

XXXVII CONGRESO ANUAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO

Principios de la metabolómica

María Luz Martínez Chantar

Unidad de Metabolómica, CIC-BioGUNE, Bilbao, España

Introducción

La metabolómica se define como la medida cuantitativa de la respuesta dinámica multiparamétrica de un sistema vivo a un estímulo patofisiológico o modificación genética¹. La cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) es una técnica de alta sensibilidad que permite el análisis simultáneo de una gran cantidad de metabolitos en poco tiempo. Esta tecnología es la seleccionada para la obtención de los perfiles metabolómicos de muestras de suero procedentes de pacientes, en este caso diagnosticados con hígado graso no alcohólico (HGNA). El objetivo final es la identificación de marcadores de diagnóstico de esta enfermedad.

El flujo de trabajo que se sigue en metabolómica se puede esquematizar como se refleja en la figura 1: a) a partir de las muestras de suero se procede a la extracción de metabolitos previa a un proceso de proteinización de la muestra; b) posteriormente se obtienen los cromatogramas y espectros, y finalmente c) se procesan las muestras estadísticamente, para la búsqueda de marcadores. El análisis estadístico de los datos se llevará a cabo mediante el programa Markerlynx (Waters Mass Lynx versión 4.1) para procesar los datos adquiridos, obteniéndose un listado de la relación masa/carga (m/z), tiempos de retención (R_t) e intensidades para todos los picos cromatográficos importantes encontrados. Los métodos estadísticos multidimensionales son necesarios para la interpretación de los extensos y complejos datos generados en este tipo de estudios. Estos tratamientos facilitan enormemente el descubrimiento de compuestos marcadores escondidos en la complejidad de datos, al posibilitar la identificación de picos que pueden discriminar entre los diferentes grupos analizados. Para hacer el tratamiento multidimensional de este estudio se utiliza un pa-

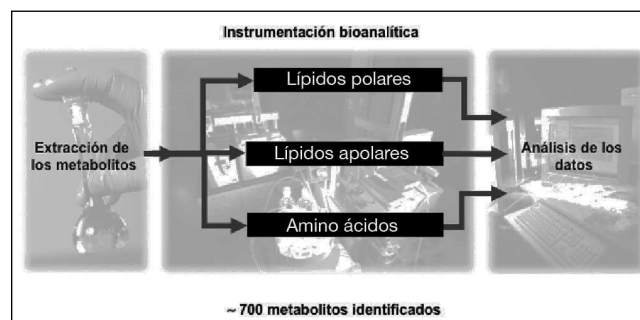


Figura 1 La metabolómica. El flujo de trabajo.

quete de programas que incluye Markerlynx (Waters Mass Lynx versión 4.1) y SIMCA (Umetrics, Umea, Suecia versión 11.5). Como primer paso para buscar estructura en los datos se utilizará el PCA (análisis de los componentes principales, *principal components analysis*) y posteriormente un análisis discriminante de la regresión en mínimos cuadrados parciales (PLS-DA², *partial least squares discriminant analysis*), que apunta direcciones en el espacio multidimensional en las que la separación de las muestras es máxima, en función del grupo al que pertenecen.

El resultado esperado del procesamiento estadístico de los datos es la selección de un conjunto de marcadores que permitan diferenciar las clases de muestras analizadas. Estos marcadores se someten a experimentos de MS/MS (Waters Q-TOF Premier) de manera que se pueda utilizar el patrón de fragmentación para poder realizar su identificación. Este proceso no es tan trivial como puede parecer a priori, ya que requiere la optimización de los parámetros de fragmentación como la energía de colisión, la presión del gas en la celda, etc.; estos parámetros se ven influidos, además, por las características intrínsecas de la molécula, tales como las diferentes funcionalidades presentes en ella, su estructura y su tamaño.

Correo electrónico: mlmartinez@cicbiogune.es

Teniendo el espectro de fragmentación óptimo y la fórmula molecular del metabolito, la cual proviene de la masa exacta medida, se procede a comparar estos valores con las bases de datos existentes. El resultado de esta búsqueda dará lugar, dentro de un margen de error, a un conjunto de estructuras que pueden corresponderse con la del metabolito objetivo. La confirmación de la identificación se llevará a cabo mediante la comparación con un estándar comercial, en el caso de que sea conocido, que al poseer las mismas características analíticas que el metabolito en estudio permita la caracterización inequívoca. En los casos más complicados puede necesitarse el uso de datos complementarios provenientes de otras técnicas de distinta naturaleza, como por ejemplo espectroscópicas, como resonancia magnética nuclear y espectroscopia de infrarrojo. En este caso, al no ser comerciales estos productos es posible que se requiera la síntesis química por encargo.

