

Informe final publicable de proyecto

Aplicación de la metabolómica basada en RMN al diagnóstico y seguimiento de enfermedades hepáticas

Código de proyecto ANII: FMV_1_2019_1_155475

28/12/2023

MOYNA BORTHAGARAY, Guillermo (Responsable Técnico - Científico)

NOCETI PENZA, Ofelia María (Co-Responsable Técnico-Científico)

BERGALLI, LUCIA (Investigador)

GERONA SANGIOVANNI, Solange (Investigador)

LÓPEZ RADCENCO, Andrés (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIÓN LITORAL NORTE (Institución Proponente) \\
MINISTERIO DE DEFENSA NACIONAL. DIRECCIÓN NACIONAL DE SANIDAD DE LA FUERZAS ARMADAS \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

Con apoyo de la ANII se evaluó el abordaje metabólico basado en RMN como método diagnóstico no invasivo y veloz de enfermedades hepáticas, llegándose a establecer las bases para el desarrollo de algoritmos para diagnosticarlas. Luego de evaluar fichas de médicas de 6800 pacientes del SEH/PNTH y coordinar jornadas de extracción, se lograron recolectar 198 muestras de pacientes diagnosticados y en seguimiento del SEH/PNTH con una diversidad de hepatopatías, y se registraron los perfiles de 1H RMN y JEDI para todos ellos. Un enfoque similar se empleó para recabar muestras de 99 voluntarios sanos y registrar sus perfiles de 1H RMN y JEDI. Al momento se han llevado a cabo diferentes análisis estadísticos con los datos de los diferentes cohortes, incluyendo comparaciones entre pacientes pre- y post-trasplante, comparaciones entre cohortes de pacientes y voluntarios sanos, y comparaciones entre cohortes de pacientes con diferentes enfermedades hepáticas. Se generaron modelos estadísticos que permiten discriminar entre cohortes, destacándose pacientes pre- y post-trasplante y aquellos con hepatopatías autoinmunes y virales. Se identificaron además potenciales biomarcadores que podrían ser empleados en futuros modelos paramétricos de diagnóstico y estadificación en los que se continúa trabajando.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Químicas / Química Analítica / Metabólica

Palabras clave: Diagnóstico / Enfermedad hepática / Metabólica /

Introducción

El impacto sanitario, social, y económico debido a la elevada morbilidad de las enfermedades hepáticas constituye un problema de suma importancia para la salud pública, tanto en Uruguay como a nivel internacional. Dado a que muchas de estas afecciones son de evolución silenciosa en sus etapas tempranas, al momento de su diagnóstico ya han progresado a la cronicidad con un hígado en estado cirrótico y/o fibrótico. La enfermedad hepática crónica avanzada es irreversible, tiene un elevado potencial de transformación maligna, y su única opción terapéutica es el trasplante hepático. Desafortunadamente, el diagnóstico de ciertas enfermedades hepáticas es elusivo. Muchas veces se requiere de una combinación de ensayos serológicos, moleculares, imagenológicos e histopatológicos, los cuales tienen costos considerables y tiempos de retorno de resultados de un mes en el mejor de los casos. En el abordaje por procedimientos invasivos también hay que tener en cuenta los riesgos inherentes para el paciente y las potenciales complicaciones que de estos pueden derivar. Por ende, el desarrollo de nuevos métodos diagnóstico de enfermedades hepáticas mínimamente invasivos, rápidos, y de menor costo es un área de investigación activa [1-3].

