metabolómicos en hígado y suero humano muestran alteraciones significativas en los niveles de BAs, marcadores de EO y γ -glutamil-dipéptidos que se pueden relacionar con distintos grados de severidad de la EHGNA.
- 6) El método desarrollado para la determinación de parámetros de EO proporciona una estrategia analítica simple y rápida para la cuantificación eficaz de una serie de biomarcadores de EO, cuya aplicabilidad abarca diferentes matrices biológicas (suero, tejido hepático, células y medio de cultivo). El presente método permite el análisis integrado de la capacidad antioxidante global y el potencial daño oxidativo en el ADN, lípidos y proteínas mediante un único método analítico.
- 7) El análisis de sueros de pacientes apuntan hacia el AcOft como un candidato a biomarcador sérico de la EHGNA, permitiendo diferenciar no sólo entre pacientes sanos y con esteatosis, sino también entre distintos grados de esteatosis, desde la simple hasta la EHNA.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Renato P, Correa AV, Nathanson MH (2007) Functional organization of the liver. In: Rodés J, Benhamou J-P, Blei AT, Reichen JR, Manocchia M (eds) Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice. 3rd edition edn. Malden: Wiley-Blackwell Publishing.,
2. Grisham JW (2009) Organizational Principles of the Liver. In: Arias IM, Alter HJ, Boyer JL et al. (eds) The Liver: Biology and Pathobiology 5th Edition edn. John Wiley & Sons, Ltd,
3. Bioulac-Sage P, Le Bail B, Balabaud C (2007) Liver and biliary tract histology. In: Rodés J, Benhamou JP, Blei AT, Reichen JR, Manocchia M (eds) Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice. 3rd edition edn. Malden: Wiley-Blackwell Publishing.,
4. Frayn KN (2010) Metabolic Regulation : A Human Perspective. 3rd Edition edn. Wiley-Blackwell,
5. LeCluyse EL, Witek RP, Andersen ME, Powers MJ (2012) Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Critical reviews in toxicology* 42:501-548
6. Rappaport AM (1977) Microcirculatory units in the mammalian liver. Their arterial and portal components. *Bibliotheca anatomica*:116-120
7. Kmiec Z (2001) Cooperation of liver cells in health and disease. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* 161:III-XIII, 1-151
8. Mehal WZ (2007) Intrahepatic lymphocytes. In: Rodés J, Benhamou JP, Blei AT, Reichen JR, Manocchia M (eds) Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice. 3rd edition edn. Malden: Wiley-Blackwell Publishing.,
9. Semela D, Shah VH (2007) Liver sinusoidal endothelial cells. In: Rodés J, Benhamou JP, Blei AT, Reichen JR, Manocchia M (eds) Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice. 3rd edition edn. Malden: Wiley-Blackwell Publishing.,
10. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, Bode JG, Bolleyn J, Borner C, Bottger J, Braeuning A, Budinsky RA, Burkhardt B, Cameron NR, Camussi G, Cho CS, Choi YJ, Craig Rowlands J, Dahmen U, Damm G, Dirsch O, Donato MT, Dong J, Dooley S, Drasdo D, Eakins R, Ferreira KS, Fonsato V, Fraczek J, Gebhardt R, Gibson A, Glanemann M, Goldring CE, Gomez-Lechon MJ, Groothuis GM, Gustavsson L, Guyot C, Hallifax D, Hammad S, Hayward A, Haussinger D, Hellerbrand C, Hewitt P, Hoehme S, Holzhutter HG, Houston JB, Hrach J, Ito K, Jaeschke H, Keitel V, Kelm JM, Kevin Park B, Kordes C, Kullak-Ublick GA, LeCluyse EL, Lu P, Luebke-Wheeler J, Lutz A, Maltman DJ, Matz-Soja M, McMullen P, Merfort I, Messner S, Meyer C, Mwinyi J, Naisbitt DJ, Nussler AK, Olinga P, Pampaloni F, Pi J, Pluta L, Przyborski SA, Ramachandran A, Rogiers V, Rowe C, Schelcher C, Schmich K, Schwarz M, Singh B, Stelzer EH,

Bibliografía

- Stieger B, Stober R, Sugiyama Y, Tetta C, Thasler WE, Vanhaecke T, Vinken M, Weiss TS, Widera A, Woods CG, Xu JJ, Yarborough KM, Hengstler JG (2013) Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of toxicology* 87:1315-1530
11. Cullen JM (2005) Mechanistic classification of liver injury. *Toxicologic pathology* 33:6-8
 12. Lee WM (2003) Drug-induced hepatotoxicity. *The New England journal of medicine* 349:474-485
 13. Russmann S, Kullak-Ublick GA, Grattagliano I (2009) Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. *Current medicinal chemistry* 16:3041-3053
 14. Liddle C, Stedman CA (2007) Hepatic metabolism of drugs. In: Rodés J, Benhamou J-P, Blei AT, Reichen JR, Manocchia M (eds) *Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice*. 3rd edition edn. Malden: Wiley-Blackwell Publishing.,
 15. Holt M, Ju C (2010) Drug-induced liver injury. *Handbook of experimental pharmacology*:3-27
 16. Kaplowitz N (2004) Drug-induced liver injury. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 38 Suppl 2:S44-48
 17. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ (1980) Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic proceedings* 55:434-438
 18. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA (1994) Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 107:1103-1109
 19. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ (1999) Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 116:1413-1419
 20. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S (2005) Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 42:44-52
 21. Lazo M, Clark JM (2008) The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Seminars in liver disease* 28:339-350
 22. Ong JP, Younossi ZM (2007) Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clinics in liver disease* 11:1-16, vii
 23. Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G (2010) Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 28:155-161

Bibliografía

24. Angulo P (2007) GI epidemiology: nonalcoholic fatty liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 25:883-889
25. Maheshwari A, Thuluvath PJ (2006) Cryptogenic cirrhosis and NAFLD: are they related? *The American journal of gastroenterology* 101:664-668
26. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ (2012) The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 55:2005-2023
27. Wong VW, Wong GL, Choi PC, Chan AW, Li MK, Chan HY, Chim AM, Yu J, Sung JJ, Chan HL (2010) Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut* 59:969-974
28. McCullough AJ (2002) Update on nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of clinical gastroenterology* 34:255-262
29. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P (2005) The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 129:113-121
30. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M (2002) Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 123:134-140
31. Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, Landeira G, Longo C (2004) Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology* 40:820-826
32. Caballeria J, Rodes J (2003) [Non-alcoholic steatohepatitis]. *Medicina clinica* 120:670-675
33. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M (2002) Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 35:367-372
34. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S (2010) Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 51:679-689
35. Day CP, James OF (1998) Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114:842-845
36. Angulo P, Alba LM, Petrovic LM, Adams LA, Lindor KD, Jensen MD (2004) Leptin, insulin resistance, and liver fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology* 41:943-949
37. Bugianesi E, Manzini P, D'Antico S, Vanni E, Longo F, Leone N, Massarenti P, Piga A, Marchesini G, Rizzetto M (2004) Relative contribution of iron burden,

Bibliografía

HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 39:179-187

38. Macias-Rodriguez RU, Torre A (2009) [Pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis. An insulin resistance overview]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion* 61:161-172

39. Tilg H, Moschen AR (2010) Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52:1836-1846

40. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN (2010) Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 103:71-83

41. Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ (2009) Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators of inflammation* 2009:831670

42. Verónica Martín RG, Jorge Mendoza, Luisa García y Ricardo Moreno-Otero (2013) Etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 105:409-420