Enfermedad de hígado graso

La enfermedad del HGA es, actualmente, la dolencia crónica de hígado más frecuente en el mundo occidental y afecta a alrededor del 20-30% de los adultos mayores de 20 años. El HGA se caracteriza por la acumulación de grasa en el hígado (esteatosis). Aunque por lo general asintomáticos, entre un 10 y un 40% de los pacientes con HGA, en función de la población seleccionada, desarrollan esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), que se caracteriza por la presencia de esteatosis con inflamación, necrosis y fibrosis³⁻⁶. HGA es una enfermedad progresiva del hígado que puede avanzar a cirrosis y carcinoma hepatocelular (fig. 2). La obesidad es un importante factor de riesgo de desarrollo de HGA⁷⁻⁹. Aunque no hay ningún tratamiento médico actualmente aceptado, la pérdida de peso inducida por dietas de restricción calórica y la cirugía bariátrica mejora el HGA en algunos casos, lo que indica que incluso en esta etapa más avanzada el HGA es una condición reversible.

El HGA se puede encontrar asociado en pacientes con uno o más componentes del síndrome metabólico, especialmente la obesidad, la diabetes tipo 2 y los valores elevados de transaminasas en suero (alanina aminotransferasa [ALT] y aspartato aminotransferasa [AST]), en ausencia de abuso de alcohol u otras causas comunes de enfermedad hepática. La prueba diagnóstica para el HGA es el examen histológico de una muestra de biopsia hepática¹⁰. Sin embargo, la biopsia hepática es un procedimiento costoso e invasivo asociado a potenciales complicaciones y propenso a errores de muestreo. Recientemente, un número de métodos no invasivos ha sido descrito para el diagnóstico de HGA como alternativas a la biopsia hepática, incluyendo distintos criterios radiológicos y los resultados sobre la base de la combinación de parámetros, tanto clínicos como bioquímicos.

En cuanto a los medios radiológicos convencionales (ultrasonografía, tomografía computarizada y resonancia magnética [RM]), aunque son útiles para el diagnóstico de esteatosis, no permiten diferenciar la esteatosis simple de la esteatohepatitis. Recientemente se ha desarrollado un nuevo procedimiento no invasivo, la elastografía transitoria (FibroScan), que es un método simple y reproducible que permite determinar la elasticidad hepática. En pacientes

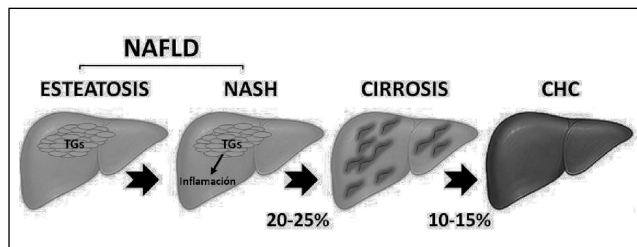


Figura 2 Progresión secuencial de enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD) a carcinoma hepatocelular (CHC). NASH: esteatohepatitis no alcohólica; TG: triglicéridos.

con hepatitis crónica C se ha observado una buena correlación entre el grado de elasticidad hepática y el estadio de fibrosis, de manera que valores de elasticidad hepática superiores a 8,7 y 14,5 kPa indican fibrosis estadios 2 y 4, respectivamente. En la hepatitis crónica C, la medición de la elasticidad hepática permitiría reducir la práctica de biopsias de seguimiento. Esta técnica también se está utilizando con buenos resultados en enfermedades de otra etiología como la cirrosis biliar primaria y en pacientes trasplantados. Datos preliminares sugieren que el FibroScan también puede ser útil en el HGA. Sin embargo falta aclarar algunos aspectos como la posible interferencia del depósito masivo de grasa y la aplicabilidad de esta técnica en pacientes con HGA y obesidad mórbida.

Más recientemente se han publicado resultados preliminares que sugieren que la elastografía mediante RM sería una buena técnica para determinar la intensidad de la fibrosis hepática. Los estudios efectuados en grupos pequeños de pacientes con enfermedades hepáticas de diferente etiología, incluyendo pacientes con HGA, muestran una buena correlación entre la elasticidad hepática y el grado de fibrosis y que el grado de esteatosis no influye en los resultados. La utilidad de esta nueva técnica debe ser evaluada en series más amplias de pacientes.