El uso del análisis metabólico como técnica para el diagnóstico de patologías humanas es relativamente reciente [4]. El método se basa en el monitoreo simultáneo de un gran número de biomarcadores presentes en diferentes matrices fisiológicas, incluyendo orina, heces, saliva, plasma, suero y tejidos [5]. Para la detección de estas especies, que pueden ir desde metabolitos de bajo peso molecular hasta proteínas, se emplea una variedad de técnicas analíticas, siendo la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) las más robustas [6]. La sensibilidad de los métodos basados en RMN es menor a la de los que emplean LC-MS, pero la técnica tiene como ventajas una mínima preparación de muestra y que todos los componentes detectables pueden ser visualizados simultáneamente en un único espectro (metabólica no dirigida). La aplicación de la metabólica basada en LC-MS necesita, en general, el conocimiento previo de los metabolitos de interés (metabólica dirigida), pero gracias a sus bajos límites de detección y gran rango dinámico permite investigar un mayor número de compuestos [6]. La gran cantidad de componentes presentes en un espectro requiere de métodos estadísticos multivariados para analizar e interpretar los resultados [7,8], en particular el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante por proyecciones sobre estructuras latentes (PLS-DA) y sus variantes. Estos permiten agrupar en clases a los diferentes individuos representados en cada espectro (i.e., pacientes sanos y pacientes enfermos), e identificar las señales que diferencian a una clase de otra (i.e., metabolitos o biomarcadores asociados a cada etiología). En la práctica, los modelos obtenidos por PLS-DA validados tienen gran capacidad para la clasificación de nuevos casos. A su vez, las concentraciones relativas de biomarcadores específicos para una enfermedad pueden ser empleados en la elaboración de algoritmos diagnósticos de gran poder predictivo y, en principio, independientes de la plataforma analítica empleada para su detección y cuantificación [7,8].

Dado que el hígado controla unas 500 rutas metabólicas, los trastornos hepáticos tienen una gran repercusión sobre diferentes grupos de metabolitos. Por ejemplo, Bell y colaboradores concluyeron que la colangitis biliar primaria (CBP) y la colangitis esclerosante primaria (CEP) afectan de manera diferente el metabolismo de proteínas, aminoácidos, lípidos, y ácidos biliares [9]. Estos autores también indican alteraciones en las rutas metabólicas relacionadas con estrés oxidativo y peroxidación de lípidos, las cuales son características en muchos procesos inflamatorios. Existe evidencia que indica que la hepatitis autoinmune (HAI) afecta el ciclo de del ácido cítrico y las rutas gluconeogénicas y glicolíticas [10]. Sumadas a estas, en el caso de las hepatitis tóxicas (DILI) se observan además cambios en el ciclo de la urea, en la ruta cetogénica, y en la fosforilación oxidativa y beta-oxidación de ácidos grasos [11]. También hay cambios en el ciclo del ácido cítrico, la ruta glicolítica, y el metabolismo de aminoácidos en las infecciones agudas de hepatitis E [12]. Por ende, las técnicas metabolómicas son ideales para estudiar estas etiologías [1-3]. En efecto, el uso de metabolómica basada en 1H RMN de suero permite identificar pacientes con CBP y diferenciarlos de aquéllos afectados por la hepatitis autoinmune (HAI) o el virus de la hepatitis B crónica [13]. El estudio de Hao y colaboradores también identifica a la hidroxiprolina, al hidroxiiisovalerato, al citraconato y al piruvato como metabolitos discriminantes, y los emplea para la construcción de un algoritmo diagnóstico de CBP basado en sus concentraciones relativas. Utilizando un enfoque similar, Wang y colaboradores logran distinguir HAI de DILI, CBP, y CBP superpuesta con HAI, y proponen un modelo basado en 9 biomarcadores para su diagnóstico [10]. A estos dos ejemplos se suman estudios por análisis metabolómico de DILI [11,13,14], hepatitis virales [12,13,16,17], colangitis esclerosante primaria (CEP) [18], hígado graso no alcohólico (NAFLD) [19,20], esteatohepatitis no alcohólica (NASH) [20], fibrosis [17], cirrosis [20,21], y hepatocarcinoma [20], así como de pronóstico y seguimiento en trasplante hepático [22-24]. Estos antecedentes destacan el potencial de la metabolómica basada en RMN como herramienta para el diagnóstico de trastornos hepáticos, y sirvieron como punto de partida para el proyecto FMV_1_2019_1_155475.