43. Bahcecioglu IH, Yalniz M, Ataseven H, Ilhan N, Ozercan IH, Seckin D, Sahin K (2005) Levels of serum hyaluronic acid, TNF-alpha and IL-8 in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepato-gastroenterology* 52:1549-1553

44. Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J (2002) Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 36:403-409

45. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ (2009) Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* 50:1072-1078

46. Marra F, Bertolani C (2009) Adipokines in liver diseases. *Hepatology* 50:957-969

47. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K (2005) Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 25:779-786

48. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE (2008) Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *The American journal of gastroenterology* 103:1372-1379

49. Wong VW, Hui AY, Tsang SW, Chan JL, Tse AM, Chan KF, So WY, Cheng AY, Ng WF, Wong GL, Sung JJ, Chan HL (2006) Metabolic and adipokine profile of Chinese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 4:1154-1161

Bibliografía

50. Procaccini C, Galgani M, De Rosa V, Carbone F, La Rocca C, Ranucci G, Iorio R, Matarese G (2010) Leptin: the prototypic adipocytokine and its role in NAFLD. *Current pharmaceutical design* 16:1902-1912
51. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ (2005) Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41:1313-1321
52. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE (2001) Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 121:91-100
53. Guha IN, Parkes J, Roderick PR, Harris S, Rosenberg WM (2006) Non-invasive markers associated with liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 55:1650-1660
54. Shimada M, Hashimoto E, Kaneda H, Noguchi S, Hayashi N (2002) Nonalcoholic steatohepatitis: risk factors for liver fibrosis. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 24:429-438
55. Valenti L, Fracanzani AL, Bugianesi E, Dongiovanni P, Galmozzi E, Vanni E, Canavesi E, Lattuada E, Roviario G, Marchesini G, Fargion S (2010) HFE genotype, parenchymal iron accumulation, and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 138:905-912
56. Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, Haller V, Steinmann B, Lichtensteiger W (2010) *Environ Health Perspect* 109:239-244
57. Parkinson A, Olgivie B (2008) Biotransformation of xenobiotics. *Casarett and Doull's toxicology, the basic science of poisons*, 7th edn. McGraw-Hill, New York
58. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS (2004) Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 567:1-61
59. Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, Chapple S, Cohen G, Feher J, Grune T, Lengyel G, Mann GE, Pamplona R, Poli G, Portero-Otin M, Riahi Y, Salvayre R, Sasson S, Serrano J, Shamni O, Siems W, Siow RC, Wiswedel I, Zarkovic K, Zarkovic N (2010) Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free radical research* 44:1125-1171
60. Singh M, Dang TN, Arseneault M, Ramassamy C (2010) Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 21:741-756
61. Turk J (2012) Mitochondrial dysfunction and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. *Experimental diabetes research* 2012:703538
62. Pereira CV, Nadanaciva S, Oliveira PJ, Will Y (2012) The contribution of oxidative stress to drug-induced organ toxicity and its detection in vitro and in vivo. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 8:219-237
63. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R (2012) Drug-induced oxidative stress and toxicity. *Journal of toxicology* 2012:645460

Bibliografía

64. Il'yasova D, Scarbrough P, Spasojevic I (2012) Urinary biomarkers of oxidative status. *Clin Chim Acta* 413:1446-1453
65. Ogino K, Wang DH (2007) Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Med Okayama* 61:181-189
66. Singal AK, Jampana SC, Weinman SA (2011) Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 31:1432-1448
67. Mantena SK, King AL, Andringa KK, Eccleston HB, Bailey SM (2008) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. *Free Radic Biol Med* 44:1259-1272
68. McCullough AJ (2006) Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of clinical gastroenterology* 40 Suppl 1:S17-29
69. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN (2001) Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120:1183-1192
70. Serviddio G, Sastre J, Bellanti F, Vina J, Vendemiale G, Altomare E (2008) Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Molecular aspects of medicine* 29:22-35
71. Machado MV, Ravasco P, Jesus L, Marques-Vidal P, Oliveira CR, Proenca T, Baldeiras I, Camilo ME, Cortez-Pinto H (2008) Blood oxidative stress markers in non-alcoholic steatohepatitis and how it correlates with diet. *Scandinavian journal of gastroenterology* 43:95-102
72. Musso G, Gambino R, De Michieli F, Biroli G, Premoli A, Pagano G, Bo S, Durazzo M, Cassader M (2007) Nitrosative stress predicts the presence and severity of nonalcoholic fatty liver at different stages of the development of insulin resistance and metabolic syndrome: possible role of vitamin A intake. *Am J Clin Nutr* 86:661-671
73. Konishi M, Iwasa M, Araki J, Kobayashi Y, Katsuki A, Sumida Y, Nakagawa N, Kojima Y, Watanabe S, Adachi Y, Kaito M (2006) Increased lipid peroxidation in patients with non-alcoholic fatty liver disease and chronic hepatitis C as measured by the plasma level of 8-isoprostane. *Journal of gastroenterology and hepatology* 21:1821-1825
74. Cankurtaran M, Kav T, Yavuz B, Shorbagi A, Halil M, Coskun T, Arslan S (2006) Serum vitamin-E levels and its relation to clinical features in nonalcoholic fatty liver disease with elevated ALT levels. *Acta gastroenterologica Belgica* 69:5-11
75. Villaca Chaves G, Pereira SE, Saboya CJ, Ramalho A (2008) Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with the nutritional status of vitamin A in individuals with class III obesity. *Obesity surgery* 18:378-385

Bibliografía

76. Koruk M, Taysi S, Savas MC, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M (2004) Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Annals of clinical and laboratory science* 34:57-62
77. Syslova K, Kacer P, Kuzma M, Pankracova A, Fenclova Z, Vlckova S, Lebedova J, Pelclova D (2010) LC-ESI-MS/MS method for oxidative stress multimarker screening in the exhaled breath condensate of asbestosis/silicosis patients. *J Breath Res* 4:017104
78. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R (2009) Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 46:241-281
79. Rossi R, Dalle-Donne I, Milzani A, Giustarini D (2006) Oxidized forms of glutathione in peripheral blood as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chem* 52:1406-1414
80. James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, Neubrandner JA (2004) Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am J Clin Nutr* 80:1611-1617
81. Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Ishige-Wada M, Usui H, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Miida T, Fukui M, Okano Y (2011) Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Molecular genetics and metabolism* 103:220-225
82. Delatour T, Richoz J, Vouros P, Turesky RJ (2002) Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine and tyrosine in plasma proteins of rats and assessment of artifactual tyrosine nitration. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 779:189-199
83. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C (2009) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 27:120-139
84. Bastani NE, Gundersen TE, Blomhoff R (2009) Determination of 8-epi PGF(2alpha) concentrations as a biomarker of oxidative stress using triple-stage liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23:2885-2890
85. Lykkesfeldt J (2007) Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta* 380:50-58
86. Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, Kakazu Y, Ishikawa T, Robert M, Nishioka T, Tomita M (2006) Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem* 281:16768-16776