Entre las muestras analíticas encontramos el FibroTest, que incluye un panel de marcadores con carácter predictivo (la alfa-2 macroglobulina, la haptoglobina, la apolipoproteína A1, la bilirrubina y la GGT) basado en el análisis multivariado, tanto de variables clínicas como de laboratorio bien establecidas. Utilizando un valor de corte de 0,3 el FibroTest es capaz de predecir la fibrosis estadios 2-4 con una sensibilidad y especificidad del 77%, mientras que si el valor de corte se eleva a 0,7, la especificidad para el diagnóstico de fibrosis avanzada es del 98%, con un valor predictivo positivo del 73%.

El NashTest es otro índice que se ha desarrollado para el diagnóstico de la esteatohepatitis y combina los parámetros del FibroTest con la ALT, AST, el índice de masa corporal, el colesterol, los triglicéridos y la glucosa. La aplicación de este índice parece predecir la presencia de esteatohepatitis en los pacientes con HGA¹¹⁻¹⁴.

Recientemente se han publicado los resultados de un nuevo índice para detectar a los pacientes con fibrosis avanzada. Se identificaron 6 variables predictivas independientes del grado de fibrosis. Estas variables son la edad, la hiperglicemia, el índice de masa corporal, la cifra de plaquetas, la albúmina y el cociente AST/ALT. A partir de

estas variables se ha construido un índice que permite identificar a los pacientes con fibrosis avanzada con una elevada sensibilidad y especificidad.

Metabolómica y enfermedad de hígado graso

La identificación de nuevos biomarcadores capaces de diferenciar entre la esteatosis y HGNA es de fundamental importancia para evitar la biopsia hepática en el diagnóstico de HGNA, así como la evaluación de la eficacia de un potencial tratamiento terapéutico. El campo emergente de la metabolómica tiene el potencial para revelar marcadores biológicos específicos para el diagnóstico clínico. Los últimos avances tecnológicos han proporcionado a los investigadores la capacidad para medir cientos o incluso miles de metabolitos de pequeñas moléculas en tan sólo unos minutos por muestra, facilitando el camino para la generación de la hipótesis ideal en el estudio de enfermedades complejas^{1,15-17}. El enfoque es particularmente aplicable a las lesiones del hígado, donde suero u orina son las muestras más comunes disponibles para las pruebas de laboratorio, a diferencia de otras enfermedades, como el cáncer, donde el tejido disponible se adapta a los requisitos necesarios para el análisis transcriptómico o proteómico.

La metabolómica puede ser un método particularmente adecuado en el diagnóstico de HGNA, ya que el hígado es el órgano metabólico por excelencia, y alteraciones de las vías críticas del metabolismo hepático, tales como el ciclo de la metionina y el metabolismo de fosfolípidos que están fuertemente asociados con el desarrollo de HGNA^{18,19}.

Perfil metabolómico de modelos animales con enfermedad de hígado graso

Una de las grandes promesas del enfoque de la metabolómica es el hecho de una menor dependencia interespecie de grupos de biomarcadores metabólicos con respecto a los genéticos o proteicos facilitando, de esta manera, la comparación directa entre modelos animales y la patología en humanos²⁰. Esta característica realza el carácter traslacional de esta técnica y su aplicabilidad en la práctica clínica.

A pesar de que la condición de HGNA se asocia típicamente con los principales factores del síndrome metabólico, como la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes y la hipertrigliceridemia, los mecanismos patogénicos de la enfermedad y su progresión no están claros. Esto conlleva la necesidad de un desarrollo experimental en animales modelos, que ha proporcionado una mayor y mejor comprensión de los muchos procesos complejos que ocurren en la progresión del hígado graso a través de los diferentes estadios de esta enfermedad.

Para el estudio del HGNA, el modelo animal debe mostrar, junto con las alteraciones bioquímicas asociadas a la enfermedad, los rasgos fenotípicos clásicos con acumulación de grasa en el hígado y la progresión a través de la degeneración de los hepatocitos y la inflamación^{21,22}. Todas estas características se observan en el modelo de ratón *knockout* en el gen *glicina N-metiltransferasa* (GNMT KO), basado en las perturbaciones detectadas en el metabolismo

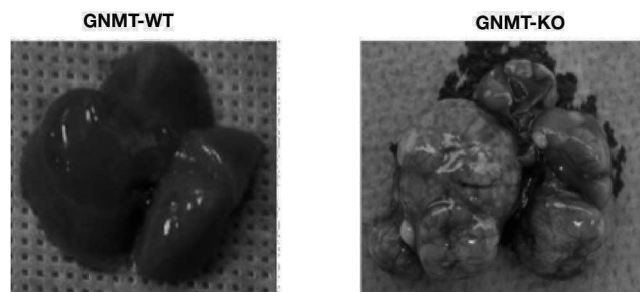


Figura 3 Carcinoma hepatocelular de un ratón modificado genéticamente *knockout* para el gen GNMT.

de la metionina, donde los animales tienen elevados valores séricos de ALT, AST y del mayor donante de grupos metilos, la molécula S-adenosilmetionina (SAME). Estos animales desarrollan de forma absolutamente espontánea esteatosis hepática, esteatohepatitis, fibrosis y carcinoma hepatocelular (CHC)²³.