Nuestro planteo fue el de evaluar el abordaje metabolómico basado en RMN como método diagnóstico no invasivo y veloz de enfermedades hepáticas. Como se describe a continuación, se concretaron la mayoría de los objetivos del proyecto, algunos con desviaciones por la pandemia de COVID-19, y se lograron grandes avances en los objetivos parcialmente cumplidos. En particular, a partir del análisis de historias clínicas de los pacientes diagnosticados y en seguimiento del SEH/PNTH se llevaron a cabo convocatorias y se obtuvieron muestras para 198 individuos con hepatopatías de etiología variada, así como las correspondientes a 99 voluntarios sanos. Se registraron y procesaron los perfiles de 1H RMN de todas estas muestras, y se generaron modelos estadísticos que permiten discriminar diferentes cohortes de pacientes según su patología. Entre estos, se destacan comparaciones entre pacientes pre- y post-trasplante y entre hepatopatías autoinmunes y virales. De los estudios también surgieron potenciales biomarcadores que serán empleados en el desarrollo de modelos paramétricos de diagnóstico y estadificación en los que se continúa trabajando.

Metodología/diseño del estudio

Convocatoria de pacientes y voluntarios sanos

Las convocatorias de pacientes se llevaron a cabo luego de analizar cerca de 6800 fichas médicas de individuos en seguimiento en el SEH/PNTH. A aquellos seleccionados se los contactó telefónicamente, y los que accedieron a participar del estudio acudieron al SEH/PNTH en jornadas organizadas conjuntamente con investigadores del Departamento de Química del Litoral (DQL). Junto a la extracción de sangre, los pacientes firmaron un consentimiento informado y respondieron a preguntas de un breve cuestionario. Las muestras obtenidas fueron procesadas de manera estándar (i.e., coagulación por 30 min y centrifugado). Una alícuota del suero resultante se empleó para análisis bioquímicos de rutina, incluyendo funcional hepático (ALT, AST, GGT, y FAL), y otra fue almacenada en nitrógeno líquido para posterior traslado al DQL. Allí se conservó a -80 °C hasta la preparación de las muestras de RMN. Del total de 198 pacientes, 111 correspondían a afecciones autoinmunes, 34 eran muestras de individuos con hepatocarcinoma, y 53 de pacientes con hepatitis C. Entre las hepatopatías autoinmunes, 47 correspondían a HAI, 15 a CEP, 10 a CBP, 5 a colangitis biliar secundaria (CBS), y 34 a síndrome de superposición de autoinmunes (SA).

Desde fines de 2020 también se llevaron a cabo campañas por medios masivos, incluyendo programas de radio y televisión, periódicos, y redes sociales, para reclutar un cohorte de voluntarios sanos para los estudios. De esta forma se logró un grupo de 99 individuos (64 mujeres y 35 hombres), los que acudieron a diferentes jornadas de muestreo, mayormente en la ciudad de Paysandú. En estas se les hizo firmar un consentimiento informado, responder a preguntas de un cuestionario similar al utilizado para pacientes del SEH/PNTH, y se les extrajo una muestra de sangre que fue procesada y almacenada como se indicó anteriormente. Una alícuota de las muestras de suero resultantes fueron

empleadas en análisis bioquímicos llevados a cabo en el DQL con un analizador Weiner Labs CM 250, que incluyeron enzimograma hepático (AST, AST, GGT, FAL), colesterol, y triacilgliceridos. Las restantes muestras de suero fueron almacenadas a -80 °C hasta la preparación de las muestras de RMN.

Preparación de muestras y determinación de perfiles de ¹H RMN

Las muestras para análisis por RMN se prepararon combinando 400 μ L de suero y 200 μ L de buffer fosfato reconstituido en agua deuterada (D₂O) [25]. La adquisición de todos los espectros se realizó en un equipo Bruker AVANCE III 500 operando a una frecuencia de 500.13 MHz equipado con una sonda TXI con gradiente-z. Los experimentos de ¹H RMN se llevaron a cabo a 298 K utilizando una secuencia de pulsos de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) con supresión del pico de agua, un ancho espectral de 10 KHz, un tamaño de datos de 32 K, 128 barridos por experimento, y un tiempo de relajación de 4 s [26,27]. Para el procesamiento de los espectros se utilizó el software MNova (versión 14.0, MestreLab Research, S.L., Santiago de Compostela, España). Las señales de decaimiento de inducción libre (FID) fueron sometidas a un llenado con ceros a un tamaño de 64 K y apodizadas con una función de ventana exponencial de 0.3 Hz previo a la transformación de Fourier. La fase y la línea de base de todos los espectros fue corregida manualmente, y los datos fueron luego referenciados al pico del protón anomérico de la α glucosa (5.22 ppm). Los espectros fueron luego alineados manualmente, y los datos normalizados al total del área espectral luego de eliminar la región residual de la resonancia del agua y zonas sin señales. No se utilizó reducción de datos para construir las matrices utilizadas en los análisis estadísticos multivariados.

