

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 438**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/92** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2007 E 07836680 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2057473**

54 Título: **Marcadores de la hepatopatía grasa no alcohólica (NAFLD) y de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**08.08.2006 US 836555 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**26.01.2015**

73 Titular/es:

**METABOLON, INC. (100.0%)  
617 Davis Drive, Suite 400  
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**WATKINS, STEVEN M.;  
WIEST, MICHELLE M. y  
BAILLIE, REBECCA A.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 527 438 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**Marcadores de la hepatopatía grasa no alcohólica (B5: Ⓞ) y de la esteatohepatitis no alcohólica (B5 G<) y métodos de uso de los mismos****Descripción**

5

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) es la hepatopatía crónica más común en los Estados Unidos. La NASH es una inflamación grasa del hígado y una causa importante de cirrosis, fibrosis e insuficiencia hepática. La enfermedad es progresiva, que comienza como una esteatosis o hepatopatía grasa no alcohólica (NAFLD), que evoluciona a hígado graso inflamado (NASH) y que, finalmente, conduce a la cirrosis y a la fibrosis. La enfermedad suele ser asintomática hasta que se produce una insuficiencia hepática grave. El diagnóstico de la NAFLD o NASH requiere biopsia hepática ya que no existen pruebas de laboratorio para ninguna de estas enfermedades. El diagnóstico de la NASH requiere la presencia de grasa, inflamación y balonización centrotubular (zona 3) con fibrosis pericelular o cuerpos de Mallory. Esta distinción es importante porque se cree que la NASH es una hepatopatía progresiva que puede conducir a la cirrosis e incluso al carcinoma hepatocelular.

20 La prevalencia de la NAFLD en la población de Estados Unidos es de ~20%-23%, y puede ser de hasta un 33%, y la prevalencia de la NASH en la población de Estados Unidos es del 2%-3%. Algunos pacientes con NASH evolucionarán a enfermedad en fase avanzada: aproximadamente el 15%-50% de los pacientes con NASH evoluciona a fibrosis grave y aproximadamente el 7%-16% evoluciona a cirrosis. La tasa de mortalidad específica por causa hepática en sujetos cirróticos con NASH es de aproximadamente un 10% por década.

25 El aumento de aminotransferasas séricas y los estudios de imágenes hepáticas que muestran cambios que sugieren hígado graso, no son suficientes por sí solos o en combinación para distinguir la NAFLD de la NASH. Es difícil evaluar la historia natural y el curso de la NAFLD o definir mejor su necesidad de tratamiento o intervención. Las causas de la NAFLD y la NASH no están bien definidas, pero por lo general se producen en asociación con la obesidad, la resistencia a la insulina o la diabetes de tipo II, y la hiperlipidemia, lo que sugiere que el hígado graso y la NASH son manifestaciones hepáticas del síndrome dismetabólico, y sería mejor denominarlas esteatohepatitis metabólica (MESH).

35 El hígado es el órgano metabólico principal para todas las vías metabólicas de los lípidos. En condiciones normales, el hígado regula los niveles de lípidos en sangre y gestiona la compleja biosíntesis de lípidos y transporte en consonancia con el equilibrio energético en el cuerpo. Por lo tanto, la disfunción y el daño hepático pueden conducir a consecuencias graves a nivel orgánico. La NAFLD ha sido vista tradicionalmente como una enfermedad benigna, pero un subgrupo de pacientes evolucionará a NASH y a trastorno hepático en fase terminal que requerirá un trasplante de hígado. Debido a que la NASH es una enfermedad silenciosa, el diagnóstico en la actualidad sólo puede hacerse a través de la biopsia con aguja. Si se reconoce, los métodos de tratamiento para la NAFLD y la NASH pueden retrasar o revertir la enfermedad en algunos individuos, particularmente en la enfermedad en fase temprana.

45 Pawlosky *et al.* (Alcohol, 2004, 34(1):27-33) informan sobre la medición de la concentración de varios ácidos grasos poliinsaturados en los extractos de lípidos totales de los hígados de sujetos con diagnóstico de hepatopatía alcohólica.

50 Araya *et al.* (Clin. Sci., 2004, 106(6):635-43) proporcionan una evaluación de los niveles de PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) en fosfolípidos, triacilgliceroles (triglicéridos) y lípidos totales hepáticos de pacientes con NAFLD con respecto a los de tejido adiposo y los índices hepáticos relacionados con el estrés oxidativo como factores que contribuyen a la esteatosis hepática.

De Azevedo *et al.* (Clin. Nutr., 2002, 21(3):219-23) evaluaron las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres y totales (esterificados más libres) en pacientes con NASH.

55 En el documento WO 2006/031963 se proporcionan métodos de uso de determinados marcadores metabolitos para predecir el desarrollo ponderal, o sus afecciones relacionadas, de un sujeto.

60 Puri *et al.* (Hepatology, 2007, 46(4):1081-1090) comparan el contenido de ácidos grasos libres (FFA), diacilglicerol (DAG), triacilglicerol (TAG), colesterol libre (FC), éster de colesterol y fosfolípidos de hígados normales con los de los pacientes con NAFLD y NASH.

65 Son necesarios mejores métodos de ensayo para el diagnóstico de la NAFLD y NASH, la supervisión de la evolución de la enfermedad y la determinación de la eficacia del tratamiento. Además, son necesarios mejores métodos de ensayo que puedan utilizarse para clasificar y diferenciar entre los pacientes con NAFLD y con NASH, y para identificar a los pacientes que corren el riesgo de pasar de la NAFLD a la NASH.

## BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un método de diagnóstico o supervisión de la hepatopatía grasa no alcohólica (NAFLD) o la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en un paciente humano, que comprende:

- 5 (A) determinar una cantidad de dos o más metabolitos lipídicos en una o más muestras seleccionadas del grupo que consiste en muestras de sangre, plasma y suero; y  
 (B) correlacionar las cantidades de los dos o más metabolitos lipídicos con la presencia de NAFLD o NASH; en el que los metabolitos lipídicos comprenden un par de metabolitos lipídicos seleccionados del grupo que consiste en:

- 10 (i) 15-HETE y 15-ceto-PGF2 $\alpha$ ;  
 (ii) TG18:1n7 y PC20:3n6;  
 (iii) 11-HETE y CE22.6n3;  
 (iv) 11-HETE y PCTL; y  
 15 (v) PC22:6n3 y PC18:3n3; y

en el que los metabolitos lipídicos 15-HETE, TG18:1n7, PC20:3n6 y PC18:3n3 están asociados positivamente con la NAFLD; los metabolitos lipídicos 15-HETE, 15-ceto-PGF2 $\alpha$ , TG18:1n7, PC20:3n6, 11-HETE y PC18:3n3 están asociados positivamente con la NASH; y los metabolitos lipídicos PC22:6n3 y CE22.6n3 están asociados negativamente con la NASH.

20 En algunos aspectos, en el presente documento se describen métodos para evaluar el nivel de acumulación de triglicéridos en el hígado de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) y/o supervisar, diagnosticar, clasificar, evaluar la gravedad, y/o evaluar la evolución o regresión de una hepatopatía en el sujeto. En algunas formas de realización, el trastorno hepático es la insuficiencia hepática, la esteatosis hepática, la hepatopatía grasa no alcohólica (NAFLD), la esteatohepatitis o la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). En algunas formas de realización, los métodos comprenden determinar la cantidad de uno o más metabolitos lipídicos (por ejemplo, ácidos grasos y/o eicosanoides) en un fluido corporal del sujeto.