Los mamíferos catabolizan hasta la mitad de su ingesta diaria de metionina en el hígado, a través de la conversión de ésta en una reacción catalizada por la metionina adenosiltransferasa I/III (MATI/III). Esta enzima es la responsable de la síntesis de SAME²⁴. SAME es el sustrato principal en las reacciones de transmetilación catalizadas por la metiltransferasa, que implican la donación de un grupo metilo a una gran variedad de moléculas aceptoras. En términos cuantitativos, la metiltransferasa hepática más importante que actúa sobre los valores de SAME en este órgano es la GNMT, que cataliza la conversión de este metabolito a S-adenosilhomocisteína (SAH), un potente inhibidor de las reacciones de metilación. La importancia de la enzima GNMT es, en consecuencia, mantener constante la relación de SAME/SAH evitando así los procesos de metilación aberrante. Este mecanismo fue ejemplificado recientemente por la constatación de que durante el desarrollo de HGNA, tras la pérdida de GNMT, se induce la metilación aberrante de ADN y las histonas, lo que resulta en la modulación epigenética y en la inducción de vías de señalización críticas implicadas en esta patología²². Otros datos complementarios que apoyan la idoneidad del modelo de GNMTKO en su comparación con la patología de HGNA en humanos incluye la identificación de varios niños con mutaciones en GNMT que presentan enfermedad hepática de moderada a leve. Finalmente, la pérdida de heterocigosidad de GNMT en torno al 40% de los pacientes con CHC identifica a GNMT como un gen de susceptibilidad para el desarrollo tumoral en el hígado^{25,26}.

La primera aproximación metabolómica a esta patología se realizó comparando el metaboloma en suero de los animales GNMTKO frente a sus controles, con el fin de definir un perfil de HGNA.

Mediante el empleo de la plataforma de metabolómica se realizó este estudio basado en la cromatografía líquida-espectrometría de masas (UPLC-MS), con el fin de explorar los perfiles metabólicos de suero de los animales GNMT-WT/KO. Esta huella metabolómica se comparó con la identificada en pacientes que desarrollan esta enfermedad diagnosticados previamente de HGNA mediante análisis histopatológico. Los biomarcadores pueden proporcionar tanto ideas