Bibliografía

87. Garcia-Canaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A (2012) Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method. *J Lipid Res* 53:2231-2241
88. Donato MT, Montero S, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Lahoz A (2010) Validated assay for studying activity profiles of human liver UGTs after drug exposure: inhibition and induction studies. *Analytical and bioanalytical chemistry* 396:2251-2263
89. Gomez-Lechon MJ, Lahoz A, Gombau L, Castell JV, Donato MT (2010) In vitro evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs. *Current pharmaceutical design* 16:1963-1977
90. Mayer J, Bates MW, Dickie MM (1951) Hereditary diabetes in genetically obese mice. *Science* 113:746-747
91. Mayer J, Dickie MM, Bates MW, Vitale JJ (1951) Free selection of nutrients by hereditarily obese mice. *Science* 113:745-746
92. Chalasani N, Crabb DW, Cummings OW, Kwo PY, Asghar A, Pandya PK, Considine RV (2003) Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis? *The American journal of gastroenterology* 98:2771-2776
93. Machado MV, Cortez-Pinto H (2012) Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of hepatology* 11:440-449
94. Zelber-Sagi S, Ratziu V, Zvibel I, Goldiner I, Blendis L, Morali G, Halpern Z, Oren R (2012) The association between adipocytokines and biomarkers for nonalcoholic fatty liver disease-induced liver injury: a study in the general population. *European journal of gastroenterology & hepatology* 24:262-269
95. Bray GA, Paeratakul S, Popkin BM (2004) Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. *Physiology & behavior* 83:549-555
96. Anstee QM, Goldin RD (2006) Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *International journal of experimental pathology* 87:1-16
97. Larter CZ, Yeh MM, Williams J, Bell-Anderson KS, Farrell GC (2008) MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. *Journal of hepatology* 49:407-416
98. Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM (2008) Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* 49:1068-1076
99. Lanthier N, Molendi-Coste O, Cani PD, van Rooijen N, Horsmans Y, Leclercq IA (2011) Kupffer cell depletion prevents but has no therapeutic effect on metabolic and inflammatory changes induced by a high-fat diet. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25:4301-4311

Bibliografía

100. Omagari K, Kato S, Tsuneyama K, Inohara C, Kuroda Y, Tsukuda H, Fukazawa E, Shiraishi K, Mune M (2008) Effects of a long-term high-fat diet and switching from a high-fat to low-fat, standard diet on hepatic fat accumulation in Sprague-Dawley rats. *Digestive diseases and sciences* 53:3206-3212
101. Hashmi S, Wang Y, Parhar RS, Collison KS, Conca W, Al-Mohanna F, Gaugler R (2013) A *C. elegans* model to study human metabolic regulation. *Nutrition & metabolism* 10:31
102. Lant B, Storey KB (2010) An overview of stress response and hypometabolic strategies in *Caenorhabditis elegans*: conserved and contrasting signals with the mammalian system. *International journal of biological sciences* 6:9-50
103. Farrell GC, van Rooyen D (2012) Liver cholesterol: is it playing possum in NASH? *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 303:G9-11
104. Chan J, Sharkey FE, Kushwaha RS, VandeBerg JF, VandeBerg JL (2012) Steatohepatitis in laboratory opossums exhibiting a high lipemic response to dietary cholesterol and fat. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 303:G12-19
105. Lee L, Alloosh M, Saxena R, Van Alstine W, Watkins BA, Klaunig JE, Sturek M, Chalasani N (2009) Nutritional model of steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine. *Hepatology* 50:56-67
106. Dyson MC, Alloosh M, Vuchetich JP, Mokolke EA, Sturek M (2006) Components of metabolic syndrome and coronary artery disease in female Ossabaw swine fed excess atherogenic diet. *Comparative medicine* 56:35-45
107. Schattenberg JM, Galle PR (2010) Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man. *Dig Dis* 28:247-254
108. Kanuri G, Bergheim I (2013) In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *International journal of molecular sciences* 14:11963-11980
109. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R (2004) Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Current drug metabolism* 5:443-462
110. Dambach DM, Andrews BA, Moulin F (2005) New technologies and screening strategies for hepatotoxicity: use of in vitro models. *Toxicologic pathology* 33:17-26
111. Chavez-Tapia NC, Rosso N, Tiribelli C (2011) In vitro models for the study of non-alcoholic fatty liver disease. *Current medicinal chemistry* 18:1079-1084
112. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R (2003) Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Current drug metabolism* 4:292-312

Bibliografía

113. Fujimura H, Murakami N, Kurabe M, Toriumi W (2009) In vitro assay for drug-induced hepatosteatosis using rat primary hepatocytes, a fluorescent lipid analog and gene expression analysis. *Journal of applied toxicology* : JAT 29:356-363
114. Amacher DE, Martin BA (1997) Tetracycline-induced steatosis in primary canine hepatocyte cultures. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 40:256-263
115. Wang XH, Tian Y, Guo ZJ, Fan ZP, Qiu de K, Zeng MD (2009) Cholesterol metabolism and expression of its relevant genes in cultured steatotic hepatocytes. *Journal of digestive diseases* 10:310-314
116. Forte TM, McCall MR, Knowles BB, Shore VG (1989) Isolation and characterization of lipoproteins produced by human hepatoma-derived cell lines other than HepG2. *Journal of lipid research* 30:817-829
117. Javitt NB (1990) Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 4:161-168
118. Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209:497-499
119. Fan H, Chen YY, Bei WJ, Wang LY, Chen BT, Guo J (2013) In Vitro Screening for Antihepatic Steatosis Active Components within *Coptidis Rhizoma* Alkaloids Extract Using Liver Cell Extraction with HPLC Analysis and a Free Fatty Acid-Induced Hepatic Steatosis HepG2 Cell Assay. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013:459390
120. Cui W, Chen SL, Hu KQ (2010) Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *American journal of translational research* 2:95-104
121. Donato MT, Martinez-Romero A, Jimenez N, Negro A, Herrera G, Castell JV, O'Connor JE, Gomez-Lechon MJ (2009) Cytometric analysis for drug-induced steatosis in HepG2 cells. *Chemico-biological interactions* 181:417-423
122. Donato MT, Tolosa L, Jimenez N, Castell JV, Gomez-Lechon MJ (2012) High-content imaging technology for the evaluation of drug-induced steatosis using a multiparametric cell-based assay. *Journal of biomolecular screening* 17:394-400
123. Benet M, Moya M, Donato MT, Lahoz A, Hervas D, Guzman C, Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Jover R (2014) A simple transcriptomic signature able to predict drug-induced hepatic steatosis. *Archives of toxicology* 88:967-982
124. Antherieu S, Chesne C, Li R, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (2012) Optimization of the HepaRG cell model for drug metabolism and toxicity studies. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 26:1278-1285

Bibliografía

125. Antherieu S, Rogue A, Fromenty B, Guillouzo A, Robin MA (2011) Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with up-regulation of lipogenic genes in HepaRG cells. *Hepatology* 53:1895-1905
126. Madec S, Cerec V, Plee-Gautier E, Antoun J, Glaise D, Salaun JP, Guguen-Guillouzo C, Corlu A (2011) CYP4F3B expression is associated with differentiation of HepaRG human hepatocytes and unaffected by fatty acid overload. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 39:1987-1996
127. Tomida T, Okamura H, Satsukawa M, Yokoi T, Konno Y (2015) Multiparametric assay using HepaRG cells for predicting drug-induced liver injury. *Toxicol Lett* 236:16-24
128. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in biotechnology* 16:373-378
129. Tweeddale H, Notley-McRobb L, Ferenci T (1998) Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis. *Journal of bacteriology* 180:5109-5116
130. Nicholson JK (2006) Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. *Molecular systems biology* 2:52
131. Fiehn O (2002) Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant molecular biology* 48:155-171
132. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E (1999) 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 29:1181-1189
133. Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, Nicholson JK (2004) Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 9:1-31
134. Nicholson JK, Lindon JC (2008) Systems biology: Metabonomics. *Nature* 455:1054-1056
135. Cortes M, Pareja E, Castell JV, Moya A, Mir J, Lahoz A (2010) Exploring mass spectrometry suitability to examine human liver graft metabonomic profiles. *Transplantation proceedings* 42:2953-2958
136. Folger O, Jerby L, Frezza C, Gottlieb E, Ruppin E, Shlomi T (2011) Predicting selective drug targets in cancer through metabolic networks. *Molecular systems biology* 7:501
137. Leon Z, Garcia-Canaveras JC, Donato MT, Lahoz A (2013) Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation. *Electrophoresis* 34:2762-2775
138. Masson P, Spagou K, Nicholson JK, Want EJ (2011) Technical and biological variation in UPLC-MS-based untargeted metabolic profiling of liver extracts:

Bibliografía

application in an experimental toxicity study on galactosamine. *Analytical chemistry* 83:1116-1123

139. Patterson AD, Maurhofer O, Beyoglu D, Lanz C, Krausz KW, Pabst T, Gonzalez FJ, Dufour JF, Idle JR (2011) Aberrant lipid metabolism in hepatocellular carcinoma revealed by plasma metabolomics and lipid profiling. *Cancer research* 71:6590-6600

140. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, Contos MJ, Sanyal AJ (2007) A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 46:1081-1090

141. Villas-Boas SG, Mas S, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J (2005) Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass spectrometry reviews* 24:613-646

142. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, Djoumbou Y, Mandal R, Aziat F, Dong E, Bouatra S, Sinelnikov I, Arndt D, Xia J, Liu P, Yallou F, Bjorn Dahl T, Perez-Pineiro R, Eisner R, Allen F, Neveu V, Greiner R, Scalbert A (2013) HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic acids research* 41:D801-807

143. Beecher CW (2003) The human metabolome. In: Garrigan GG, Goodacre R (eds) *Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis*. Springer, pp 311-319

144. Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB (2004) Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in biotechnology* 22:245-252

145. Robertson DG (2005) Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 85:809-822

146. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews* 26:51-78

147. Lenz EM, Wilson ID (2007) Analytical strategies in metabonomics. *Journal of proteome research* 6:443-458

148. Wilson ID, Plumb R, Granger J, Major H, Williams R, Lenz EM (2005) HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 817:67-76

149. Alpert AJ (1990) Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A* 499:177-196

150. Buszewski B, Noga S (2012) Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique. *Analytical and bioanalytical chemistry* 402:231-247

151. Hemström P, Irgum K (2006) Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of separation science* 29:1784-1821

Bibliografía

152. Spagou K, Tsoukali H, Raikos N, Gika H, Wilson ID, Theodoridis G (2010) Hydrophilic interaction chromatography coupled to MS for metabolomic/metabolomic studies. *Journal of separation science* 33:716-727
153. Elena E. Stashenko JRM (2010) GC y GC-MS: Configuración del equipo versus aplicaciones. *Scientia Chromatographica* 2:33-59
154. Elena E. Stashenko JRM (2010) Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica* 2:29-47
155. Lu W, Bennett BD, Rabinowitz JD (2008) Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 871:236-242
156. Saccenti E, Hoefsloot HC, Smilde AK, Westerhuis JA, Hendriks MM (2013) Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics*:1-14
157. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T (2007) Chemometrics in metabonomics. *Journal of proteome research* 6:469-479
158. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:14863-14868
159. Xia J, Wishart DS (2011) Metabolomic data processing, analysis, and interpretation using MetaboAnalyst. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D Baxevanis [et al] Chapter 14:Unit 14* 10
160. Hendriks MM, Eeuwijk FAv, Jellema RH, Westerhuis JA, Reijmers TH, Hoefsloot HC, Smilde AK (2011) Data-processing strategies for metabolomics studies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30:1685-1698
161. Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM (2008) Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology* 48:653-683
162. Wold S, Sjöström M, Eriksson L (2001) PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* 58:109-130
163. Barker M, Rayens W (2003) Partial least squares for discrimination. *Journal of chemometrics* 17:166-173
164. Trygg J, Wold S (2002) Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of chemometrics* 16:119-128
165. Xia J, Wishart DS (2011) Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature protocols* 6:743-760
166. Martens HA, Dardenne P (1998) Validation and verification of regression in small data sets. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* 44:99-121
167. Bijlsma S, Bobeldijk I, Verheij ER, Ramaker R, Kochhar S, Macdonald IA, van Ommen B, Smilde AK (2006) Large-scale human metabolomics studies: a

Bibliografía

- strategy for data (pre-) processing and validation. *Analytical chemistry* 78:567-574
168. Lindgren F, Hansen B, Karcher W, Sjöström M, Eriksson L (1996) Model validation by permutation tests: Applications to variable selection. *Journal of chemometrics* 10:521-532
169. Chen C, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ (2008) Identification of novel toxicity-associated metabolites by metabolomics and mass isotopomer analysis of acetaminophen metabolism in wild-type and Cyp2e1-null mice. *The Journal of biological chemistry* 283:4543-4559
170. Kumar BS, Chung BC, Kwon OS, Jung BH (2012) Discovery of common urinary biomarkers for hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride, acetaminophen and methotrexate by mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of applied toxicology : JAT* 32:505-520
171. Spagou K, Wilson ID, Masson P, Theodoridis G, Raikos N, Coen M, Holmes E, Lindon JC, Plumb RS, Nicholson JK, Want EJ (2011) HILIC-UPLC-MS for exploratory urinary metabolic profiling in toxicological studies. *Analytical chemistry* 83:382-390
172. Yamazaki M, Miyake M, Sato H, Masutomi N, Tsutsui N, Adam K-P, Alexander DC, Lawton KA, Milburn MV, Ryals JA (2013) Perturbation of bile acid homeostasis is an early pathogenesis event of drug induced liver injury in rats. *Toxicology and applied pharmacology* 268:79-89
173. Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G, Provost JP, Le Net JL, Baker D, Walley RJ, Everett JR, Nicholson JK (2006) Pharmacometabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature* 440:1073-1077
174. Fannin RD, Russo M, O'Connell TM, Gerrish K, Winnike JH, Macdonald J, Newton J, Malik S, Sieber SO, Parker J, Shah R, Zhou T, Watkins PB, Paules RS (2010) Acetaminophen dosing of humans results in blood transcriptome and metabolome changes consistent with impaired oxidative phosphorylation. *Hepatology* 51:227-236
175. Jetten MJ, Gaj S, Ruiz-Aracama A, de Kok TM, van Delft JH, Lommen A, van Someren EP, Jennen DG, Claessen SM, Peijnenburg AA, Stierum RH, Kleinjans JC (2012) 'Omics analysis of low dose acetaminophen intake demonstrates novel response pathways in humans. *Toxicology and applied pharmacology* 259:320-328
176. Willebrords J, Pereira IV, Maes M, Crespo Yanguas S, Colle I, Van Den Bossche B, Da Silva TC, de Oliveira CP, Andraus W, Alves VA, Cogliati B, Vinken M (2015) Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. *Progress in lipid research* 59:106-125
177. Vinaixa M, Rodriguez MA, Rull A, Beltran R, Blade C, Brezmes J, Canellas N, Joven J, Correig X (2010) Metabolomic assessment of the effect of dietary

Bibliografía

cholesterol in the progressive development of fatty liver disease. *Journal of proteome research* 9:2527-2538

178. Kalhan SC, Guo L, Edmison J, Dasarathy S, McCullough AJ, Hanson RW, Milburn M (2011) Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism: clinical and experimental* 60:404-413

179. Barr J, Vazquez-Chantada M, Alonso C, Perez-Cormenzana M, Mayo R, Galan A, Caballeria J, Martin-Duce A, Tran A, Wagner C, Luka Z, Lu SC, Castro A, Le Marchand-Brustel Y, Martinez-Chantar ML, Veyrie N, Clement K, Tordjman J, Gual P, Mato JM (2010) Liquid chromatography-mass spectrometry-based parallel metabolic profiling of human and mouse model serum reveals putative biomarkers associated with the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of proteome research* 9:4501-4512

180. Kim HJ, Kim JH, Noh S, Hur HJ, Sung MJ, Hwang JT, Park JH, Yang HJ, Kim MS, Kwon DY, Yoon SH (2011) Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *Journal of proteome research* 10:722-731

181. (!!! INVALID CITATION !!!)