Sobre todas las muestras también se llevaron a cabo experimentos de difusión editados por acople-J (JEDI) [28]. los mismos permiten aumentar selectivamente las señales de ¹H correspondientes a N-acetatos de glicoproteínas y N-metilos cuaternarios de fosfolípidos supramoleculares en suero. Se facilita así la cuantificación de estas especies asociadas con respuesta inflamatoria sin interferencias de otros metabolitos. Para registrar los espectros JEDI se utilizó la secuencia de pulsos PGPE reportada por Nitschke y colaboradores [28], utilizando un ancho espectral de 10 KHz, un tamaño de datos de 32 K, 128 barridos por experimento, un tiempo de relajación de 4 s, y valores estándar de gradientes e intervalos de edición.

Tratamiento estadístico de los datos e identificación de metabolitos

Los análisis estadísticos multivariados, incluyendo análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante por mínimos cuadrados ortogonal (OPLS-DA), se realizaron con el programa PLS_ToolBox (versión 8.5, Eigenvector Research Inc., Manson, WA, EUA) implementado para MATLAB (revisión 2014a, The MathWorks Inc., Natick, MA, EUA). En todos los modelos los datos fueron centrados en la media y escalados usando un factor de Pareto [29]. Los datos se analizaron inicialmente mediante PCA, el cual reduce la dimensionalidad y facilita la identificación de agrupamientos o tendencias [30-32]. El gráfico de puntuación del PCA también se utiliza para identificar observaciones con desviaciones por encima de la región de significancia del 95% (elipse T₂ de Hotelling). Las validaciones cruzadas de los modelos de OPLS-DA se realizaron usando el método de los subgrupos aleatorios, empleando 20 iteraciones sobre datos divididos en 5 partes iguales. Las curvas de característica operativa del receptor (ROC) fueron trazadas y las áreas debajo de las mismas determinadas para asegurar la bondad de ajuste de los modelos resultantes [33,34]. También se hicieron tests de permutaciones de 100 iteraciones para estimar el grado de sobreajuste de los modelos discriminantes [35]. Cuando fue necesario, se llevaron a cabo análisis de espectroscopía de correlación total estadística (STOCSY) con una rutina de MATLAB creada en el laboratorio basado en el algoritmo de Cloarec y colaboradores [36].

Los metabolitos fueron identificados por comparación con datos de ¹H RMN de repositorios espectrales, incluyendo el Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB) [37] y el Human Metabolome Database (HMDB) [38]. En algunos casos estas identificaciones fueron confirmadas por medio de experimentos 1D-TOCSY and HSQC.

Resultados, análisis y discusión

En la Figura 1 de los anexos se presenta un espectro de ¹H RMN de una muestra de suero de un paciente con CBP a modo de ejemplo. Se pueden ver claramente señales para todos los grupos de metabolitos primarios, incluyendo aminoácidos, aminas, ácidos grasos de cadena corta, carbohidratos, y lípidos, los cuales aportan una gran cantidad de información sobre la condición metabólica del individuo. Como contraste también se presente el espectro JEDI de la misma muestra, donde se aprecia la capacidad de esta técnica para editar las señales correspondientes a N-acetatos de glicoproteínas y

N-metilos cuaternarios de fosfolípidos supramoleculares en suero.

El primer paso en los análisis estadísticos involucró un PCA de todos los datos de ¹H RMN de suero, lo cual fue posible una vez que todas las muestras de pacientes y voluntarios sanos del estudio fueran procesadas y analizadas. El gráfico de puntuación correspondiente a este análisis se muestra en la Figura 2 de los anexos. A pesar de observarse una gran variabilidad en los datos consistente con la diversidad en etiología y estado condición de los individuos, se pueden diferenciar claramente los pacientes pre-trasplante de los demás. Esto es esperable, ya que estas son muestras a pie de cama previo al ingreso a quirófano de individuos que están, en su mayoría, en estado crítico, y por lo tanto bajo un gran estrés metabólico. De cualquier manera, este gráfico de puntuación motivo que se realizaran comparaciones par-a-par entre diferentes cohortes según la etiología de la enfermedad hepática, así como entre estos y cohortes balanceados de voluntarios sanos.