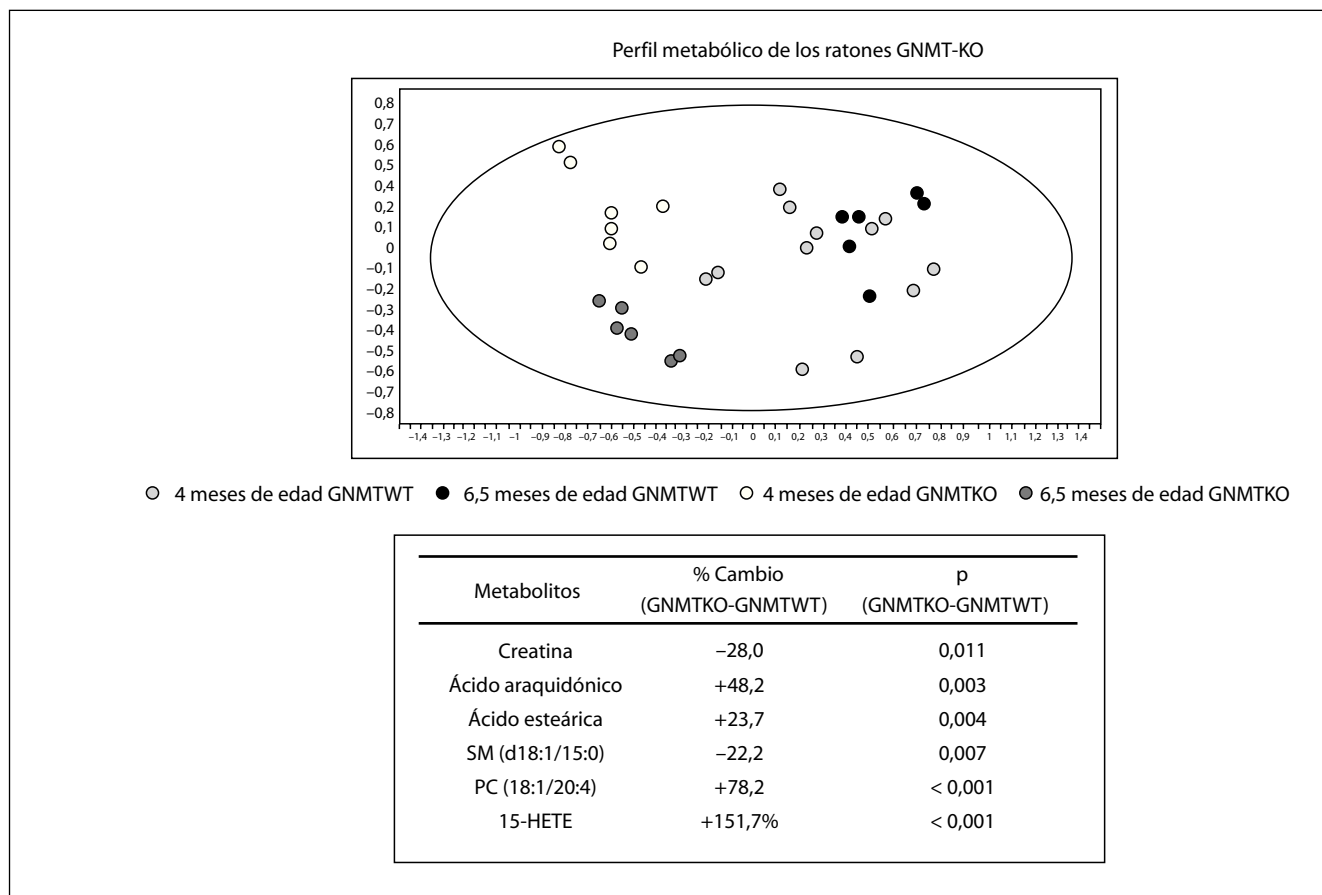


Figura 4 Análisis de los metabolitos con capacidad discriminatoria entre ratones control (GNMTWT) y los ratones GNMTKO de 4 y 6 meses de edad (esteatosis).

mecanísticas como facilitar una herramienta para su uso práctico en aplicaciones clínicas en esta patología.

Los resultados de los experimentos realizados en paralelo entre el perfil metabólico de HGNA humano y el modelo animal de EGHNA GNMTKO revelaron una clara correlación en la progresión de la enfermedad. Una serie de biomarcadores metabolómicos comunes fueron identificados en los modelos animales GNMTWT/KO y en los pacientes con HGNA. Teniendo en cuenta las características patológicas de los animales GNMTKO, semejantes a la progresión observada en humanos, es razonable suponer que pueden ser mecanismos metabólicos comunes los responsables de las alteraciones observadas. Además, el hecho de que los metabolitos se encuentren en ambas especies, ofrece una confianza adicional tanto para su selección como para la validación de biomarcadores candidatos específicos del estudio. Estos resultados demuestran el potencial de la metabolómica, técnicamente basada en la espectrometría de masas para facilitar estudios fisiológicos entre especies a través de la rápida identificación y cuantificación de los metabolitos comunes. Los grupos de metabolitos alterados en pacientes con HGNA con respecto a los encontrados en sujetos sanos fueron ácidos orgánicos, ácidos grasos libres, fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, ácidos biliares y esfingomielina. Todas estas clases de compuestos están involucradas en las principales rutas del metabolismo hepático.

La creatina se encontró disminuida tanto en los modelos animales (20%; $p = 0,09$) como en muestras humanas con hígado graso no alcohólico (24%; $p = 0,01$) con respecto a sus respectivos controles. La creatinina se ha utilizado para evaluar la posible disfunción hepática, correspondiendo unos valores disminuidos a una reducción de la capacidad metabólica del hígado^{27,28}.

El potencial papel de la composición de ácidos grasos en la progresión de la HGNA se ha estudiado previamente. El perfil de ácidos grasos observado en el modelo de GNMTKO y pacientes diagnosticados presenta una composición muy semejante, reforzando la similitud en los mecanismos implicados en el desarrollo de esta patología y validando el modelo de HGNA en los animales GNMTKO²⁹.