182. Li H, Wang L, Yan X, Liu Q, Yu C, Wei H, Li Y, Zhang X, He F, Jiang Y (2011) A proton nuclear magnetic resonance metabonomics approach for biomarker discovery in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of proteome research* 10:2797-2806

183. Tanaka N, Matsubara T, Krausz KW, Patterson AD, Gonzalez FJ (2012) Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 56:118-129

184. Yamazaki M, Miyake M, Sato H, Masutomi N, Tsutsui N, Adam KP, Alexander DC, Lawton KA, Milburn MV, Ryals JA, Wulff JE, Guo L (2013) Perturbation of bile acid homeostasis is an early pathogenesis event of drug induced liver injury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 268:79-89

185. Tanaka N, Takahashi S, Fang ZZ, Matsubara T, Krausz KW, Qu A, Gonzalez FJ (2014) Role of white adipose lipolysis in the development of NASH induced by methionine- and choline-deficient diet. *Biochimica et biophysica acta* 1841:1596-1607

186. Atherton HJ, Gulston MK, Bailey NJ, Cheng KK, Zhang W, Clarke K, Griffin JL (2009) Metabolomics of the interaction between PPAR-alpha and age in the PPAR-alpha-null mouse. *Molecular systems biology* 5:259

187. Zhang L, Ye Y, An Y, Tian Y, Wang Y, Tang H (2011) Systems responses of rats to aflatoxin B1 exposure revealed with metabonomic changes in multiple biological matrices. *Journal of proteome research* 10:614-623

188. Lake AD, Novak P, Shipkova P, Aranibar N, Robertson D, Reily MD, Lu Z, Lehman-McKeeman LD, Cherrington NJ (2013) Decreased hepatotoxic bile acid composition and altered synthesis in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 268:132-140

Bibliografía

189. Garcia-Canaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A (2011) A comprehensive untargeted metabolomic analysis of human steatotic liver tissue by RP and HILIC chromatography coupled to mass spectrometry reveals important metabolic alterations. *Journal of proteome research* 10:4825-4834
190. von Schonfels W, Patsenker E, Fahrner R, Itzel T, Hinrichsen H, Brosch M, Erhart W, Gruodyte A, Vollnberg B, Richter K, Landrock A, Schreiber S, Bruckner S, Beldi G, Sipos B, Becker T, Rocken C, Teufel A, Stickel F, Schafmayer C, Hampe J (2015) Metabolomic tissue signature in human non-alcoholic fatty liver disease identifies protective candidate metabolites. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 35:207-214
191. Gordon DL, Myers DS, Ivanova PT, Fahy E, Maurya MR, Gupta S, Min J, Spann NJ, McDonald JG, Kelly SL, Duan J, Sullards MC, Leiker TJ, Barkley RM, Quehenberger O, Armando AM, Milne SB, Mathews TP, Armstrong MD, Li C, Melvin WV, Clements RH, Washington MK, Mendonsa AM, Witztum JL, Guan Z, Glass CK, Murphy RC, Dennis EA, Merrill AH, Jr., Russell DW, Subramaniam S, Brown HA (2015) Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. *J Lipid Res* 56:722-736
192. Bennett BD, Yuan J, Kimball EH, Rabinowitz JD (2008) Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach. *Nature protocols* 3:1299-1311
193. Yuan J, Bennett BD, Rabinowitz JD (2008) Kinetic flux profiling for quantitation of cellular metabolic fluxes. *Nature protocols* 3:1328-1340
194. Panopoulos AD, Yanes O, Ruiz S, Kida YS, Diep D, Tautenhahn R, Herrerias A, Batchelder EM, Plongthongkum N, Lutz M, Berggren WT, Zhang K, Evans RM, Siuzdak G, Izpisua Belmonte JC (2012) The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell research* 22:168-177
195. Chong WP, Thng SH, Hiu AP, Lee DY, Chan EC, Ho YS (2012) LC-MS-based metabolic characterization of high monoclonal antibody-producing Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering* 109:3103-3111
196. Sellick CA, Hansen R, Maqsood AR, Dunn WB, Stephens GM, Goodacre R, Dickson AJ (2008) Effective quenching processes for physiologically valid metabolite profiling of suspension cultured mammalian cells. *Analytical chemistry* 81:174-183
197. Croixmarie V, Umbdenstock T, Cloarec O, Moreau A, Pascussi JM, Parmentier Y, Boursier-Neyret C, Walther B (2010) Metabolomic studies on human hepatocyte in primary culture. *Methods Mol Biol* 640:355-374
198. Dettmer K, Nurnberger N, Kaspar H, Gruber MA, Almstetter MF, Oefner PJ (2011) Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: optimization of harvesting and extraction protocols. *Analytical and bioanalytical chemistry* 399:1127-1139

Bibliografía

199. Sheikh KD, Khanna S, Byers SW, Fornace A, Jr., Cheema AK (2011) Small molecule metabolite extraction strategy for improving LC/MS detection of cancer cell metabolome. *Journal of biomolecular techniques : JBT* 22:1-4
200. Lorenz MA, Burant CF, Kennedy RT (2011) Reducing time and increasing sensitivity in sample preparation for adherent mammalian cell metabolomics. *Analytical chemistry* 83:3406-3414
201. Fernandez C, Fransson U, Hallgard E, Spegel P, Holm C, Krogh M, Warell K, James P, Mulder H (2008) Metabolomic and proteomic analysis of a clonal insulin-producing beta-cell line (INS-1 832/13). *Journal of proteome research* 7:400-411
202. Brown MV, Compton SA, Milburn MV, Lawton KA, Cheatham B (2013) Metabolomic signatures in lipid-loaded HepaRGs reveal pathways involved in steatotic progression. *Obesity (Silver Spring)* 21:E561-570
203. Garcia-Canaveras JC, Lopez S, Castell JV, Donato MT, Lahoz A (2016) Extending metabolome coverage for untargeted metabolite profiling of adherent cultured hepatic cells. *Analytical and bioanalytical chemistry* 408:1217-1230
204. Garcia-Canaveras JC, Castell JV, Donato MT, Lahoz A (2016) A metabolomics cell-based approach for anticipating and investigating drug-induced liver injury. *Scientific reports* 6:27239
205. Gomez-Lechon MJ, Ponsoda X, O'Connor E, Donato T, Jover R, Castell JV (2003) Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 17:675-680
206. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
207. Swartz ME (2005) UPLC™: an introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 28:1253-1263
208. Want EJ, Masson P, Michopoulos F, Wilson ID, Theodoridis G, Plumb RS, Shockcor J, Loftus N, Holmes E, Nicholson JK (2013) Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nature protocols* 8:17-32
209. Nygren H, Seppanen-Laakso T, Castillo S, Hyotylainen T, Oresic M (2011) Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)-based lipidomics for studies of body fluids and tissues. *Methods Mol Biol* 708:247-257
210. Agilent (2012) Procesamiento y análisis de muestras por el método Fiehn de Agilent.
211. Katajamaa M, Oresic M (2007) Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of chromatography A* 1158:318-328
212. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Oresic M (2010) MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC bioinformatics* 11:395