30 En un aspecto, en el presente documento se describe un método para diagnosticar o supervisar un trastorno hepático en un sujeto en el que el método comprende determinar una cantidad de uno o más metabolitos lipídicos en una o más muestras de un fluido corporal del sujeto, y correlacionar la(s) cantidad(es) del uno o más metabolitos lipídicos con la presencia del trastorno hepático. En algunas formas de realización, los metabolitos lipídicos comprenden ácidos grasos y/o eicosanoides. En algunas formas de realización, el trastorno hepático es la insuficiencia hepática, la esteatosis hepática, la hepatopatía grasa no alcohólica (NAFLD), la esteatohepatitis o la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). En algunas formas de realización, el uno o más metabolitos lipídicos están seleccionados del grupo que consiste en: PC18:3n6; PC20:3n6; CE14:0; CE16:1n7; CE18:1n9; CEMUFA; CEn7; CE18:1n7; CE18:2n6; CE18:3n6; CE22:5n3; CEn6; CEPUFA; PC14:0; PC16:1n7; PC18:1n9; PC18:3n3; PC18:4n3; PC20:0; PC20:1n9; PC20:4n3; PC20:5n3; PC22:0; PC22:1n9; PC24:0; PC24:1n9; PCdm; PCdm18:0; PCdm18:1n7; PCSFA; TG14:0; TG14:1n5; TG16:0; TG16:1n7; TG18:1n7; TGMUFA; TGn7; TG SFA; TL14:0; TL16:0; TL18:0; TL16:1n7; TL18:1n7; TL18:1n9; TL18:3n6; TL18:4n3; TG18:3n3; TG20:3n9; TG22:6n3; TG24:0; CE14:1n5; CE18:0; CE20:0; CE20:1n9; CE20:3n9; CE20:4n3; CE20:4n6; CE20:2n6; CE22:0; CE22:2n6; CE24:0; CESFA; PC20:4n6; PC22:5n6; PCn6; PCPUFA; PE20:4n6; TG15:0; TG18:2n6; TG20:0; TG20:2n6; TG20:4n6; TG20:5n3; TG22:0; TG22:2n6; TG22:1n9; TG22:4n6; TG22:5n6; TG24:1n9; TGn3; TGn6; TGPUFA; TL15:0; TL20:0; TL22:0; TL18:2n6; TL20:2n6; TL20:3n9; TL20:4n3; TL20:4n6; TL22:4n6; TL22:5n6; LY16:0; FA18:1n7; SM18:0; SM22:1n9; SMLC; PGB2; PGE2; PGF2 $\alpha$ ; 15-ceto-PGF2 $\alpha$ ; 5-HETE; 8-HETE; 9-HETE; 11-HETE; 12-HETE; 12-HEPE; 11,12-EpETrE; 8,9-DiHETrE; PC18:0; PC22:5n3; CE20:3n6; CELC; TGLC; TG18:3n6; TG20:4n3; TG20:3n6; TG22:5n3; LYLC; LY18:0; LY20:3n6; PE18:3n6; PE20:3n6; PE22:5n3; FA18:0; FA20:5n3; FA18:1n9; FA20:3n6; 15-HETE; TL20:3n6; PC18:2n6; PC20:2n6; PE20:2n6; SM16:0; PGA2M; 6-ceto-PGF1 $\alpha$ ; 11-DTXB2; 12,13-DIHOME; 9,10-EpOME; 12,13-EpOME; PC22:6n3; PE22:6n3; LY22:6n3; PE14:0; PE18:1n7; PESFA; PELC; FA16:0; CE22:6n3; PCLC; PC18:1n7; LY18:1n9; LY18:2n6; LY18:3n3; y 19,20-DiHDPa. En algunas formas de realización en las que uno o más metabolitos lipídicos comprenden uno o más ácidos grasos, la(s) cantidad(es) del uno o más ácidos grasos es (son) la(s) cantidad(es) relativa(s) de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de una o más clases de lípidos en una o más muestras. Los métodos pueden, en algunas formas de realización, comprender adicionalmente comparar la(s) cantidad(es) del uno o más metabolitos lipídicos con una o más referencias (por ejemplo, un control normal). En algunas formas de realización, se determinan las cantidades de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, o seis o más metabolitos lipídicos. En algunas formas de realización, la(s) muestra(s) está(n) seleccionada(s) del grupo que consiste en sangre, plasma, suero, fracción de lipoproteína aislada, saliva, orina, líquido linfático y líquido cefalorraquídeo.

60 En el presente documento también se describe un método para diagnosticar o supervisar un trastorno hepático en un sujeto, que comprende determinar una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de una o más clases de lípidos en una muestra de un fluido corporal del sujeto, y correlacionar la cantidad(es) relativa(s) con la presencia del trastorno hepático; en el que el trastorno hepático es la insuficiencia hepática, la esteatosis hepática, la hepatopatía grasa no alcohólica (NAFLD), la esteatohepatitis o la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). En algunas formas de realización, el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en: PC18:3n6; PC20:3n6; CE14:0; CE16:1n7; CE18:1n9;

CEMUFA; CEn7; CE18:1n7; CE18:2n6; CE18:3n6; CE22:5n3; CEn6; CEPUFA; PC14:0; PC16:1n7; PC18:1n9; PC18:3n3; PC18:4n3; PC20:0; PC20:1n9; PC20:4n3; PC20:5n3; PC22:0; PC22:1n9; PC24:0; PC24:1n9; PCdm; PCdm18:0; PCdm18:1n7; PCSFA; TG14:0; TG14:1n5; TG16:0; TG16:1n7; TG18:1n7; TGMUFA; TGn7; TGSFA; TL14:0; TL16:0; TL18:0; TL16:1n7; TL18:1n7; TL18:1n9; TL18:3n6; TL18:4n3; TG18:3n3; TG20:3n9; TG22:6n3; TG24:0; CE14:1n5; CE18:0; CE20:0; CE20:1n9; CE20:3n9; CE20:4n3; CE20:4n6; CE20:2n6; CE22:0; CE22:2n6; CE24:0; CESFA; PC20:4n6; PC22:5n6; PCn6; PCPUFA; PE20:4n6; TG15:0; TG18:2n6; TG20:0; TG20:2n6; TG20:4n6; TG20:5n3; TG22:0; TG22:2n6; TG22:1n9; TG22:4n6; TG22:5n6; TG24:1n9; TGn3; TGn6; TGPUFA; TL15:0; TL20:0; TL22:0; TL18:2n6; TL20:2n6; TL20:3n9; TL20:4n3; TL20:4n6; TL22:4n6; y TL22:5n6. En algunas formas de realización, el método comprende la etapa de comparar la cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con una referencia. En algunas formas de realización, el trastorno hepático es la NASH, y el método comprende adicionalmente la etapa de determinar el nivel de un eicosanoide en un fluido corporal. En algunas formas de realización, se determinan las cantidades relativas de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, o seis o más ácidos grasos. En algunas formas de realización, la muestra está seleccionada del grupo que consiste en sangre, plasma, suero, fracción de lipoproteína aislada, saliva, orina, líquido linfático y líquido cefalorraquídeo.

En el presente documento también se describe un método para evaluar el nivel de triglicéridos en el hígado de un sujeto, que comprende determinar la cantidad de un metabolito lipídico en una muestra de un fluido corporal del sujeto, en el que el metabolito lipídico es un ácido graso presente en una clase de lípidos, y en el que la clase de lípidos está seleccionada del grupo que consiste en ácidos grasos libres, ácidos grasos totales, triglicéridos, ésteres de colesterol, fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas. En algunas formas de realización, la cantidad del metabolito es la cantidad relativa del ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de una o más clases de lípidos de la muestra. En algunas formas de realización, el ácido graso está seleccionado del grupo que consiste en: PC18:3n6; PC20:3n6; CE14:0; CE16:1n7; CE18:1n9; CEMUFA; CEn7; CE18:1n7; CE18:2n6; CE18:3n6; CE22:5n3; CEn6; CEPUFA; PC14:0; PC16:1n7; PC18:1n9; PC18:3n3; PC18:4n3; PC20:0; PC20:1n9; PC20:4n3; PC20:5n3; PC22:0; PC22:1n9; PC24:0; PC24:1n9; PCdm; PCdm18:0; PCdm18:1n7; PCSFA; TG14:0; TG14:1n5; TG16:0; TG16:1n7; TG18:1n7; TGMUFA; TGn7; TGSFA; TL14:0; TL16:0; TL18:0; TL16:1n7; TL18:1n7; TL18:1n9; TL18:3n6; TL18:4n3; CE14:1n5; CE18:0; CE20:0; CE20:1n9; CE20:3n9; CE20:4n3; CE20:4n6; CE20:2n6; CE22:0; CE22:2n6; CE24:0; CESFA; PC20:4n6; PC22:5n6; PCn6; PCPUFA; PE20:4n6; TG15:0; TG18:2n6; TG20:0; TG20:2n6; TG20:4n6; TG20:5n3; TG22:0; TG22:2n6; TG22:1n9; TG22:4n6; TG22:5n6; TG24:1n9; TGn3; TGn6; TGPUFA; TL15:0; TL20:0; TL22:0; TL18:2n6; TL20:2n6; TL20:3n9; TL20:4n3; TL20:4n6; TL22:4n6; y TL22:5n6. En algunas formas de realización, el método comprende adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con una referencia. En algunas formas de realización, la muestra está seleccionada del grupo que consiste en sangre, plasma, suero, fracción de lipoproteína aislada, saliva, orina, líquido linfático y líquido cefalorraquídeo.