Finalmente, en diversos modelos experimentales se ha observado que la toxicidad producida por lípidos es más severa en el caso de los ácidos grasos saturados comparándolos con los ácidos grasos monosaturados³⁰. De acuerdo con estos datos se observó un aumento en el ratio saturados/monosaturados, tanto en pacientes con hígado graso como en el modelo animal. En este estudio también se muestra evidencia de la modulación de actividad $\Delta 6$ -desaturasa, tanto en el modelo animal GNMTKO como en los pacientes con HGNA a través de una disminución de los valores circulantes de ácido linoleico (18:2 n-6) y R-linolénico (18:3 n-3). En correlación con estos datos, uno de los productos deriva-

dos a lo largo de esta vía, el ácido araquidónico, se detectó en una mayor cantidad en las muestras de HGNA³¹. El ácido araquidónico puede convertirse en prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas, de las cuales las prostaglandinas y los leucotrienos son potentes mediadores proinflamatorios.

Los endocannabinoides también son metabolitos del ácido araquidónico que han sido recientemente vinculados con el desarrollo de la esteatosis hepática³². Dentro de las vías de la lipooxigenasa, la lipooxigenasa 12 introduce un oxígeno en el átomo de carbono 12 del ácido araquidónico generando 12 hidroperoxi-derivados como el 12(S)-HETE inducidos en el modelo KO de GNMT con respecto al animal control. Finalmente, 2 de los 3 marcadores con mayor capacidad discriminativa entre los ratones GNMTKO y WT son fosfolípidos implicados en el metabolismo del ácido araquidónico.

Las fosfolipasas A1 (PLA1) y A2 (PLA2) constituyen una gran familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de los fosfolípidos en posición sn-1 y sn-2, respectivamente, produciendo ácidos grasos libres y lisofosfolípidos^{33,34}. La modulación de la actividad PLA2 se asoció con HGNA en el pasado. La observación de que GNMT-KO y los pacientes humanos diagnosticados como EHNA tienen elevados valores de sn-2 que pueden reflejar cambios en la actividad enzimática de la fosfolipasa, implicada en la señalización de icosanoides.

Finalmente, también se encontró un aumento significativo de los ácidos biliares en ambas muestras provenientes del modelo animal y en los pacientes con HGNA, así como en diferentes tipos de esfingomielinas. Los esfingolípidos han sido previamente asociados con muerte hepatocelular inducida por estrés asociado a ligando, lo que contribuye a la progresión de enfermedades hepáticas como esteatohepatitis, isquemia-reperfusión, lesión hepática o finalmente hepatocarcinogénesis³⁵⁻³⁷.

Perfil metabolómico de la enfermedad de hígado graso

Pacientes con diferentes grados de HGNA forman grupos metabólicos discretos. Para llegar a estas conclusiones se analizaron muestras de suero tomadas de 81 pacientes con diagnóstico histológico de hígado esteatótico (n = 57) o NASH (n = 24). Resultados muy similares se obtuvieron cuando se examinó un conjunto de muestras de plasma de 30 pacientes con diagnóstico histológico de hígado esteatótico (n = 16) o EHNA (n = 14). El análisis de las muestras de plasma fue especialmente útil para reducir la influencia del índice de masa corporal del paciente en la selección final de los biomarcadores, ya que no hubo diferencias significativas en este parámetro entre pacientes con esteatosis ($38,4 \pm 1,5 \text{ kg/m}^2$) y EHNA ($37,8 \pm 1,6 \text{ kg/m}^2$) en comparación con la situación observada en las muestras de suero, donde se detectaba una disparidad apreciable (esteatosis, $44,6 \pm 0,9 \text{ kg/m}^2$; EHNA, $34,3 \pm 2,1 \text{ kg/m}^2$).

En conjunto, estos datos preliminares indican que la agrupación metabólica característica de cada fase de HGNA y la capacidad de discriminación de los biomarcadores son, en gran parte, independientes del índice de masa corporal, la edad y el sexo (fig. 5).

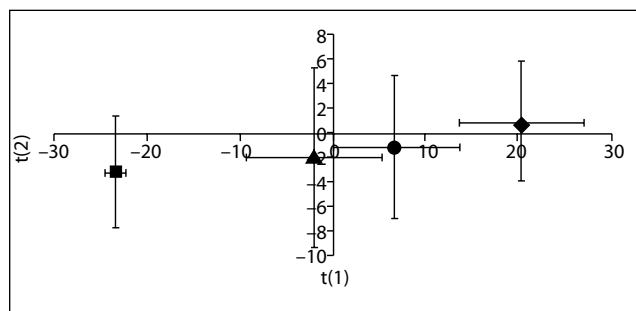


Figura 5 Perfil metabolómico obtenido del análisis de un grupo de pacientes con esteatosis grado 1 (n = 20) (diamante); esteatosis grado 2 (n = 18) (círculo); esteatosis grado 3 (n = 19) (triángulo) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH) (n = 24) (cuadrado).