Bibliografía

213. Quintás G, Portillo N, García-Cañaveras JC, Castell JV, Ferrer A, Lahoz A (2012) Chemometric approaches to improve PLS-DA model outcome for predicting human non-alcoholic fatty liver disease using UPLC-MS as a metabolic profiling tool. *Metabolomics* 8:86-98
214. Want E, Masson P (2011) Processing and analysis of GC/LC-MS-based metabolomics data. *Methods Mol Biol* 708:277-298
215. Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR, Custodio DE, Abagyan R, Siuzdak G (2005) METLIN: a metabolite mass spectral database. *Therapeutic drug monitoring* 27:747-751
216. Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, Ojima Y, Tanaka K, Tanaka S, Aoshima K, Oda Y, Kakazu Y, Kusano M, Tohge T, Matsuda F, Sawada Y, Hirai MY, Nakanishi H, Ikeda K, Akimoto N, Maoka T, Takahashi H, Ara T, Sakurai N, Suzuki H, Shibata D, Neumann S, Iida T, Funatsu K, Matsuura F, Soga T, Taguchi R, Saito K, Nishioka T (2010) MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of mass spectrometry : JMS* 45:703-714
217. Cañaveras JCG (2015) *Metabolomics as a tool for the study of drug-induced hepatotoxicity* (Tesis Doctoral). Universitat de València.
218. Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS (2015) MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. *Nucleic acids research* 43:W251-257
219. Clark RD, Wolohan PR, Hodgkin EE, Kelly JH, Sussman NL (2004) Modelling in vitro hepatotoxicity using molecular interaction fields and SIMCA. *Journal of molecular graphics & modelling* 22:487-497
220. Cortes M, Pareja E, García-Cañaveras JC, Donato MT, Montero S, Mir J, Castell JV, Lahoz A (2014) Metabolomics discloses donor liver biomarkers associated with early allograft dysfunction. *Journal of hepatology* 61:564-574
221. Hotelling H (1931) The generalization of Student's ratio. *Ann Math Stat* 2:360-378
222. Xia J, Mandal R, Sinelnikov IV, Broadhurst D, Wishart DS (2012) MetaboAnalyst 2.0--a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic acids research* 40:W127-133
223. Hand DJ, Till RJ (2001) A simple generalisation of the area under the ROC curve for multiple class classification problems. *Machine learning* 45:171-186
224. Chong I-G, Jun C-H (2005) Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* 78:103-112
225. Efron B (1979) Bootstrap methods: another look at the jackknife. *The annals of statistics*:1-26
226. Efron B, Tibshirani RJ (1994) *An introduction to the bootstrap*, vol 57. CRC press,

Bibliografía

227. Carretero A, León Z, García-Cañaveras JC, Zaragoza Á, Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Lahoz A (2014) In vitro/in vivo screening of oxidative homeostasis and damage to DNA, protein, and lipids using UPLC/MS-MS. *Analytical and bioanalytical chemistry* 406:5465-5476
228. FDA C (2001) Guidance for industry: bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CV)
229. Korchazhkina O, Exley C, Andrew Spencer S (2003) Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 794:353-362
230. Mateos R, Goya L, Bravo L (2004) Determination of malondialdehyde by liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative: a marker for oxidative stress in cell cultures of human hepatoma HepG2. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 805:33-39
231. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L (2005) Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 827:76-82
232. Camera E, Rinaldi M, Briganti S, Picardo M, Fanali S (2001) Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 757:69-78
233. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Martinez-Romero A, Jimenez N, Castell JV, O'Connor JE (2007) A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chemico-biological interactions* 165:106-116
234. Tolosa L, Gomez-Lechon MJ, Perez-Cataldo G, Castell JV, Donato MT (2013) HepG2 cells simultaneously expressing five P450 enzymes for the screening of hepatotoxicity: identification of bioactivable drugs and the potential mechanism of toxicity involved. *Archives of toxicology* 87:1115-1127
235. Tolosa L, Pinto S, Donato MT, Lahoz A, Castell JV, O'Connor JE, Gomez-Lechon MJ (2012) Development of a multiparametric cell-based protocol to screen and classify the hepatotoxicity potential of drugs. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 127:187-198
236. Gomez-Lechon MJ, Tolosa L, Castell JV, Donato MT (2010) Mechanism-based selection of compounds for the development of innovative in vitro

Bibliografía

- approaches to hepatotoxicity studies in the LIINTOP project. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 24:1879-1889
237. Sharanek A, Burban A, Humbert L, Bachour-El Azzi P, Felix-Gomes N, Rainteau D, Guillouzo A (2015) Cellular accumulation and toxic effects of bile acids in cyclosporine A-treated HepaRG hepatocytes. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*
238. Rubin K, Janefeldt A, Andersson L, Berke Z, Grime K, Andersson TB (2015) HepaRG cells as human-relevant in vitro model to study the effects of inflammatory stimuli on cytochrome P450 isoenzymes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 43:119-125
239. Ferreira A, Rodrigues M, Silvestre S, Falcao A, Alves G (2014) HepaRG cell line as an in vitro model for screening drug-drug interactions mediated by metabolic induction: amiodarone used as a model substance. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 28:1531-1535
240. Mueller SO, Guillouzo A, Hewitt PG, Richert L (2015) Drug biokinetic and toxicity assessments in rat and human primary hepatocytes and HepaRG cells within the EU-funded Predict-IV project. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*
241. Szabo M, Veres Z, Baranyai Z, Jakab F, Jemnitz K (2013) Comparison of human hepatoma HepaRG cells with human and rat hepatocytes in uptake transport assays in order to predict a risk of drug induced hepatotoxicity. *PLoS one* 8:e59432
242. Gomez-Lechon MJ, Lopez P, Donato T, Montoya A, Larrauri A, Gimenez P, Trullenque R, Fabra R, Castell JV (1990) Culture of human hepatocytes from small surgical liver biopsies. Biochemical characterization and comparison with in vivo. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* 26:67-74
243. Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Donato MT (2008) An update on metabolism studies using human hepatocytes in primary culture. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 4:837-854
244. Mennecozzi M, Landesmann B, Palosaari T, Harris G, Whelan M (2015) Sex differences in liver toxicity-do female and male human primary hepatocytes react differently to toxicants in vitro? *PLoS one* 10:e0122786
245. Vacek J, Papouskova B, Vrba J, Zatloukalova M, Kren V, Ulrichova J (2013) LC-MS metabolic study on quercetin and taxifolin galloyl esters using human hepatocytes as toxicity and biotransformation in vitro cell model. *J Pharm Biomed Anal* 86:135-142
246. Donato MT, Castell JV, Gomez-Lechon MJ (1995) Effect of model inducers on cytochrome P450 activities of human hepatocytes in primary culture. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 23:553-558