Como fuera presentado de manera resumida en el primer informe de avance, la primer comparación par-a-par involucró pacientes pre- y post-trasplante hepático. Fue una actividad no planeada originalmente, pero cuyo resultado puede tener un gran valor al determinar la prognosis de los pacientes. En la Figura 3 de los anexos se presenta el gráfico de puntuación del PCA obtenido para estos datos de ¹H RMN, el cual indica un claro agrupamiento de ambas cohortes. En esta figura también se presenta el gráfico de puntuación del modelo OPLS-DA y su gráfico de valores de carga. Es importante destacar que este último fue validado, por lo que el modelo estadístico es capaz de discriminar con éxito a ambas cohortes y permitió además identificar metabolitos discriminantes. En el caso de pacientes pre-trasplante se observaron niveles elevados de lactato, acetato, acetoacetato, formiato, glucosa, aminoácidos (valina, isoleucina, y histidina, glutamato, tirosina, y metilhistidina), y betaina. Estos se relacionan con vías glicolíticas, gluconeogénicas, y del catabolismo proteico, los cual es consistente con estrés metabólico severo. Por otro lado, los lípidos y la fosfocolina se correlacionaron con pacientes post-trasplante. Aunque no se pueden descartar los efectos del cambio de dieta luego de la recuperación de los pacientes, este derivado de trimetilamonio podría en principio considerarse como un indicador de buen pronóstico. Resta ahora incorporar información de los análisis bioquímicos clásicos como metadata en el modelo con el fin de mejorar su especificidad y cuantificar todos los metabolitos discriminantes con variación significativa entre cohortes. Esto permitirá, por ejemplo, concretar el desarrollo de una calculadora de puntaje MELD-lactato para pacientes pre-trasplante basada mayormente en datos de ¹H RMN [39]. Utilizando parte de estos resultados se está elaborando un artículo para someter a evaluación de pares (Bergalli, L.; López-Radenco, A.; Llona, J. D.; Gerona, S.; Moyna, G.; Noceti, O. Título tentativo: "Variations in the ¹H NMR metabolic fingerprints of liver disease patients undergoing liver transplant").

Nuestra atención se centró luego sobre comparaciones de muestras de pacientes con diferentes hepatopatías. Inicialmente se contrastaron los cohortes de pacientes con patologías autoinmunes (AI) o HCV contra voluntarios sanos. Como se aprecia en la Figura 4 de los anexos, donde se presentan gráficos de puntuación del PCA y OPLS-DA entre pacientes y voluntarios sanos, es fácil diferenciar a los cohortes utilizando tanto métodos supervisados como no-supervisados. Es más, las comparaciones de este tipo de hepatopatías contra controles ya han sido reportadas y no brindan información que las pueda hacer competir con otros métodos de diagnóstico empleados actualmente [12,13,16,17]. Sin embargo, las comparaciones par-a-par entre cohortes de diferentes patologías pueden ser de mayor utilidad, tanto como herramienta de diagnóstico diferencial como para lograr un mejor entendimiento de las diferencias a nivel bioquímico [10,13]. Por ende se vienen llevando a cabo estos análisis, incluyendo comparaciones AI vs. HVC, AI vs. hepatocarcinoma (HCC), y HVC vs. HCC, así como entre patologías autoinmunes (HAI vs CBP, HAI vs. CEP/CES, y CBP vs CEP/CES). A modo de ejemplo, en la Figura 5 de los anexos se presenta el gráfico de puntuación del PCA obtenido entre los cohortes de AI y HVC, así como el gráfico de puntuación del modelo OPLS-DA y su gráfico de valores de carga. El PCA muestra un leve agrupamiento de las muestras de ambas cohortes, pero indica una clara tendencia. A pesar de tener una dispersión considerable en ambas variables latentes, el modelo de OPLS-DA fue validado, es predictivo, y separa pacientes según la hepatopatía. Un análisis del gráfico de valores de carga del OPLS-DA permite identificar a un número de metabolitos discriminantes. Por ejemplo, glucosa, fosfocolina, y los aminoácidos glutamina, alanina, y valina se asocian con pacientes con HVC, mientras que fenilalanina, tirosina, glutamato, y los marcadores de estrés metabólico lactato, TMAO, acetoacetato, acetato, β -hidroxibutirato, e isobutirato están correlacionados con aquellos que portan enfermedades AI. Como era esperable, estos resultados reflejan que estas dos patologías afectan rutas metabólicas distintas, y en base a ellos será posible la elaboración de algoritmos de diagnóstico diferencial. Las restantes comparaciones necesitan un mayor análisis de los datos, pero los resultados preliminares son similares. Parte de estos resultados se están preparando para publicación (Bergalli, L.; López-Radenco, A.; Llona, J. D.; Gerona, S.; Moyna, G.; Noceti, O. Título tentativo: "NMR-based metabolomics as a tool for the differential diagnosis of autoimmune and viral liver diseases").

