

# OLD-HEPAMARKER: Utilidad del análisis metabolómico sérico para la detección del daño hepático preneoplásico en personas con fragilidad aumentada por la edad

RIR Macías<sup>1,2</sup>, JJG Marin<sup>1,2</sup>, L Muñoz-Belvis<sup>3</sup>, MJ Monte<sup>1,2</sup>, E Herraes<sup>1,2</sup>, Cecilia Rodrigues<sup>4</sup>, Marta Afonso<sup>4</sup>, Guido Carpino<sup>5</sup>, Piotr Milkiewicz<sup>6</sup>, Rui E Castro<sup>4</sup>



- Laboratorio de Hepatología Experimental y Vectorización de Fármacos (HEVEFARM), Universidad de Salamanca, IBSAL, Salamanca
- Centro Investigación Biomédica en Red para el Estudio de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III
- Servicio de Cirugía Gastrointestinal, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, Salamanca
- Facultad de Farmacia, Universidad de Lisboa (Portugal)
- Universidad de Roma "Foro Italico", Roma (Italia)
- Unidad de Medicina Interna y Hepática. Departamento de Cirugía General Hepática y Trasplante, Universidad de Varsovia, Polonia



## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

Con la edad avanzada aumenta el riesgo de aparición de enfermedades hepáticas, entre las que se encuentra el hígado graso no alcohólico (EHGNA), que afecta a un tercio de la población global y que se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa en el hígado. Cuando se mantiene de forma crónica, algunos hígados grasos desarrollan inflamación que puede progresar a un daño irreversible, con cirrosis, que es más frecuente en personas ancianas (Figura 1), en las que aparecen más complicaciones. La cirrosis puede evolucionar a cáncer hepático: hepatocarcinoma (HCC) o colangiocarcinoma (CCA) (1). El objetivo de este proyecto es validar la utilidad de marcadores en suero que permitan el diagnóstico diferencial entre el CCA y el HCC y realizar un diagnóstico precoz en pacientes mayores con patologías de riesgo de desarrollo de cáncer hepático (2).

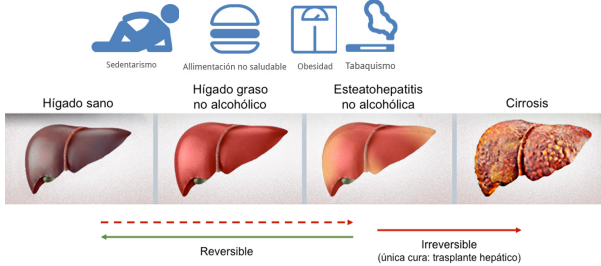


Figura 1. Evolución de la enfermedad de hígado graso no alcohólico hacia una situación más grave con inflamación y daño celular (esteatohepatitis no alcohólica) y formación de cicatrices (cirrosis). En las etapas de daño más severo el hígado no realiza correctamente sus funciones y es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer hepático.

## MÉTODOS

Se han seleccionado muestras de suero de pacientes con CCA, HCC, hígado graso no alcohólico/esteatohepatitis no alcohólica (EHGNA/EHNA) y sujetos control (n≥20/grupo) atendidos en los Hospitales Universitarios de Salamanca y San Sebastián, y la Clínica Universitaria de Pamplona. Los extractos séricos de lípidos y aminoácidos en metanol y cloroformo/metanol se analizan mediante UHPLC (3) y los miRNAs del suero mediante qRT-PCR (4) (Figura 2).

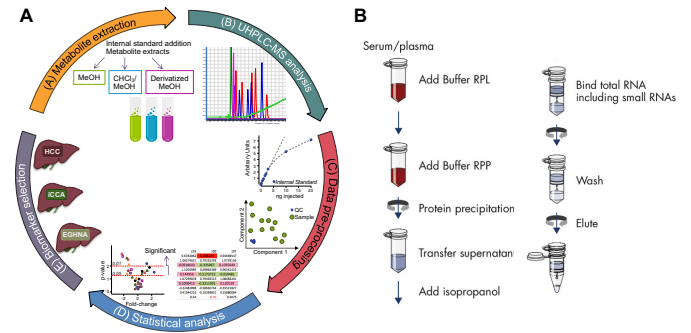


Figura 2. Flujo de trabajo para la extracción de metabolitos de muestras de suero para la determinación del perfil metabolómico por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS) (A) y para la obtención de RNA de suero para posteriormente analizar el contenido en miRNAs por qRT-PCR (B).