En este primer estudio, se ha identificado un grupo de 11 metabolitos con capacidad discriminativa entre pacientes con esteatosis y EHNA. Este grupo de biomarcadores se compone de 3 plasmalógenos, 1 esfingomielina, 2 conjugados esteroides (sulfoglicolitolato y hyodeoxicolato-6-O-glucuronido), 1 ácido biliar (ácido trihidroxidopropanoico) y 4 moléculas que hasta el momento actual no han podido ser identificadas. Ninguno de estos metabolitos ha sido reconocido previamente como biomarcador sérico de enfermedad hepática. Si estos metabolitos juegan un papel en la patogenia de la HGNA, o son simplemente biomarcadores séricos que reflejan la progresión de la enfermedad, requiere un estudio más detallado. Aunque es importante resaltar, sin embargo, que los fosfolípidos, como el sulfoglicolitolato, y los ácidos biliares se han relacionado con la progresión de HGNA.

En resumen, estos datos indican que, aunque no hay un único metabolito que resulte ser un predictor fiable, la abundancia relativa de los 11 marcadores en suero se puede emplear para diagnosticar una serie de muestras ciegas. De las 10 muestras de suero ciegas, 8 pacientes fueron correctamente diagnosticados.

El verdadero potencial de estos biomarcadores metabólicos en la HGNA no se confirmará hasta que se realicen estudios longitudinales con cohortes de pacientes amplias, donde los valores de los metabolitos y su capacidad discriminativa se estudien tanto durante la progresión de la enfermedad del HGNA en sus distintas fases como en la respuesta a potenciales tratamientos terapéuticos.

Adicionalmente, estos resultados deben ser validados con otras cohortes de pacientes de origen no caucásico para evitar biomarcadores asociados a grupos étnicos. El presente método de clasificación de HGNA descrito en este trabajo, junto con otros sistemas basados en las mediciones de rutina clínica y de laboratorio (como FibroTest, SteatoTest, NashTest, etc.), abre nuevas vías de diagnóstico que potencialmente podrían sustituir la necesidad de la biopsia hepática como procedimiento de rutina en esta patología. Además, este panel de biomarcadores séricos puede proporcionar a los clínicos una valiosa herramienta para determinar la progresión y respuesta de los enfermos de NAFLD a diferentes aproximaciones terapéuticas.

Limitaciones de la metabolómica

Desde el punto de vista práctico, uno de los obstáculos más importantes que enfrenta la introducción de la tecnología metabolómica en la práctica clínica habitual es la incapacidad para producir simples *kits*, similares a los productos empleados en las tecnologías “ómicas” hermanas como la transcriptómica y la proteómica. Debido a la escasa probabilidad de que anticuerpos específicos, u otro tipo de tecnologías destinadas a la detección química, se desarrollen en este campo en un futuro próximo, las aplicaciones clínicas tendrán que basarse en versiones de escala reducida de la tecnología existente. En este sentido, el análisis mediante espectrometría de masas tiene el potencial de ofrecer una serie de importantes ventajas prácticas respecto a las tecnologías existentes. El tiempo de análisis es corto (aprox. 10 min/muestra), no siendo necesario un pretratamiento de la muestra en esta fase. Estas características hacen factible la aplicación de la metabolómica en proyectos *high throughput* de estudios clínicos donde se evalúe la aplicabilidad de esta técnica como método diagnóstico o la repuesta a nuevos fármacos. La reducción de un análisis de amplio espectro a una plataforma dirigida, cuantitativa o semicuantitativa realmente puede ofrecer una solución robusta y operable en el ámbito hospitalario para el diagnóstico no invasivo del HGNA.

En conclusión, el perfil metabolómico empleando la tecnología UPLC-MS se ajusta a las necesidades requeridas para el estudio del HGNA. Adicionalmente, los perfiles metabolómicos obtenidos en pacientes con HGNA pueden ser muy útiles para identificar los mecanismos patogénicos subyacentes en esta enfermedad, así como su monitorización y progresión.