Bibliografía

247. Donato MT, Gomez-Lechon MJ, Castell JV (1990) Effect of xenobiotics on monooxygenase activities in cultured human hepatocytes. *Biochemical pharmacology* 39:1321-1326
248. Donato MT, Gomez-Lechon MJ, Jover R, Nakamura T, Castell JV (1998) Human hepatocyte growth factor down-regulates the expression of cytochrome P450 isozymes in human hepatocytes in primary culture. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 284:760-767
249. Donato MT, Jimenez N, Serralta A, Mir J, Castell JV, Gomez-Lechon MJ (2007) Effects of steatosis on drug-metabolizing capability of primary human hepatocytes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 21:271-276
250. Gómez-Lechón MJ, Castell JV (1998) Primary culture of human hepatocytes. In: Griffiths JB, Doyle A, Newell DN (eds) *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*. pp 151–157
251. Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Donato MT (2007) Hepatocytes--the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. *Chemico-biological interactions* 168:30-50
252. Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Donato MT (2010) The use of hepatocytes to investigate drug toxicity. *Methods Mol Biol* 640:389-415
253. Gomez-Lechon MJ, Lahoz A, Castell JV, Donato MT (2012) Evaluation of cytochrome P450 activities in human hepatocytes in vitro. *Methods Mol Biol* 806:87-97
254. Lahoz A, Donato MT, Picazo L, Castell JV, Gomez-Lechon MJ (2008) Assessment of cytochrome P450 induction in human hepatocytes using the cocktail strategy plus liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug metabolism letters* 2:205-209
255. Tolosa L, Pareja-Ibars E, Donato MT, Cortes M, Lopez S, Jimenez N, Mir J, Castell JV, Gomez-Lechon MJ (2013) Neonatal livers: a source for the isolation of good-performing hepatocytes for cell transplantation. *Cell transplantation* 256. Bonora-Centelles A, Donato MT, Lahoz A, Pareja E, Mir J, Castell JV, Gomez-Lechon MJ (2010) Functional characterization of hepatocytes for cell transplantation: customized cell preparation for each receptor. *Cell transplantation* 19:21-28
257. Gomez-Lechon MJ, Lahoz A, Jimenez N, Vicente Castell J, Donato MT (2006) Cryopreservation of rat, dog and human hepatocytes: influence of preculture and cryoprotectants on recovery, cytochrome P450 activities and induction upon thawing. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 36:457-472
258. Persoon-Rothert M, Egas-Kenniphaas JM, van der Valk-Kokshoorn EJ, Mauve I, van der Laarse A (1990) Prevention of cumene hydroperoxide induced

Bibliografía

- oxidative stress in cultured neonatal rat myocytes by scavengers and enzyme inhibitors. *Journal of molecular and cellular cardiology* 22:1147-1155
259. Pardillo-Diaz R, Carrascal L, Ayala A, Nunez-Abades P (2015) Oxidative stress induced by cumene hydroperoxide evokes changes in neuronal excitability of rat motor cortex neurons. *Neuroscience* 289:85-98
260. Kucera O, Endlicher R, Rousar T, Lotkova H, Garnol T, Drahota Z, Cervinkova Z (2014) The effect of tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes in vitro. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014:752506
261. Oh JM, Jung YS, Jeon BS, Yoon BI, Lee KS, Kim BH, Oh SJ, Kim SK (2012) Evaluation of hepatotoxicity and oxidative stress in rats treated with tert-butyl hydroperoxide. *Food Chem Toxicol* 50:1215-1221
262. Pan L, Qiu Y, Chen T, Lin J, Chi Y, Su M, Zhao A, Jia W (2010) An optimized procedure for metabonomic analysis of rat liver tissue using gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 52:589-596
263. Zelena E, Dunn WB, Broadhurst D, Francis-McIntyre S, Carroll KM, Begley P, O'Hagan S, Knowles JD, Halsall A, Wilson ID, Kell DB (2009) Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum. *Analytical chemistry* 81:1357-1364
264. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, Brown M, Knowles JD, Halsall A, Haselden JN, Nicholls AW, Wilson ID, Kell DB, Goodacre R (2011) Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols* 6:1060-1083
265. Want EJ, Wilson ID, Gika H, Theodoridis G, Plumb RS, Shockcor J, Holmes E, Nicholson JK (2010) Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. *Nature protocols* 5:1005-1018
266. Naz S, Vallejo M, García A, Barbas C (2014) Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *Journal of Chromatography A*
267. Xu JJ, Diaz D, O'Brien PJ (2004) Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chemico-biological interactions* 150:115-128
268. Leamy AK, Egnatchik RA, Young JD (2013) Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Progress in lipid research* 52:165-174
269. Lopez-Riera M, Conde I, Tolosa L, Zaragoza A, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Jover R (2017) New microRNA Biomarkers for Drug-Induced Steatosis and Their Potential to Predict the Contribution of Drugs to Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in pharmacology* 8:3

Bibliografía

270. Carretero A, Leon Z, Garcia-Canaveras JC, Zaragoza A, Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Lahoz A (2014) In vitro/in vivo screening of oxidative homeostasis and damage to DNA, protein, and lipids using UPLC/MS-MS. *Analytical and bioanalytical chemistry* 406:5465-5476
271. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 75:3019-3030
272. FDA (2001) Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Bethesda MD.
273. Takaki A, Kawai D, Yamamoto K (2013) Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *International journal of molecular sciences* 14:20704-20728
274. Amacher DE (2011) Strategies for the early detection of drug-induced hepatic steatosis in preclinical drug safety evaluation studies. *Toxicology* 279:10-18
275. Amacher DE, Chalasani N (2014) Drug-induced hepatic steatosis. *Seminars in liver disease* 34:205-214
276. Levine J, Barak Y, Kofman O, Belmaker RH (1995) Follow-up and relapse analysis of an inositol study of depression. *The Israel journal of psychiatry and related sciences* 32:14-21
277. M. Hernández AS (1999) *Tratado de Nutrición*.
278. Malnick SD, Beergabel M, Knobler H (2003) Non-alcoholic fatty liver: a common manifestation of a metabolic disorder. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 96:699-709
279. i-base (2012) HIV and your quality of life: a guide to side effects and other complications.
280. Tolosa L, Gomez-Lechon MJ, Jimenez N, Hervas D, Jover R, Donato MT (2016) Advantageous use of HepaRG cells for the screening and mechanistic study of drug-induced steatosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 302:1-9
281. Klein S, Mueller D, Schevchenko V, Noor F (2014) Long-term maintenance of HepaRG cells in serum-free conditions and application in a repeated dose study. *Journal of applied toxicology : JAT* 34:1078-1086
282. Kotronen A, Seppanen-Laakso T, Westerbacka J, Kiviluoto T, Arola J, Ruskeepaa AL, Oresic M, Yki-Jarvinen H (2009) Hepatic stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes* 58:203-208
283. Caballero F, Fernandez A, Matias N, Martinez L, Fucho R, Elena M, Caballeria J, Morales A, Fernandez-Checa JC, Garcia-Ruiz C (2010) Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic

Bibliografía

- steatohepatitis: impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione. *The Journal of biological chemistry* 285:18528-18536
284. Gorden DL, Ivanova PT, Myers DS, McIntyre JO, VanSaun MN, Wright JK, Matrisian LM, Brown HA (2011) Increased diacylglycerols characterize hepatic lipid changes in progression of human nonalcoholic fatty liver disease; comparison to a murine model. *PLoS one* 6:e22775
285. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Diehl AM (2007) Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 45:1366-1374
286. Cole LK, Jacobs RL, Vance DE (2010) Tamoxifen induces triacylglycerol accumulation in the mouse liver by activation of fatty acid synthesis. *Hepatology* 52:1258-1265
287. Letteron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D (1996) Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *Journal of hepatology* 24:200-208
288. Vitins AP, Kienhuis AS, Speksnijder EN, Roodbergen M, Luijten M, van der Ven LT (2014) Mechanisms of amiodarone and valproic acid induced liver steatosis in mouse in vivo act as a template for other hepatotoxicity models. *Archives of toxicology* 88:1573-1588
289. Donato MT, Gomez-Lechon MJ (2012) Drug-induced liver steatosis and phospholipidosis: cell-based assays for early screening of drug candidates. *Current drug metabolism* 13:1160-1173
290. Pessayre D, Mansouri A, Berson A, Fromenty B (2010) Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. *Handbook of experimental pharmacology*:311-365
291. Begriche K, Massart J, Robin MA, Borgne-Sanchez A, Fromenty B (2011) Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *Journal of hepatology* 54:773-794
292. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ (2004) Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 40:185-194
293. Neuschwander-Tetri BA (2010) Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 52:774-788
294. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, Schaffer JE (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:3077-3082