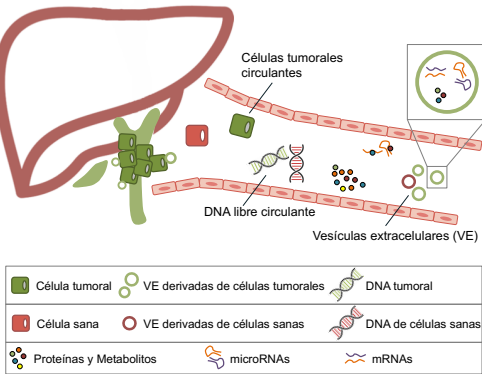


Figura 3. Representación esquemática de diferentes tipos de biomarcadores que podrían ser de utilidad para el diagnóstico de los tumores hepáticos (hepatocarcinoma y colangiocarcinoma) mediante un análisis en sangre: células tumorales circulantes que escapan del tumor primario; vesículas extracelulares (VE) del tumor que contienen ácidos nucleicos y proteínas; DNA y RNA libre que se liberan de las células tumorales; y proteínas y metabolitos secretados por las células tumorales (adapted from ref. 5).

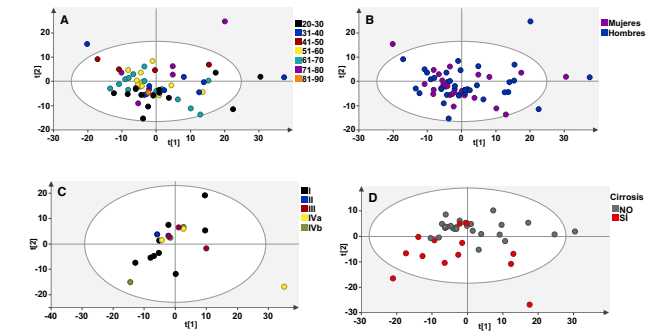


Figura 4. Gráficas de análisis de componentes principales (PCA) no supervisadas de muestras de suero humano. Los colores representan el rango de edad (A), el género (B), el estado tumoral (C) y la presencia o ausencia de cirrosis (D). Cada punto representa una muestra.

A ICCA vs Control				
Metabolite	AUC	SEN (%)	SPE (%)	Log2 (FC)
BA	0.857	65	90	2.17
GDCA	0.823	70	90	2.17
Androstereone sulfate II	0.808	95	58	-1.41
DHEAS	0.790	65	85	-1.29
ChoE(22:6)	0.763	65	85	-0.58
ChoE(20:4)	0.760	80	75	-0.43
CMH	0.738	75	80	-0.50
PC	0.713	65	100	0.40
SM	0.755	65	75	-0.49
CA 19-9	0.720	75	80	7.48

B HCC vs Control				
Metabolite	AUC	SEN (%)	SPE (%)	Log2
SM(36:2)	0.895	90	85	-0.82
SM(18:2/20:0)	0.880	65	100	-0.79
SM(18:1/18:0)	0.858	90	85	-0.68
SM(42:1)	0.813	65	90	-0.55
SM(18:1/22:0)	0.803	65	90	-0.55
AA	0.873	75	90	-0.78
ChoE(20:4)	0.873	80	90	-0.52
ChoE(18:2)	0.858	65	95	-0.51
ChoE(22:6)	0.828	70	90	-0.87
ChoE(16:0)	0.800	80	80	-0.43
BA	0.858	80	80	2.44
PC	0.800	65	90	-0.54
LPI	0.785	90	80	0.44
APP	0.806	80	70	5.30