En el presente documento también se describen métodos para evaluar el nivel de triglicéridos en el hígado de un sujeto, que comprenden determinar la cantidad de un metabolito lipídico en una muestra de un fluido corporal del sujeto. En algunas formas de realización, el método comprende determinar la cantidad de al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 15 o al menos 20 metabolitos lipídicos. En algunas formas de realización, el metabolito lipídico es un ácido graso presente en una clase de lípidos. En algunas formas de realización, la clase de lípidos está seleccionada del grupo que consiste en: ácidos grasos libres, ácidos grasos totales, triglicéridos, ésteres de colesterol, fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas. En algunas formas de realización, la clase de lípidos está seleccionada del grupo que consiste en: lípidos neutros, ácidos grasos libres, ácidos grasos totales, triglicéridos, ésteres de colesterol, fosfolípidos, fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas. En algunas formas de realización, la clase de lípidos está seleccionada del grupo que consiste en: lípidos neutros, ácidos grasos totales, ésteres de colesterol y fosfolípidos. En algunas formas de realización, la cantidad del metabolito es la cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de una o más clases de lípidos de la muestra. En algunas formas de realización, la cantidad relativa está seleccionada del grupo que consiste en: (a) la cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en los triglicéridos de la muestra; (b) la cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en los ácidos grasos libres de la muestra; (c) la cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en las fosfatidilcolinas de la muestra; (d) la cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en las fosfatidiletanolaminas de la muestra; (e) la cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en los ésteres de colesterol de la muestra; y (f) la cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en todos los lípidos de la muestra. En algunas formas de realización, el ácido graso está seleccionado del grupo que consiste en: TG14:0, TG14:1n5, TG16:0, TG18:1n7, TGMUFA, TGn7, TGSFA, TG16:1n7, PC14:0, PC16:1n7, PC18:1n7, PC18:1n9, PC18:3n3, PC18:3n6, PC18:4n3, PC20:0, PC20:1n9, PC20:2n6, PC20:3n6, PC20:4n3, PC20:5n3, PC22:0, PC22:1n9, PC24:0, PC24:1n9, PCdm, PCdm18:0, PCdm18:1n7, PCSFA, CE16:1n7, CE18:1n7, CE18:1n9, CE18:2n6, CE18:3n6, CE22:5n3, CE22:6n3, CEMUFA, CEn6, CEn7, CEPUFA, CE14:0, 14:0, 16:0, 18:0, 16:1n7, 18:1n7, 18:1n9, 18:3n6, 18:4n3, TG15:0, TG18:2n6, TG18:3n3, TG20:0, TG20:2n6, TG20:3n6, TG20:3n9, TG20:4n6, TG20:5n3, TG22:0, TG22:1n9, TG22:2n6, TG22:4n6, TG22:5n3, TG22:5n6, TG22:6n3, TG24:0, TG24:1n9, TGn3, TGn6, TGPUFA, FA16:1n7, PC18:1n7, PC20:4n6, PC22:5n6, PCn6, PCPUFA, PC22:5n3, PE20:4n6, CE14:1n5, CE18:0, CE20:0, CE20:1n9, CE20:2n6, CE20:3n9, CE20:4n3, CE20:4n6, CE22:0, CE22:2n6, CE24:0, CESFA, 15:0, 20:0, 22:0, 18:2n6, 20:2n6, 20:3n9, 20:4n3, 20:4n6, 22:4n6 y 22:5n6. En algunas formas de realización, el ácido graso es TG20:4n6. En algunas formas de realización, la muestra está seleccionada del grupo que consiste en sangre,

plasma, suero, fracción de lipoproteína aislada, saliva, orina, líquido linfático y líquido cefalorraquídeo. En algunas formas de realización, la muestra está seleccionada del grupo que consiste en sangre, plasma, suero o fracción de lipoproteína aislada. En algunas formas de realización, la muestra es líquido linfático o cefalorraquídeo.

5 En algunas formas de realización, se evalúa el nivel de acumulación de triglicéridos en el hígado de un sujeto, que comprende determinar una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los triglicéridos en una muestra de un fluido corporal del sujeto. En algunas formas de realización, el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en TG14:0, TG14:1n5, TG16:0, TG18:1n7, TGMUFA, TGn7, TGSFA y TG16:1n7. El método puede comprender adicionalmente la etapa de  
10 comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es superior a la referencia, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en TG15:0, TG18:2n6, TG18:3n3, TG20:0, TG20:2n6, TG20:3n6, TG20:3n9, TG20:4n6, TG20:5n3, TG22:0, TG22:1n9, TG22:2n6, TG22:4n6, TG22:5n3, TG22:5n6, TG22:6n3, TG24:0, TG24:1n9, TGn3, TGn6 y TGPUFA. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la  
15 cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es inferior a la referencia, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, la referencia es una cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los triglicéridos en una muestra de un fluido corporal obtenida previamente del sujeto. En algunas formas de realización, la referencia representa la cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los triglicéridos que se encuentran en una o más muestras de un fluido corporal de uno o más sujetos con hígados normales.

25 En algunas formas de realización, se evalúa el nivel de acumulación de triglicéridos en el hígado de un sujeto, que comprende determinar una cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en los ácidos grasos libres en una muestra de un fluido corporal del sujeto. En algunas formas de realización, el ácido graso es FA16:1n7. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es inferior a la referencia, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, la referencia es una cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los ácidos grasos libres en una muestra de un fluido corporal obtenida previamente del sujeto. En algunas formas de realización, la referencia representa la  
30 cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los ácidos grasos libres que se encuentran en una o más muestras de un fluido corporal de uno o más sujetos con hígados normales.

35 En algunas formas de realización, se evalúa el nivel de acumulación de triglicéridos en el hígado de un sujeto, que comprende determinar una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en las fosfatidilcolinas en una muestra de un fluido corporal del sujeto. En algunas formas de realización, el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en PC14:0, PC16:1n7, PC18:1n7, PC18:1n9, PC18:3n3, PC18:3n6, PC18:4n3, PC20:0, PC20:1n9, PC20:2n6, PC20:3n6, PC20:4n3, PC20:5n3, PC22:0, PC22:1n9, PC24:0, PC24:1n9, PCdm, PCdm18:0, PCdm18:1n7 y PCSFA. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad  
40 relativa es superior a la referencia, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en PC18:1n7, PC20:4n6, PC22:5n6, PCn6, PCPUFA y PC22:5n3. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es inferior a la referencia, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, la referencia es una cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en las fosfatidilcolinas en una muestra de un fluido corporal obtenida previamente del sujeto. En algunas formas de realización, la referencia representa la  
45 cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en las fosfatidilcolinas que se encuentran en una o más muestras de un fluido corporal de uno o más sujetos con hígados normales.

50 En algunas formas de realización, se evalúa el nivel de acumulación de triglicéridos en el hígado de un sujeto, que comprende determinar una cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en las fosfatidiletanolaminas en una muestra de un fluido corporal del sujeto. En algunas formas de realización, el ácido graso es PE20:4n6. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es inferior a la referencia, hay indicio de  
55 acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, la referencia es una cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en las fosfatidiletanolaminas en una muestra de un fluido corporal obtenida previamente del sujeto. En algunas formas de realización, la referencia representa la cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en las fosfatidiletanolaminas que se encuentran en una o más muestras de un fluido corporal de uno o más sujetos con hígados normales.

60 En algunas formas de realización, se evalúa el nivel de acumulación de triglicéridos en el hígado de un sujeto, que comprende determinar una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en una muestra de un fluido corporal del sujeto. En algunas formas de realización, el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en 14:0, 16:0, 18:0, 16:1n7, 18:1n7, 18:1n9, 18:3n6 y 18:4n3. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia,

en el que si la cantidad relativa es superior a la referencia, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en 15:0, 20:0, 22:0, 18:2n6, 20:2n6, 20:3n9, 20:4n3, 20:4n6, 22:4n6 y 22:5n6. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es inferior a la referencia, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, la referencia es una cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en una muestra de un fluido corporal obtenida previamente del sujeto. En algunas formas de realización, la referencia representa la cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos encontrados en una o más muestras de un fluido corporal de uno o más sujetos con hígados normales.

En algunas formas de realización, se evalúa el nivel de acumulación de triglicéridos en el hígado de un sujeto, que comprende determinar una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los ésteres de colesterol en una muestra de un fluido corporal del sujeto. En algunas formas de realización, el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en CE16:1n7, CE18:1n7, CE18:1n9, CE18:2n6, CE18:3n6, CE22:5n3, CE22:6n3, CEMUFA, CEn6, CEn7, CEPUFA, CE14:0. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es superior a la referencia, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en CE14:1n5, CE18:0, CE20:0, CE20:1n9, CE20:2n6, CE20:3n9, CE20:4n3, CE20:4n6, CE22:0, CE22:2n6, CE24:0 y CESFA. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es inferior a la referencia, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, la referencia es una cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los ésteres de colesterol en una muestra de un fluido corporal obtenida previamente del sujeto. En algunas formas de realización, la referencia representa la cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los ésteres de colesterol que se encuentran en una o más muestras de un fluido corporal de uno o más sujetos con hígados normales.