Bibliografía

295. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachik J (2004) Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* 106:635-643
296. Barr J, Caballeria J, Martinez-Arranz I, Dominguez-Diez A, Alonso C, Muntane J, Perez-Cormenzana M, Garcia-Monzon C, Mayo R, Martin-Duce A, Romero-Gomez M, Lo lacono O, Tordjman J, Andrade RJ, Perez-Carreras M, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Fernandez-Escalante C, Arevalo E, Garcia-Unzueta M, Clement K, Crespo J, Gual P, Gomez-Fleitas M, Martinez-Chantar ML, Castro A, Lu SC, Vazquez-Chantada M, Mato JM (2012) Obesity-dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression. *Journal of proteome research* 11:2521-2532
297. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, Contos MJ, Sterling RK, Fuchs M, Zhou H, Watkins SM, Sanyal AJ (2009) The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 50:1827-1838
298. Villanueva CJ, Monetti M, Shih M, Zhou P, Watkins SM, Bhanot S, Farese RV, Jr. (2009) Specific role for acyl CoA:Diacylglycerol acyltransferase 1 (Dgat1) in hepatic steatosis due to exogenous fatty acids. *Hepatology* 50:434-442
299. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Diehl AM (2008) Diacylglycerol acyltransferase 1 anti-sense oligonucleotides reduce hepatic fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 47:625-635
300. Han MS, Park SY, Shinzawa K, Kim S, Chung KW, Lee JH, Kwon CH, Lee KW, Park CK, Chung WJ, Hwang JS, Yan JJ, Song DK, Tsujimoto Y, Lee MS (2008) Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. *J Lipid Res* 49:84-97
301. Tilmant K, Gerets HH, Dhalluin S, Hanon E, Depelchin O, Cossu-Leguille C, Vasseur P, Atienzar FA (2011) Comparison of a genomic and a multiplex cell imaging approach for the detection of phospholipidosis. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 25:1414-1424
302. Aggarwal D, West KL, Zern TL, Shrestha S, Vergara-Jimenez M, Fernandez ML (2005) JTT-130, a microsomal triglyceride transfer protein (MTP) inhibitor lowers plasma triglycerides and LDL cholesterol concentrations without increasing hepatic triglycerides in guinea pigs. *BMC cardiovascular disorders* 5:30
303. Bunes A, Roth A, Herrmann A, Schmitz O, Kamp H, Busch K, Suter L (2014) Identification of metabolites, clinical chemistry markers and transcripts associated with hepatotoxicity. *PloS one* 9:e97249
304. Oneta CM, Dufour JF (2002) Non-alcoholic fatty liver disease: treatment options based on pathogenic considerations. *Swiss medical weekly* 132:493-505

Bibliografía

305. Rasineni K, Casey CA (2012) Molecular mechanism of alcoholic fatty liver. *Indian journal of pharmacology* 44:299-303
306. McCullough AJ, Czaja AJ, Jones JD, Go VL (1981) The nature and prognostic significance of serial amino acid determinations in severe chronic active liver disease. *Gastroenterology* 81:645-652
307. Morgan MY, Marshall AW, Milsom JP, Sherlock S (1982) Plasma amino-acid patterns in liver disease. *Gut* 23:362-370
308. Zieve L (1979) Amino acids in liver failure. *Gastroenterology* 76:219-221
309. Cali AM, De Oliveira AM, Kim H, Chen S, Reyes-Mugica M, Escalera S, Dziura J, Taksali SE, Kursawe R, Shaw M, Savoye M, Pierpont B, Constable RT, Caprio S (2009) Glucose dysregulation and hepatic steatosis in obese adolescents: is there a link? *Hepatology* 49:1896-1903
310. Blomme B, Van Steenkiste C, Callewaert N, Van Vlierberghe H (2009) Alteration of protein glycosylation in liver diseases. *Journal of hepatology* 50:592-603
311. Sun TH, Heimark DB, Nguygen T, Nadler JL, Larner J (2002) Both myo-inositol to chiro-inositol epimerase activities and chiro-inositol to myo-inositol ratios are decreased in tissues of GK type 2 diabetic rats compared to Wistar controls. *Biochem Biophys Res Commun* 293:1092-1098
312. Asplin I, Galasko G, Larner J (1993) chiro-inositol deficiency and insulin resistance: a comparison of the chiro-inositol- and the myo-inositol-containing insulin mediators isolated from urine, hemodialysate, and muscle of control and type II diabetic subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:5924-5928
313. Soffientini U, Caridis AM, Dolan S, Graham A (2014) Intracellular cholesterol transporters and modulation of hepatic lipid metabolism: Implications for diabetic dyslipidaemia and steatosis. *Biochimica et biophysica acta* 1842:1372-1382
314. Lu SC, Mato JM (2012) S-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer. *Physiological reviews* 92:1515-1542
315. Panayiotidis MI, Stabler SP, Allen RH, Pappa A, White CW (2009) Oxidative stress-induced regulation of the methionine metabolic pathway in human lung epithelial-like (A549) cells. *Mutat Res* 674:23-30
316. Pourahmad J, Eskandari MR, Shakibaei R, Kamalinejad M (2010) A search for hepatoprotective activity of fruit extract of *Mangifera indica* L. against oxidative stress cytotoxicity. *Plant Foods Hum Nutr* 65:83-89
317. Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology* 142:231-255

Bibliografía

318. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition* 134:489-492
319. Liao YJ, Chen TL, Lee TS, Wang HA, Wang CK, Liao LY, Liu RS, Huang SF, Chen YM (2012) Glycine N-methyltransferase deficiency affects Niemann-Pick type C2 protein stability and regulates hepatic cholesterol homeostasis. *Mol Med* 18:412-422
320. Schwedhelm E, Boger RH (2003) Application of gas chromatography-mass spectrometry for analysis of isoprostanes: their role in cardiovascular disease. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 41:1552-1561
321. Yao QH, Mei SR, Weng QF, Zhang PD, Yang Q, Wu CY, Xu GW (2003) Determination of urinary oxidative DNA damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and the association with cigarette smoking. *Talanta* 63:617-623
322. Zhang F, Stott WT, Clark AJ, Schisler MR, Grundy JJ, Gollapudi BB, Bartels MJ (2007) Quantitation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by liquid chromatography/positive atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21:3949-3955
323. Mesaros C, Arora JS, Wholer A, Vachani A, Blair IA (2012) 8-Oxo-2'-deoxyguanosine as a biomarker of tobacco-smoking-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 53:610-617
324. Soga T, Sugimoto M, Honma M, Mori M, Igarashi K, Kashikura K, Ikeda S, Hirayama A, Yamamoto T, Yoshida H, Otsuka M, Tsuji S, Yatomi Y, Sakuragawa T, Watanabe H, Nihei K, Saito T, Kawata S, Suzuki H, Tomita M, Suematsu M (2011) Serum metabolomics reveals gamma-glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *Journal of hepatology* 55:896-905