Conclusiones y recomendaciones

En base a lo descrito en las secciones anteriores, el proyecto FMV_1_2019_1_155475 permitió corroborar que el análisis metabólico basado en RMN es una herramienta valiosa en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades hepáticas al alcance de sector salud del país. Por ende, podemos concluir que se logró alcanzar el objetivo general del proyecto. Muchos de los objetivos específicos también se cumplieron a totalidad, incluyendo el desarrollo de modelos estadísticos discriminantes entre condiciones y patologías. Sin embargo, resta llevar a cabo algunas actividades importantes, incluyendo la cuantificación de metabolitos discriminantes, el desarrollo de relaciones paramétricas a partir de ellos que permitan genera algoritmos diagnósticos, la inclusión de metadata en los análisis, y la publicación de resultados. Como se indicó anteriormente, se continúa trabajando para cumplir estos objetivos.

Como toda actividad a nivel mundial, el desarrollo del proyecto se vio seriamente afectado por la pandemia de COVID-19. Dado que muchos de los pacientes del SEH/PNTH padecen condiciones crónicas, las jornadas de recolección de muestras se vieron dilatadas y fragmentadas en el tiempo y resultaron en retrasos de hasta un año y medio. Además, y dados los protocolos de restricción del trabajo presencial en los laboratorios, hubo retrasos en el procesamiento de las muestras y la adquisición de datos de RMN.

También quedó evidenciado que se deberían haber contemplado más recursos humanos para ejecutar algunas de las actividades del proyecto. Esto se subsano parcialmente en 2021 con la incorporación de un ayudante al equipo de trabajo para llevar a cabo tareas técnicas, incluyendo la preparación de muestras y la adquisición de muchos de los perfiles de 1H RMN y espectros JEDI. Actualmente se está reclutando a estudiantes de grado con interés en realizar trabajos de posgrado en la intersección clínica-analítica para sumarse al equipo y profundizar en estudios relacionados.

Para finalizar, cabe destacar que, además de las actividades pendientes descritas previamente, actualmente se continúan recolectando muestras para llevar a cabo estudios con pacientes de la clínica de esteatohepatitis no-alcohólica (NASH). El objetivo de estos será no solo detectar variaciones a nivel metabólico en base a comparaciones entre pacientes con esta condición y voluntarios sanos, sino que identificar marcadores que permitan la estadificación de la enfermedad. Nuestro grupo también aportará los conocimientos adquiridos a la ejecución de otros proyectos, incluyendo un proyecto CSIC Inclusión Social en la segunda etapa de evaluación enfocado a la detección temprana de enfermedad renal crónica (ERC) en pacientes con trasplante de hígado y otras proyectos en el área Salud.