En algunas formas de realización, se evalúa el nivel de acumulación de triglicéridos en el hígado de un sujeto, que comprende determinar una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos neutros en una muestra de un fluido corporal del sujeto. En algunas formas de realización, el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en TG14:0, TG14:1n5, TG16:0, TG18:1n7, TGMUFA, TGn7, TGSFA y TG16:1n7. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es superior a la referencia, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en TG15:0, TG18:2n6, TG18:3n3, TG20:0, TG20:2n6, TG20:3n6, TG20:3n9, TG20:4n6, TG20:5n3, TG22:0, TG22:1n9, TG22:2n6, TG22:4n6, TG22:5n3, TG22:5n6, TG22:6n3, TG24:0, TG24:1n9, TGn3, TGn6, TGPUFA y FA16:1n7. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es inferior a la referencia, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, la referencia es una cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos neutros en una muestra de un fluido corporal obtenida previamente del sujeto. En algunas formas de realización, la referencia representa la cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos neutros que se encuentran en una o más muestras de un fluido corporal de uno o más sujetos con hígados normales.

En algunas formas de realización, se evalúa el nivel de acumulación de triglicéridos en el hígado de un sujeto, que comprende determinar una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los fosfolípidos en una muestra de un fluido corporal del sujeto. En algunas formas de realización, el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en PC14:0, PC16:1n7, PC18:1n7, PC18:1n9, PC18:3n3, PC18:3n6, PC18:4n3, PC20:0, PC20:1n9, PC20:2n6, PC20:3n6, PC20:4n3, PC20:5n3, PC22:0, PC22:1n9, PC24:0, PC24:1n9, PCdm, PCdm 18:0, PCdm 18:1n7 y PCSFA. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es superior a la referencia, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en PC18:1n7, PC20:4n6, PC22:5n6, PCn6, PCPUFA, PC22:5n3 y PE20:4n6. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es inferior a la referencia, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, la referencia es una cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los fosfolípidos en una muestra de un fluido corporal obtenida previamente del sujeto. En algunas formas de realización, la referencia representa la cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los fosfolípidos que se encuentran en una o más muestras de un fluido corporal de uno o más sujetos con hígados normales.

En algunas formas de realización, el método comprende adicionalmente determinar al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10 o al menos 20 cantidades relativas adicionales, en el que la(s) cantidad(es) relativa(s) es(son) la(s) cantidad(es) relativa(s) de un ácido graso con respecto al contenido total de

ácidos grasos en los lípidos de una o más clases de lípidos de la muestra. En algunas formas de realización, el método comprende adicionalmente determinar una cantidad relativa adicional, en el que la cantidad relativa adicional está seleccionada del grupo que consiste en: (a) la cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en los triglicéridos de la muestra; (b) la cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en los ácidos grasos libres de la muestra; (c) la cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en las fosfatidilcolinas de la muestra; (d) la cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en las fosfatidiletanolaminas de la muestra; (e) la cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en los ésteres de colesterol de la muestra; y (f) la cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en todos los lípidos de la muestra. En algunas formas de realización, la cantidad relativa adicional está seleccionada del grupo que consiste en: (a) una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los triglicéridos en una muestra de un fluido corporal del sujeto, en el que el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en TG14:0, TG14:4n5, TG16:0, TG18:1n7, TGMUFA, TGn7, TGSFA y TG16:1n7; (b) una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en las fosfatidilcolinas en una muestra de un fluido corporal del sujeto, en el que el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en PC14:0, PC16:1n7, PC18:1n7, PC18:1n9, PC18:3n3, PC18:3n6, PC18:4n3, PC20:0, PC20:1n9, PC20:2n6, PC20:3n6, PC20:4n3, PC20:5n3, PC22:0, PC22:1n9, PC24:0, PC24:1n9, PCdm, PCdm18:0, PCdm18:1n7 y PCSFA; (c) una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los ésteres de colesterol en una muestra de un fluido corporal del sujeto, en el que el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en CE16:1n7, CE18:1n7, CE18:1n9, CE18:2n6, CE18:3n6, CE22:5n3, CE22:6n3, CEMUFA, CEn6, CEn7, CEPUFA, CE14:0; y (d) una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en una muestra de un fluido corporal del sujeto, en el que el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en 14:0, 16:0, 18:0, 16:1n7, 18:1n7, 18:1n9, 18:3n6 y 18:4n3. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa adicional con una referencia adicional, en el que si la cantidad relativa adicional es superior a la referencia adicional, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, la cantidad relativa adicional está seleccionada del grupo que consiste en: (a) una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los triglicéridos en una muestra de un fluido corporal del sujeto, en el que el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en TG15:0, TG18:2n6, TG18:3n3, TG20:0, TG20:2n6, TG20:3n6, TG20:3n9, TG20:4n6, TG20:5n3, TG22:0, TG22:1n9, TG22:2n6, TG22:4n6, TG22:5n3, TG22:5n6, TG22:6n3, TG24:0, TG24:1n9, TGn3, TGn6 y TGPUFA; (b) una cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos de los ácidos grasos libres en una muestra de un fluido corporal del sujeto, en el que el ácido graso es FA16:1n7; (c) una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en las fosfatidilcolinas en una muestra de un fluido corporal del sujeto, en el que el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en PC18:1n7, PC20:4n6, PC22:5n6, PCn6, PCPUFA y PC22:5n3; (d) una cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en las fosfatidiletanolaminas en una muestra de un fluido corporal del sujeto, en el que el ácido graso es PE20:4n6; y (e) una cantidad relativa de un ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en los ésteres de colesterol en una muestra de un fluido corporal del sujeto, en el que el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en CE14:1n5, CE18:0, CE20:0, CE20:1n9, CE20:2n6, CE20:3n9, CE20:4n3, CE20:4n6, CE22:0, CE22:2n6, CE24:0, CESFA; y (f) una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en una muestra de un fluido corporal del sujeto, en el que el uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en 15:0, 20:0, 22:0, 18:2n6, 20:2n6, 20:3n9, 20:4n3, 20:4n6, 22:4n6 y 22:5n6. El método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa adicional con una referencia, en el que si la cantidad relativa es inferior a la referencia, hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado.

Pueden utilizarse métodos para evaluar el nivel de triglicéridos en el hígado de un sujeto en el diagnóstico, el seguimiento, la evaluación de la gravedad y/o la evaluación de la evolución o regresión de un trastorno hepático, en el que el trastorno hepático está seleccionado del grupo que consiste en: insuficiencia hepática, esteatosis hepática, NAFLD, esteatohepatitis y NASH. En algunas formas de realización, el método de diagnóstico de un trastorno hepático en un sujeto comprende (a) determinar una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de una o más clases de lípidos en una muestra de un fluido corporal del sujeto; (b) correlacionar la cantidad relativa con la presencia del trastorno hepático; y en el que el trastorno hepático es la insuficiencia hepática, la esteatosis hepática, la NAFLD, la esteatohepatitis o la NASH. En algunas formas de realización, el método de evaluación de la gravedad de un trastorno hepático en un sujeto comprende (a) determinar una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de una o más clases de lípidos en una muestra de un fluido corporal del sujeto; (b) correlacionar la cantidad relativa con la gravedad del trastorno hepático; y en el que el trastorno hepático es la insuficiencia hepática, la esteatosis hepática, la NAFLD, la esteatohepatitis o la NASH. En algunas formas de realización, el procedimiento de supervisión de un trastorno hepático en un sujeto comprende (a) determinar una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de una o más clases de lípidos en una muestra de un fluido corporal del sujeto; (b) correlacionar la cantidad relativa con el estado del trastorno hepático; y en el que el trastorno hepático es la insuficiencia hepática, la esteatosis hepática, la NAFLD, la esteatohepatitis o la NASH. En algunas formas de realización, el método de evaluación de la evolución o regresión de un trastorno hepático en un sujeto comprende (a) determinar una cantidad relativa de uno o más ácidos

grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de una o más clases de lípidos en una muestra de un fluido corporal del sujeto; (b) correlacionar la cantidad relativa con el estado del trastorno hepático; y en el que el trastorno hepático es la insuficiencia hepática, la esteatosis hepática, la NAFLD, la esteatohepatitis o la NASH. En algunas formas de realización, la cantidad relativa se mide en dos o más instantes de tiempo. En algunas formas de realización, el método de supervisión, evaluación de la gravedad o evaluación de la evolución o regresión del trastorno hepático se utiliza para determinar la respuesta del sujeto al tratamiento. En algunas formas de realización, el método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es superior a la referencia, hay indicio de insuficiencia hepática, esteatosis hepática, NAFLD, esteatohepatitis o NASH. En algunas formas de realización, el método puede comprender la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es inferior a la referencia, hay indicio de insuficiencia hepática, esteatosis hepática, NAFLD, esteatohepatitis o NASH. En algunas formas de realización, el método puede comprender adicionalmente la etapa de determinar una cantidad relativa adicional de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de una o más clases de lípidos en una muestra de un fluido corporal del sujeto. En algunas formas de realización, el trastorno hepático está asociado con una o más afecciones seleccionadas del grupo que consiste en: hepatitis, infección por VIH, infección por VHB, infección por VHC, esteatosis inducida por virus y esteatosis inducida por un agente infeccioso no viral. En algunas formas de realización, el trastorno hepático está asociado con la esteatosis de origen medicamentoso. En algunas formas de realización, la esteatosis de origen medicamentoso es inducida por tamoxifeno, un inhibidor de la proteína desacopladora, isoniazida, rifampicina, un fibrato, o un agonista del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR). En algunas formas de realización, el trastorno hepático está asociado con una o más afecciones seleccionadas del grupo que consiste en: obesidad, síndrome de ovario poliquístico (PCOS), diabetes, resistencia a la insulina y trastorno metabólico. En algunas formas de realización, el trastorno hepático está asociado con una o más afecciones seleccionadas del grupo que consiste en: hepatopatía grasa alcohólica y esteatohepatitis alcohólica. En algunas formas de realización, el trastorno hepático está asociado con una enzimopatía congénita o una alteración genética. En algunas formas de realización, la enzimopatía congénita o la alteración genética está seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de citrina, hemocromatosis e hiperferritinemia. En algunas formas de realización, el trastorno hepático está asociado con la esteatosis inducida por toxinas o la esteatohepatitis inducida por toxinas. En algunas formas de realización, la esteatosis inducida por toxinas o la esteatohepatitis inducida por toxinas es inducida por tetracloruro de carbono. En algunas formas de realización, el trastorno hepático está asociado con una o más afecciones seleccionadas del grupo que consiste en: malnutrición, malabsorción de nutrientes, enfermedad celíaca y lipodistrofia. En algunas formas de realización, el trastorno hepático está asociado con la cirugía bariátrica o un trasplante de hígado.

Pueden utilizarse biomarcadores y exámenes adicionales en los métodos de diagnóstico, seguimiento, evaluación de la gravedad y para evaluar la evolución o regresión del trastorno hepático. En algunas formas de realización, el método comprende adicionalmente: (c) determinar el nivel de malonil-CoA o malonil carnitina en un fluido corporal o muestra de células del sujeto, en el que un nivel más alto de lo normal es un indicio de esteatosis, NAFLD o NASH; (d) determinar el nivel de una acilcarnitina, carnitina libre o butirobetaína en un fluido corporal o muestra de células del sujeto, en el que nivel más bajo de lo normal es un indicio de insuficiencia hepática, esteatosis hepática, NAFLD, esteatohepatitis o NASH; y/o (e) determinar el nivel de un esteroide o ácido biliar en un fluido corporal o muestra de células del sujeto, en el que un nivel superior al normal es un indicio de insuficiencia hepática, esteatosis hepática, NAFLD, esteatohepatitis o NASH. En algunas formas de realización, la acilcarnitina es una acilcarnitina de la Tabla 3. En algunas formas de realización, el esteroide o ácido biliar es un esteroide o ácido biliar de la Tabla 4. En algunas formas de realización, el método comprende adicionalmente la etapa de determinar el nivel de un eicosanoide en un fluido corporal o muestra de células del sujeto, en el que un nivel más alto de lo normal es un indicio de NASH. En algunas formas de realización, el eicosanoide es un eicosanoide de la Tabla 2. En algunas formas de realización, el método comprende adicionalmente la etapa de determinar el nivel de una citocina, citoqueratina, quimiocina, adipocina o leptina en un fluido corporal o muestra de células del sujeto. En algunas formas de realización, la citocina, citoqueratina, quimiocina, adipocina o leptina es TNF, IL-6, CCL2/MCP-1 o CCL19, y un nivel más alto de lo normal es un indicio de NASH. En algunas formas de realización, la citocina o citoqueratina es IL-8, IL-18, citoqueratina 8 o citoqueratina 18, y un nivel más bajo de lo normal es un indicio de NASH. En algunas formas de realización, el método comprende adicionalmente la etapa de (a) realizar un examen físico del sujeto; (b) medir el nivel de una aminotransferasa en la sangre del sujeto; u (c) obtener una imagen del hígado del sujeto.

En algunas formas de realización de cada uno de los aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos descritos en el presente documento, el sujeto es un mamífero, tal como un ser humano. En algunas formas de realización, el mamífero es un primate.

En algunas formas de realización de cada uno de los aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos descritos en el presente documento, el sujeto es un candidato a donante de injerto hepático, está siendo evaluado para una cirugía bariátrica, se ha sometido a una cirugía bariátrica o está siendo supervisando para bajar de peso.

En el presente documento también se describen kits para su uso en los métodos de la invención. En algunas formas de realización, el kit comprende (a) un anticuerpo contra el marcador (por ejemplo, ácido graso o

eicosanoide); y (b) instrucciones de uso. En algunas formas de realización, el kit comprende adicionalmente: (c) un segundo anticuerpo contra un segundo marcador (por ejemplo, ácido graso o eicosanoide). En algunas formas de realización, el kit comprende adicionalmente: (d) un tercer anticuerpo contra un tercer marcador (por ejemplo, ácido graso o eicosanoide).

5 Cuando en el presente documento se describen aspectos o formas de realización de la descripción en términos de un grupo de Markush u otra agrupación de alternativas, la presente descripción abarca no sólo todo el grupo que aparece en su conjunto, sino cada miembro del grupo individualmente y todos los posibles subgrupos del grupo principal, pero también el grupo principal en ausencia de uno o más de los miembros del grupo. La presente descripción también contempla la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo de la descripción.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 La FIG. 1 muestra que un metabolito lipídico que es una proporción relativa (mostrado en gris más oscuro) de un triglicérido (o cualquier otra clase de lípido) puede medirse, por ejemplo, en suero o plasma, como una medida cuantitativa de la proporción relativa de ese metabolito lipídico en los triglicéridos hepáticos.

20 La FIG. 2 muestra la correlación de la composición de ácidos grasos de las clases de lípidos en plasma y en hígado emparejadas de sujetos normales.

25 La FIG. 3 muestra la relación entre las concentraciones de triglicérido hepático (nmoles/g) y la proporción relativa de lípido 20:4n6 en los triglicéridos hepáticos (expresado como porcentaje en moles de ácidos grasos totales de los triglicéridos).

La FIG. 4 muestra la curva de eficacia diagnóstica (ROC) para el TG20:4n6 en hígado.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 En algunos aspectos, la invención proporciona métodos de ensayo que pueden utilizarse para diagnosticar, clasificar y/o supervisar a los pacientes con trastornos hepáticos asociados con niveles elevados de triglicéridos en hígado seleccionados de entre NAFLD y NASH, y para identificar a los pacientes que corren el riesgo de pasar de esteatosis o NAFLD a esteatohepatitis o NASH.

35 Los niveles de triglicéridos hepáticos determinan la gravedad de la esteatosis. Debido a que la acumulación de triglicéridos en hígado (esteatosis) es el resultado de la inadecuada exportación de triglicéridos fuera del hígado a través de la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), la cantidad absoluta de triglicéridos en plasma no es una medida coherente de la magnitud de la esteatosis. Los inventores han descubierto que cantidades concretas de metabolitos lipídicos en los fluidos corporales se correlacionan con los niveles de triglicéridos en hígado, independiente del flujo absoluto de triglicéridos desde el hígado al plasma.

40 Con respecto a la nomenclatura para los metabolitos lipídicos ácidos grasos utilizados en el presente documento, los ácidos grasos marcados con un prefijo "CE", "DG", "FA", "LY", "PC", "PE", "SM", "TG" o "TL" se refieren a los ácidos grasos indicados presentes dentro de los ésteres de colesterol, diglicéridos, ácidos grasos libres, lisofosfatidilcolinas, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, esfingomielinas, triglicéridos y lípidos totales, respectivamente, en una muestra. En algunas formas de realización, los componentes ácidos grasos indicados se cuantifican como una proporción del total de ácidos grasos dentro de la clase de lípidos indicada por el prefijo. El prefijo "SP" se utiliza en el presente documento de forma intercambiable con "SM" para los ácidos grasos en las esfingomielinas de una muestra. Las referencias a ácidos grasos sin un prefijo u otra indicación de una clase concreta de lípidos, generalmente indican los ácidos grasos presentes en los lípidos totales de una muestra. El término "LC" después de un prefijo "CE", "DG", "FA", "LY", "PC", "PE", "SM", "TG" o "TL" se refiere a la cantidad total de la clase de lípidos indicada por el prefijo en la muestra (por ejemplo, la concentración de lípidos de esa clase expresada como nmoles por gramo de suero o plasma). Por ejemplo, con respecto a una medición tomada a partir de plasma o suero, en algunas formas de realización, la abreviatura "PC18:2n6" indica el porcentaje fosfatidilcolina en plasma o suero compuesta por ácido linoleico (18:2n6), y el término "TGLC" indica la cantidad absoluta (por ejemplo, en nmoles por gramo) de triglicérido presente en plasma o suero.