Bibliografía

- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabolomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29:1181-9.
- Wiklund S, Johansson E, Sjöström L, Mellerowicz EJ, Edlund U, Shockcor JP, et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal Chem*. 2008;80:115-22.
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002;346:1221-31.
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*. 2003;37:1202-19.
- Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. 2005;42:44-52.
- Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Halpern Z, Oren R. Prevalence of primary nonalcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. *Liver Int*. 2006;26:856-63.
- Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology*. 2004;39:1647-54.
- Klein S, Mittendorf B, Eagon JC, Patterson B, Grant L, Feirt N, et al. Gastric bypass surgery improves metabolic and hepatic abnormalities associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol*. 2006;4:639-44.
- Zelber-Sagi S, Kessler A, Brazowsky E, Webb M, Lurie Y, Santo M, et al. A double-blind randomized placebo-controlled trial of orlistat for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;130:1564-72.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41:1313-21.
- Castera L, Foucher J, Bertet J, Couzigou P, De Ledinghen V. FibroScan and FibroTest to assess liver fibrosis in HCV with normal aminotransferases. *Hepatology*. 2006;43:373-4.
- Poynard T, Imbert-Bismut F, Munteanu M, Messous D, Myers RP, Thabut D, et al. Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C. *Comp Hepatol*. 2004;3:8.
- Poynard T, Ratziu V, Naveau S, Thabut D, Charlotte F, Messous D, et al. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comp Hepatol*. 2005;4:10.
- Morra R, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Messous D, Ratziu V, Poynard T. FibroMAX: towards a new universal biomarker of liver disease? *Expert Rev Mol Diagn*. 2007;7:481-90.
- Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discovery*. 2002;1:153-61.
- Gowda GA, Zhang S, Gu H, Asiago V, Shanaiah N, Raftery D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008;8:617-33.
- Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM. Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:653-83.
- Mato JM, Martínez-Chantar ML, Lu SC. Methionine metabolism and liver disease. *Annu Rev Nutr*. 2008;28:273-93.
- Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2009;50:1827-38.
- Heijne WH, Kienhuis AS, Van Ommen B, Stierum RH, Groten JP. Systems toxicology: applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology. *Expert Rev Proteomics*. 2005;2:767-80.
- Varela-Rey M, Embade N, Ariz U, Lu SC, Mato JM, Martínez-Chantar ML. Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: understanding the human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:969-76.
- Ariz U, Mato JM, Lu SC, Martínez Chantar ML. Nonalcoholic steatohepatitis, animal models, and biomarkers: what is new? *Methods in Molecular Biology*. Vol. 593. Totowa: Humana Press; 2010. p. 109-36.
- Martínez-Chantar ML, Vázquez-Chantada M, Ariz U, Martínez N, Varela M, Luka Z, et al. Loss of the glycine N-methyltransferase gene leads to steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*. 2008;47:1191-9.
- Kotb M, Mudd SH, Mato JM, Geller AM, Kredich NM, Chou JY, et al. Consensus nomenclature for the mammalian methionine adenosyltransferase genes and gene products. *Trends Genet*. 1997;13:51-2.
- Heady JE, Kerr SJ. Alteration of glycine N-methyltransferase activity in fetal, adult, and tumor tissues. *Cancer Res*. 1975;35:640-3.
- Chen SY, Lin JR, Darbha R, Lin P, Liu TY, Chen YM. Glycine N-methyltransferase tumor susceptibility gene in the benzo(a) pyrene-detoxification pathway. *Cancer Res*. 2004;64:3617-23.
- Nanji AA, Blank D. Low serum creatine kinase activity in patients with alcoholic liver disease. *Clin Chem*. 1981;27:1954.

28. Malnick SD, Bass DD, Kaye AM. Creatine kinase, a response marker in liver and other organs. *Hepatology*. 1994;19: 261.
29. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2007;46:1081-90.
30. Gentile CL, Pagliassotti MJ. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*. 2008;19:567-76.
31. Kotronen A, Seppanen-Laakso T, Westerbacka J, Kiviluoto T, Arola J, Ruskeepaa AL, et al. Hepatic stearyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes*. 2009;58:203-8.
32. Kunos G, Osei-Hyiaman D. Endocannabinoids and liver disease. Endocannabinoid involvement in obesity and hepatic steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294: G1101-4.
33. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1488:1-19.
34. Kudo I, Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002;68-69:3-58.
35. Mari M, Colell A, Morales A, Paneda C, Varela-Nieto I, García-Ruiz C, et al. Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase 1A, contributing to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis. *J Clin Invest*. 2004;113:895-904.
36. Mari M, Fernández-Checa JC. Sphingolipid signalling and liver diseases. *Liver Int*. 2007;27:440-50.
37. Morales A, Lee H, Goni FM, Kolesnick R, Fernández-Checa JC. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis*. 2007;12:923-39.