Referencias bibliográficas

1. Yu, M.; Zhu, Y.; Cong, Q.; Wu, C. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2017, 2017, 8467192.
2. Amathieu, R.; Triba, M.N.; Goossens, C.; Bouchemal, N.; Nahon, P.; Savarin, P.; Le Moyec, L. *World J. Gastroenterol.* 2016, 22, 417-426.
3. Embade, N.; Millet, O. *Curr. Top. Med. Chem.* 2017, 17, 2752-2766.
4. Gowda, G.A.; Zhang, S.; Gu, H.; Asiago, V.; Shanaiah, N.; Raftery, D. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2008, 8, 617-633.
5. Pontes, M.; Brasil, M.; Cruz, G.; Souza, R.; Tasic, L. *Anal. Methods.* 2017, 9, 1078-1096.
6. Marshall, D.D.; Powers, R. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2017, 100, 1-16.
7. Nicholson, J.; Lindon, J.; Holmes, E. *Xenobiotica* 1999, 29, 1181-1189.
8. Worley, B.; Powers, R. *Curr. Metabolomics* 2013, 1, 92-107.
9. Bell, L.N.; Wulff, J.; Comerford, M.; Vuppalachchi, R.; Chalasani, N. *Liver Int.* 2014, 35, 263-274.
10. Wang, J.-B.; Pu, S.-B.; Sun, Y.; Li, Z.-F.; Niu, M.; Yan, X.-Z.; Zhao, Y.-L.; Wang, L.-F.; Qin, X.-M.; Ma, Z.-J.; Zhang, Y.-M.; Li, B.-S.; Luo, S.-Q.; Gong, M.; Sun, Y.-Q.; Zou, Z.-S.; Xiao, X.-H. *J. Proteome Res.* 2014, 13, 3792-3801.
11. Araujo, A.M.; Carvalho, M.; Carvalho, F.; Bastos, M.L.; Guedes de Pinho, P. *Crit. Rev. Toxicol.* 2017, 47, 633-649.
12. Munshi, S.U.; Taneja, S.; Bhavesh, N.S.; Shastri, J.; Aggarwal, R.; Jameel, S. *J. Viral Hepatitis* 2011, 18, e591-e602.
13. Hao, J.; Yang, T.; Zhou, Y.; Gao, G.-Y.; Xing, F.; Peng, Y.; Tao, Y.-Y.; Liu, C.-H. *Sci. Rep.* 2017, 7, 784.
14. Kim, J.W.; Ryu, S.H.; Kim, S.; et al. *Anal. Chem.* 2013, 85, 11326-11334.
15. Fukuhara, K.; Ohno, A.; Ando, Y.; Yamoto, T.; Okuda, H. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2011, 26, 399-406.
16. Godoy, M.M.G.; Lopes, E.P.A.; Silva, R. O.; Hallwass, F.; Koury, L.C.A.; Moura, I.M.; Gonçalves, S.M.C.; Simas, A.M.J. *Viral Hepatitis* 2010, 17, 854-858.
17. Embade, N.; Mariño, Z.; Diercks, T.; Cano, A.; Lens, S.; Cabrera, D.; Navasa, M.; Falcón-Pérez, J.M.; Caballería, J.; Castro, A.; Bosch, J.; Mato, J.M.; Millet, O. *PLoS ONE* 2016, 11, e0155094.
18. Trottier, J.; Bialek, A.; Caron, P.; Straka, R.J.; Heathcote, J.; Milkiewicz, P.; Barbier, O. *Dig. Liver Dis.* 2012, 44, 303-310.
19. He, X.; Ji, G.; Jia, W.; Li, H. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 300.
20. Safaei, A.; Oskouie, A.A.; Mohebbi, S.R.; Rezaei-Tavirani, M.; Mahboubi, M.; Peyvandi, M.; Okhovatian, F.; Zamanian-Azodi, M. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench* 2016, 9, 158-173.
21. Amathieu, R.; Nahon, P.; Triba, M.; Bouchemal, N.; Trinchet, J.-C.; Beaugrand, M.; Dhonneur, G.; Le Moyec, L. *Proteome Res.* 2011, 10, 3239-3245.
22. Serkova, N.J.; Zhang, Y.; Coatney, J.L.; Hunter, L.; Wachs, M.E.; Niemann, C.U.; Mandell, M.S. *Transplantation* 2007, 83, 517-521.
23. Tripathi, P.; Bala, L.; Saxena, R.; Yachha, S.K.; Roy, R.; Khetrpal, C.L. *J. Gastrointest. Liver Dis.* 2009, 18, 329-336.
24. Faitot, F.; Besch, C.; Battini, S.; Ruhland, E.; Onea, M.; Addeo, P.; Woehl-Jaeglé, M.-L.; Ellero, B.; Bachellier, P.; Namer, I.-J. *J. Hepatol.* 2018, 68, 699-706.
25. Dona, A.C.; Jiménez, B.; Schäfer, H.; Humpfer, E.; Spraul, M.; Lewis, M. R.; Pearce, J. T.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. *Anal. Chem.* 2014, 86, 9887-9894.
26. Nicholson, J. K.; Foxall, P. J. D.; Spraul, M.; Farrant, R. D.; Lindon, J. C. *Anal. Chem.* 1995, 67, 793-811.
27. Viant, M. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 310, 943-948.
28. Nitschke, P.; Lodge, S.; Kimhofer, T.; Masuda, R.; Bong, S.-H.; Hall, D.; Schäfer, H.; Spraul, M.; Pompe, N.; Diercks, T.; Bernardo-Seisdedos, G.; Mato, J. M.; Millet, O.; Susic, D.; Henry, A.; El-Omar, E. M.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Wist, J. *Anal. Chem.* 2022, 94, 1333-1341.
29. Van Den Berg, R. A.; Hoefsloot, H. C. J.; Westerhuis, J. A.; Smilde, A. K.; Van Der Werf, M. J. *BMC Genomics* 2006, 7, 142.
30. Trygg, J.; Holmes, E.; Lundstedt, T. *J. Proteome Res.* 2006, 6, 469-479.
31. Trygg, J.; Wold, S. *J. Chemometr.* 2002, 16, 119-128.
32. Wold, S.; Esbensen, K. H.; Geladi, P. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 1987, 2, 37-52.
33. Ekelund, S. *Point Care* 2012, 11, 16-21
34. Simundic, A. *Point Care* 2012, 11, 6-8.
35. Ni, N.; Nandi, S.; Kreyssig, A.; Goldman, A. I.; Mun, E. D.; Bud'ko, S. L.; Canfield, P. C. *Phys. Rev. B* 2008, 78, 014523.
36. Cloarec, O.; Dumas, M.; Craig, A. W.; Barton, R.; Trygg, J.; Hudson, J.; Blancher, C.; Gauguier, D.; Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. *Anal. Chem.* 2005, 77, 1282-1289.
37. Hoch, J. C.; Baskaran, K.; Burr, H.; Chin, J.; Eghbalnia, H. R.; Fujiwara, T.; Gryk, M. R.; Iwata, T.; Kojima, C.; Kurisu, G.; Maziuk, D.; Miyanoiri, Y.; Wedell, J. R.; Wilburn, C.; Yao, H.; Yokochi, M. *Nucleic Acids Res.* 2023, 51, D368-D376.