60 En algunas formas de realización, el trastorno hepático es la esteatosis y/o la NAFLD y el uno o más metabolitos lipídicos están seleccionados del grupo que consiste en: PC18:3n6; PC20:3n6; CE14:0; CE16:1n7; CE18:1n9; CEMUFA; CEn7; CE18:1n7; CE18:2n6; CE18:3n6; CE22:5n3; CEn6; CEPUFA; PC14:0; PC16:1n7; PC18:1n9; PC18:3n3; PC18:4n3; PC20:0; PC20:1n9; PC20:4n3; PC20:5n3; PC22:0; PC22:1n9; PC24:0; PC24:1n9; PCdm; PCdm18:0; PCdm18:1n7; PCSFA; TG14:0; TG14:1n5; TG16:0; TG16:1n7; TG18:1n7; TGMUFA; TGn7; TGSFA; TL14:0; TL16:0; TL18:0; TL16:1n7; TL18:1n7; TL18:1n9; TL18:3n6; TL18:4n3; PC18:0; PC22:5n3; CE20:3n6; CELC; TGLC; TG18:3n6; TG20:4n3; TG20:3n6; TG22:5n3; LY18:0; LY20:3n6; PE18:3n6; PE20:3n6; PE22:5n3; FA18:0; FA20:5n3; FA18:1n9; FA20:3n6; 15-HETE; TL20:3n6; CE14:1n5; CE18:0; CE20:0; CE20:1n9; CE20:3n9; CE20:4n3; CE20:4n6; CE20:2n6; CE22:0; CE22:2n6; CE24:0; CESFA; PC20:4n6; PC22:5n6;

PCn6; PCPUFA; PE20:4n6; TG15:0; TG18:2n6; TG20:0; TG20:2n6; TG20:4n6; TG20:5n3; TG22:0; TG22:2n6; TG22:1n9; TG22:4n6; TG22:5n6; TG24:1n9; TGn3; TGn6; TGPUFA; TL15:0; TL20:0; TL22:0; TL18:2n6; TL20:2n6; TL20:3n9; TL20:4n3; TL20:4n6; TL22:4n6; TL22:5n6; PC18:2n6; PC20:2n6; PE20:2n6; SM16:0; PGA2M; 6-ceto-PGF1 $\alpha$ ; 11-DTXB2; 12,13-DiHOME; 9,10-EpOME; 12,13-EpOME; PCLC; PC18:1n7; LY18:1n7; LY18:1n9; LY18:2n6; LY18:3n3; y 19,20-DiHDDPA. En algunas formas de realización, (a) los metabolitos lipídicos PC18:3n6, PC20:3n6, CE14:0, CE16:1n7, CE18:1n9, CEMUFA, CEn7, CE18:1n7, CE18:2n6, CE18:3n6, CE22:5n3, CEn6, CEPUFA, PC14:0, PC16:1n7, PC18:1n9, PC18:3n3, PC18:4n3, PC20:0, PC20:1n9, PC20:4n3, PC20:5n3, PC22:0, PC22:1n9, PC24:0, PC24:1n9, PCdm, PCdm18:0, PCdm18:1n7, PCSFA, TG14:0, TG14:1n5, TG16:0, TG16:1n7, TG18:1n7, TGMUFA, TGn7, TGSFA, TL14:0, TL16:0, TL18:0, TL16:1n7, TL18:1n7, TL18:1n9, TL18:3n6, TL18:4n3, PC18:0, PC22:5n3, CE20:3n6, CELC, TGLC, TG18:3n6, TG20:4n3, TG20:3n6, TG22:5n3, LYLC, LY18:0, LY20:3n6, PE18:3n6, PE20:3n6, PE22:5n3, FA18:0, FA20:5n3, FA18:1n9, FA20:3n6, 15-HETE y/o TL20:3n6 están asociados positivamente con la esteatosis y/o la NAFLD; y (b) los metabolitos lipídicos CE14:1n5, CE18:0, CE20:0, CE20:1n9, CE20:3n9, CE20:4n3, CE20:4n6, CE20:2n6, CE22:0, CE22:2n6, CE24:0, CESFA, PC20:4n6, PC22:5n6, PCn6, PCPUFA, PE20:4n6, TG15:0, TG18:2n6, TG20:0, TG20:2n6, TG20:4n6, TG20:5n3, TG22:2n6, TG22:1n9, TG22:4n6, TG22:5n6, TG24:1n9, TGn3, TGn6, TGPUFA, TL15:0, TL20:0, TL22:0, TL18:2n6, TL20:2n6, TL20:3n9, TL20:4n3, TL20:4n6, TL22:4n6, TL22:5n6, PC18:2n6, PC20:2n6, PE20:2n6, SM16:0, PGA2M, 6-ceto-PGF1 $\alpha$ , 11-DTXB2, 12,13-DiHOME, 9,10-EpOME, 12,13-EpOME, PCLC, PC18:1n7, LY18:1n7, LY18:1n9, LY18:2n6, LY18:3n3 y/o 19,20-DiHDDPA están asociados negativamente con la esteatosis y/o la NAFLD. En algunas formas de realización, los metabolitos lipídicos que se miden comprenden uno o más ácidos grasos y la cantidad de cada uno de los ácidos grasos es la cantidad relativa del ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de la clase de lípidos (como se indica mediante el prefijo que precede al ácido graso).

Tal como se utiliza en el presente documento, los metabolitos que están "asociados positivamente" o "correlacionados positivamente" con un trastorno incluyen aquellos metabolitos cuyas concentraciones generalmente aumentan con el trastorno con respecto a sujetos de control normales o a una referencia de control normal. Los metabolitos que están "asociados negativamente" o "correlacionados negativamente" con un trastorno generalmente incluyen aquellos metabolitos cuya concentración disminuye con el trastorno con respecto a los sujetos de control normales o a una referencia de control normal.