C HCC vs ICCA				
Metabolite	AUC	SEN (%)	SPE (%)	Log2 (FC)
AA	0.725	55	90	-0.89
Phe-Phe	0.675	80	55	-0.63
PC	0.730	65	85	0.72
PE	0.705	75	60	-0.44
Cer	0.685	70	80	-0.26
SM	0.683	50	90	-0.26
AFP	0.785	75	75	5.11
CA 19-9	0.575	100	35	-5.90

D	
Discovey	Validation
AUC = 0.890	AUC = 0.718
SEN = 90%	SEN = 53%
SPE = 90%	SPE = 95%

Figura 5. Comparación de los perfiles metabolómicos en suero en la cohorte de investigación. Metabolitos con mejor capacidad diagnóstica en las comparaciones CCA intrahepático (ICCA) vs Controles (A), HCC vs Controles (B) y pacientes con ICCA vs pacientes con HCC (C). Capacidad predictiva de la combinación de metabolitos ácido aspártico, glicina, SM (42:3) y SM (43:2) para discriminar entre ICCA vs HCC (D). AA, aminoácidos; AUC, área bajo la curva; BA, ácidos biliares; Cer, ceramidas; ChoE, ésteres de colesterol; CMH, monohexosilceramidas; FC, fold-change; LPI, lisofosfatidilinosítoles; PC, fosfatidilcolinas; PE, fosfatidilanolamínas; SEN, sensibilidad; SFA, ácidos grasos saturados; SM, estingomiélinas; SPE, especificidad; ST, esteroles; TG, triglicéridos.

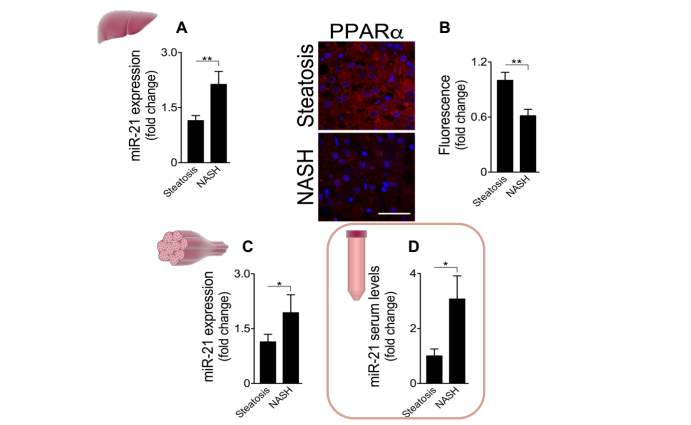


Figura 6. La expresión de miR-21 está elevada en hígado, músculo y suero de pacientes con esteatohepatitis (NASH) en comparación con hígado graso (Steatosis). (A) Análisis de miR-21 en hígado. (B) Imágenes representativas del marcaje de PPARα (rojo) en tejido hepático de pacientes. Los núcleos se marcaron con Hoechst 33258 (azul). El histograma correspondiente muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de PPARα. Barra de escalas= 10 μm. (C) Análisis de miR-21 por qRT-PCR en músculo. (D) Análisis de miR-21 por qRT-PCR en suero.

## BIBLIOGRAFÍA

- Banales *et al.* Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2016; 13: 261-80.
- Banales *et al.* Hepatology, doi: 10.1002/hep.30319.
- Barr *et al.* J Proteome Res 2012; 11: 2521-32.
- Rodríguez *et al.* Cell Death Dis. 2017 May 25;8(5):e2825.
- Macías *et al.* Biochim Biophys Acta, 1864:1468-1477.

## CONCLUSIÓN

Cambios específicos en las concentraciones en suero de ciertos metabolitos y de miRNAs pueden ser útiles para discriminar entre el ICCA y el HCC y podrían ayudar en el diagnóstico temprano de estas enfermedades en personas mayores que tienen más riesgo de padecerlas, y también para detectar la evolución del hígado graso no alcohólico (esteatosis) a esteatohepatitis.