38. Wishart, D. S.; Guo, A.; Oler, E.; Wang, F.; Anjum, A.; Peters, H.; Dizon, R.; Sayeeda, Z.; Tian, S.; Lee, B. L.; Berjanskii, M.; Mah, R.; Yamamoto, M.; Jovel, J.; Torres-Calzada, C.; Hiebert Giesbrecht, M.; Lui, V. W.; Varshavi, D.; Varshavi, D.; Allen, D.; Arndt, D.; Khetarpal, N.; Sivakumaran, A.; Harford, K.; Sanford, S.; Yee, K.; Cao, X.; Budinski, Z.; Liigand, J.; Zhang, L.; Zheng, J.; Mandal, R.; Karu, N.; Dambrova, M.; Schiöth, H. B.; Greiner, R.; Gautam, V. *Nucleic Acids Res.* 2022, 50, D622–D631.
39. Sarmast, N.; Ogola, G. O.; Kouznetsova, M.; Leise, M. D.; Bahirwani, R.; Maiwall, R.; Tapper, E.; Trotter, J.; Bajaj, J. S.; Thacker, L. R.; Tandon, P.; Wong, F.; Reddy, K. R.; O'Leary, J. G.; Masica, A.; Modrykamien, A. M.; Kamath, P. S.; K Asrani, S.K. *Hepatology* 2020, 72, 1747–1757.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional. (CC BY-NC-SA)