En algunas formas de realización alternativas, el trastorno hepático es la NASH y el uno o más metabolitos lipídicos están seleccionados del grupo que consiste en: PC18:3n6; PC20:3n6; CE14:0; CE16:1n7; CE18:1n9; CEMUFA; CEn7; CE18:1n7; CE18:2n6; CE18:3n6; CE22:5n3; CEn6; CEPUFA; PC14:0; PC16:1n7; PC18:1n9; PC18:3n3; PC18:4n3; PC20:0; PC20:1n9; PC20:4n3; PC20:5n3; PC22:0; PC22:1n9; PC24:0; PC24:1n9; PCdm; PCdm18:0; PCdm18:1n7; PCSFA; TG14:0; TG14:1n5; TG16:0; TG16:1n7; TG18:1n7; TGMUFA; TGn7; TGSFA; TL14:0; TL16:0; TL18:0; TL16:1n7; TL18:1n7; TL18:1n9; TL18:3n6; TL18:4n3; LY16:0; FA18:1n7; SM18:0; SM22:1n9; SMLC; PGB2; PGE2; PGF2 $\alpha$ ; 15-ceto-PGF2 $\alpha$ ; 5-HETE; 8-HETE; 9-HETE; 11-HETE; 12-HETE; 12-HEPE; 11,12-EpETrE; 8,9-DiHETrE; PC18:0; PC22:5n3; CE20:3n6; CELC; TGLC; TG18:3n6; TG20:4n3; TG20:3n6; TG22:5n3; LYLC; LY18:0; LY20:3n6; PE18:3n6; PE20:3n6; PE22:5n3; FA18:0; FA20:5n3; FA18:1n9; FA20:3n6; 15-HETE; TL20:3n6; TG18:3n3; TG20:3n9; TG22:6n3; TG24:0; CE14:1n5; CE18:0; CE20:0; CE20:1n9; CE20:3n9; CE20:4n3; CE20:4n6; CE20:2n6; CE22:0; CE22:2n6; CE24:0; CESFA; PC20:4n6; PC22:5n6; PCn6; PCPUFA; PE20:4n6; TG15:0; TG18:2n6; TG20:0; TG20:2n6; TG20:4n6; TG20:5n3; TG22:0; TG22:2n6; TG22:1n9; TG22:4n6; TG22:5n6; TG24:1n9; TGn3; TGn6; TGPUFA; TL15:0; TL20:0; TL22:0; TL18:2n6; TL20:2n6; TL20:3n9; TL20:4n3; TL20:4n6; TL22:4n6; TL22:5n6; PC22:6n3; PE22:6n3; LY22:6n3; PE14:0; PE18:1n7; PESFA; PELC; FA16:0; CE22:6n3, TL22:6n3; PCLC; PC18:1n7; LY18:1n7; LY18:1n9; LY18:2n6; LY18:3n3; y 19,20-DiHDDPA. En algunas formas de realización, (a) los metabolitos lipídicos PC18:3n6, PC20:3n6, CE14:0, CE16:1n7, CE18:1n9, CEMUFA, CEn7, CE18:1n7, CE18:2n6, CE18:3n6, CE22:5n3, CEn6, CEPUFA, PC14:0, PC16:1n7, PC18:1n9, PC18:3n3, PC18:4n3, PC20:0, PC20:1n9, PC20:4n3, PC20:5n3, PC22:0, PC22:1n9, PC24:0, PC24:1n9, PCdm, PCdm18:0, PCdm18:1n7, PCSFA, TG14:0, TG14:1n5, TG16:0, TG16:1n7, TG18:1n7, TGMUFA, TGn7, TGSFA, TL14:0, TL16:0, TL18:0, TL16:1n7, TL18:1n7, TL18:1n9, TL18:3n6, TL18:4n3, LY16:0, FA18:1n7, SM18:0, SM22:1n9, SMLC, PGB2, PGE2, PGF2 $\alpha$ , 15-ceto-PGF2 $\alpha$ , 5-HETE, 8-HETE, 9-HETE, 11-HETE, 12-HEPE, 11,12-EpETrE, 8,9-DiHETrE, PC18:0, PC22:5n3, CE20:3n6, CELC, TGLC, TG18:3n6, TG20:4n3, TG20:3n6, TG22:5n3, LYLC, LY18:0, LY20:3n6, PE18:3n6, PE20:3n6, PE22:5n3, FA18:0, FA20:5n3, FA18:1n9, FA20:3n6, 15-HETE y/o TL20:3n6 están asociados positivamente con la NASH; y (b) los metabolitos lipídicos TG18:3n3, TG20:3n9, TG22:6n3, TG24:0, CE14:1n5, CE18:0, CE20:0, CE20:1n9, CE20:3n9, CE20:4n3, CE20:4n6, CE20:2n6, CE22:0, CE22:2n6, CE24:0, CESFA, PC20:4n6, PC22:5n6, PCn6, PCPUFA, PE20:4n6, TG15:0, TG18:2n6, TG20:0, TG20:2n6, TG20:4n6, TG20:5n3, TG22:0, TG22:2n6, TG22:1n9, TG22:4n6, TG22:5n6, TG24:1n9, TGn3, TGn6, TGPUFA, TL15:0, TL20:0, TL22:0, TL18:2n6, TL20:2n6, TL20:3n9, TL20:4n3, TL20:4n6, TL22:4n6, TL22:5n6, PC22:6n3, PE22:6n3, LY22:6n3, PE14:0, PE18:1n7, PESFA, PELC, FA16:0, CE22:6n3, TL22:6n3, PCLC, PC18:1n7, LY18:1n7, LY18:1n9, LY18:2n6, LY18:3n3 y/o 19,20-DiHDDPA están asociados negativamente con la NASH. En algunas formas de realización, los metabolitos lipídicos que se miden comprenden uno o más ácidos grasos y la cantidad de cada uno de los ácidos grasos es la cantidad relativa de ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de la clase de lípidos (como se indica mediante el prefijo que precede al ácido graso).

Se entiende que dondequiera que las formas de realización se describan en el presente documento con la expresión "que comprende", también se proporcionan de otro modo formas de realización análogas descritas en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

"Un", "una" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Los términos químicos, a menos que se defina lo contrario, se utilizan como se conocen en la técnica.

5 Tal como se muestra en la Figura 1, un metabolito lipídico que es una proporción relativa (mostrada en gris más oscuro) de un triglicérido (o de cualquier otra clase de lípido) puede medirse en un fluido corporal, tal como suero o plasma, como una medida cuantitativa de la proporción relativa de ese metabolito lipídico en los triglicéridos hepáticos (u otra clase de lípidos). Si esta proporción relativa de metabolito lipídico (o un grupo de metabolitos lipídicos) se correlaciona con la concentración hepática de triglicéridos, sirve como sustituto cuantitativo de la esteatosis hepática, independiente del flujo de triglicéridos hepáticos en VLDL. Por lo tanto, puede utilizarse el porcentaje en moles u otra cantidad relativa de un ácido graso concreto dentro de una clase concreta de lípidos como sustituto cuantitativo de la esteatosis.

15 En algunas formas de realización, puede utilizarse en los métodos de la invención la cantidad relativa (por ejemplo, porcentaje en moles o porcentaje en peso) de un único metabolito lipídico. En otras formas de realización, pueden utilizarse en los métodos de la invención las cantidades relativas (por ejemplo, porcentajes en moles o porcentajes en peso) de dos o más metabolitos lipídicos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, o más metabolitos lipídicos. En algunas formas de realización, la cantidad relativa es el porcentaje en moles. En algunas formas de realización, la cantidad relativa es el porcentaje en peso. Pueden utilizarse en los métodos de la invención las cantidades de uno o más biomarcadores, tal como se define más adelante, en una muestra del sujeto, además de la cantidad de uno o más metabolitos lipídicos. En algunas formas de realización, la cantidad del biomarcador es la cantidad absoluta del biomarcador en la muestra. En algunas formas de realización, la cantidad del biomarcador es la concentración del biomarcador en la muestra.

25 Según la presente invención, cuando se analizan los efectos generados por dos o más metabolitos lipídicos, pueden evaluarse los efectos de estos metabolitos lipídicos individualmente u obtener el efecto neto de estos metabolitos lipídicos, por ejemplo, utilizando diversos modelos o fórmulas matemáticas para cuantificar el efecto de cada metabolito lipídico. Una fórmula que contiene como variables los niveles de uno o más metabolitos lipídicos incluye cualquier fórmula matemática, modelo, ecuación o expresión establecida en base a principios o métodos matemáticos o estadísticos utilizando como variables los valores de uno o más metabolitos lipídicos.

35 En general, puede utilizarse cualquier análisis matemático adecuado para analizar el efecto neto de dos o más metabolitos lipídicos con respecto a prever la afección del hígado de un sujeto. Por ejemplo, pueden utilizarse métodos tales como el análisis multivariante de la varianza, la regresión multivariante, la regresión múltiple para determinar las relaciones entre las variables dependientes, y las variables independientes. Puede utilizarse el agrupamiento, incluidos los métodos jerárquico y no jerárquico, así como el escalamiento dimensional no métrico para determinar las asociaciones entre las variables y entre los cambios en esas variables.

40 Además, el análisis de componentes principales es una manera común de reducir la dimensión de los estudios, y puede utilizarse para interpretar la estructura de varianza-covarianza de un conjunto de datos. Pueden utilizarse los componentes principales en tales aplicaciones como la regresión múltiple y el análisis por conglomerados. Se utiliza el análisis factorial para describir la covarianza construyendo variables "ocultas" a partir de las variables observadas. El análisis factorial puede considerarse una extensión del análisis de componentes principales, en el que se utiliza el análisis de componentes principales como la estimación de parámetros junto con el método de máxima verosimilitud. Además, puede ensayarse una hipótesis simple tal como la igualdad de dos vectores de las medias utilizando el estadístico T cuadrado de Hotelling.

45 En algunas formas de realización, se establece una fórmula que contiene como variables uno o más metabolitos lipídicos mediante análisis de regresión, por ejemplo, regresiones lineales múltiples. Los ejemplos de fórmulas desarrolladas incluyen, sin ninguna limitación, los siguientes:

55

60

65

**Fórmula I:  $k + k_1(FA_1) + k_2(FA_2) + k_3(FA_3)$**

5

**Fórmula II:  $k - k_1(FA_1) + k_2(FA_2) + k_3(FA_3)$**

10

**Fórmula III:  $k + k_1(FA_1) - k_2(FA_2) + k_3(FA_3)$**

15

**Fórmula IV:  $k + k_1(FA_1) + k_2(FA_2) - k_3(FA_3)$**

20

**Fórmula V:  $k - k_1(FA_1) - k_2(FA_2) + k_3(FA_3)$**

25

**Fórmula VI:  $k + k_1(FA_1) - k_2(FA_2) - k_3(FA_3)$**

30

**Fórmula VII:  $k - k_1(FA_1) + k_2(FA_2) - k_3(FA_3)$**

35

**Fórmula VIII:  $k - k_1(FA_1) - k_2(FA_2) - k_3(FA_3)$**

Las fórmulas pueden utilizar como variables uno o más metabolitos lipídicos, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, o más metabolitos lipídicos. Las constantes de estas fórmulas pueden establecerse utilizando un conjunto de datos obtenidos a partir de afecciones hepáticas conocidas. Normalmente, los niveles de metabolitos lipídicos utilizados en estas fórmulas pueden ser los niveles en un instante de tiempo o los cambios de los niveles durante un período de tiempo.

40

Según la invención, pueden utilizarse fórmulas matemáticas establecidas utilizando metabolitos lipídicos para evaluar cualitativa o cuantitativamente la afección hepática de un sujeto durante un periodo de tiempo. Por ejemplo, puede utilizarse una fórmula con uno o más metabolitos lipídicos como variables para calcular directamente la afección hepática de un sujeto. Además, puede compararse el valor neto de una fórmula que contiene uno o más metabolitos lipídicos con el valor estándar de tal fórmula que corresponde a un patrón de afección hepática, por ejemplo, la evolución o regresión de la hepatopatía grasa, y pueden utilizarse los resultados de tal comparación para prever el desarrollo de la afección hepática. En concreto, un sujeto que tenga un valor neto de una fórmula similar a o dentro del intervalo del valor estándar de tal fórmula que se asigna a o se asocia con una evolución de una afección hepática probablemente experimentará una evolución durante un período de tiempo. Asimismo, un sujeto que tenga un valor neto de una fórmula similar a o dentro del intervalo de los valores estándar de tal fórmula que se asignan a o se asocian con una regresión probablemente experimentará una regresión de su afección hepática durante un período de tiempo.

50

Asimismo, estas fórmulas y métodos de modelización matemáticos también pueden utilizarse en el análisis de los efectos netos generados por uno o más metabolitos lipídicos y uno o más biomarcadores.

55

Pueden medirse metabolitos lipídicos en un fluido corporal. Los ejemplos de fluidos corporales no limitativos incluyen, por ejemplo, fluidos tales como sangre, plasma, suero, fracciones de lipoproteínas aisladas, saliva, orina, linfa, líquido cefalorraquídeo y bilis. En algunas formas de realización, el metabolito lipídico se mide en un fluido corporal hemático, tal como sangre, plasma, suero o fracciones de lipoproteínas. En algunas formas de realización, el metabolito lipídico se mide en plasma. En algunas formas de realización, el metabolito lipídico se mide en suero.

60

En algunas formas de realización, la invención proporciona métodos en los que se determinan las cantidades de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, o seis o más metabolitos lipídicos.

65

En algunas formas de realización, los metabolitos lipídicos que se miden comprenden un par de metabolitos lipídicos seleccionados del grupo que consiste en uno o más metabolitos lipídicos que comprenden un par de metabolitos lipídicos seleccionados del grupo que consiste en (a) 15-HETE y 15-ceto-PGF<sub>2</sub>α; (b) TG18:1n7 y PC20:3n6; (c) 11-HETE y CE22:6n3; (d) 11-HETE y PCTL; y (e) PC22:6n3 y PC18:3n3. En algunas formas de realización, el método es un método de clasificación de un trastorno hepático tal como NASH frente a NAFLD.

**Marcadores ácidos grasos para esteatosis, NAFLD, NASH y/u otros trastornos hepáticos**

En algunas formas de realización, el metabolito lipídico es un ácido graso presente dentro de una clase concreta de lípidos. Los metabolitos lipídicos abarcan, sin limitación, cada uno de los metabolitos que figuran en la Tabla 1 que se presenta más adelante, así como cada uno de los metabolitos que figuran en las Tablas 7 y 8 del Ejemplo 4, que se presenta más adelante. En algunas formas de realización, el metabolito lipídico es TG20:4n6. El método puede implicar medir la cantidad de más de un metabolito lipídico, tal como 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, o más metabolitos lipídicos. En algunas formas de realización, se miden dos o más metabolitos lipídicos de la Tabla 1. En algunas formas de realización, se miden tres o más metabolitos lipídicos de la Tabla 1. En algunas formas de realización, se miden cinco o más metabolitos lipídicos de la Tabla 1. En algunas formas de realización se miden, dos o más metabolitos lipídicos de las Tablas 7 y/u 8. En algunas formas de realización, se miden tres o más metabolitos lipídicos de las Tablas 7 y/u 8. En algunas formas de realización, se miden cinco o más metabolitos lipídicos de las Tablas 7 y/u 8. En algunas formas de realización, el metabolito lipídico se correlaciona positivamente con los niveles de triglicéridos en hígado. En algunas formas de realización, el metabolito lipídico se correlaciona negativamente con los niveles de triglicéridos en hígado. En algunas formas de realización, el metabolito lipídico se mide como una cantidad relativa dentro de esa clase concreta de lípidos. En algunas formas de realización, el metabolito lipídico se mide como un porcentaje en moles dentro de esa clase concreta de lípidos. En algunas formas de realización, el metabolito lipídico se mide como un porcentaje en peso dentro de esa clase concreta de lípidos.

Tabla 1. Marcadores metabolitos lipídicos hemáticos de esteatosis hepática (en base a porcentaje en moles)

<u>Clase de lípido</u>	<u>Se correlaciona positivamente</u>	<u>Se correlaciona negativamente</u>
<b>Triglicéridos</b>	TG14:0	TG15:0
	TG14:1n5	TG18:2n6
	TG16:0	TG18:3n3
	TG18:1n7	TG20:0
	TGMUFA	TG20:2n6
	TGn7	TG20:3n6
	TGSFA	TG20:3n9
	TG16:1n7	TG20:4n6
		TG20:5n3
		TG22:0
		TG22:1n9
		TG22:2n6
		TG22:4n6
		TG22:5n3
		TG22:5n6
		TG22:6n3
		TG24:0
		TG24:1n9
		TGn3
		TGn6

ES 2 527 438 T3

		TGPUFA
	<b>Ácidos grasos libres</b>	FA16:1n7
5	<b>Fosfatidilcolinas</b>	PC14:0
		PC18:1n7
		PC16:1n7
		PC20:4n6
		PC18:1n7
10		PC22:5n6
		PC18:1n9
		PCn6
		PC18:3n3
		PCPUFA
		PC18:3n6
		PC22:5n3
15		PC18:4n3
		PC20:0
		PC20:1n9
20		PC20:2n6
		PC20:3n6
		PC20:4n3
		PC20:5n3
25		PC22:0
		PC22:1n9
		PC24:0
30		PC24:1n9
		PCdm
		PCdm18:0
35		PCdm18:1n7
		PCSFA
	<b>Fosfatidiletanolaminas</b>	PE20:4n6
40	<b>Ésteres de colesterol</b>	CE16:1n7
		CE14:1n5
		CE18:1n7
		CE18:0
		CE18:1n9
		CE20:0
45		CE18:2n6
		CE20:1n9
		CE18:3n6
		CE20:2n6
		CE22:5n3
		CE20:3n9
		CE22:6n3
50		CE20:4n3
		CEMUFA
		CE20:4n6
		CEn6
		CE22:0
		CEn7
		CE22:2n6
55		CEPUFA
		CE24:0
		CE14:0
		CESFA
	<b>Ácidos grasos totales</b>	14:0
60		15:0
		16:0
		20:0
		18:0
		22:0

65

	16:1n7	18:2n6
5	18:1n7	20:2n6
	18:1n9	20:3n9
	18:3n6	20:4n3
10	18:4n3	20:4n6
		22:4n6
		22:5n6

15 En la Tabla 1, los prefijos "TG", "FA", "PC", "PE" y "CE" corresponden a los ácidos grasos presentes en los triglicéridos, ácidos grasos libres, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas y ésteres de colesterol, respectivamente. Por lo tanto, "TG14:0" indica el ácido graso 14:0 presente en los triglicéridos. En la Tabla 1, "14:0" (sin prefijo) indica el ácido graso 14:0 presente en los ácidos grasos totales.

20 La clase de lípidos puede ser, por ejemplo, lípidos neutros, fosfolípidos, ácidos grasos libres, ácidos grasos totales, triglicéridos, ésteres de colesterol, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, diglicéridos o lisofosfatidilcolinas. En algunas formas de realización, la clase de lípidos está seleccionada del grupo que consiste en lípidos neutros, fosfolípidos, ácidos grasos libres, ácidos grasos totales, triglicéridos, ésteres de colesterol, fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas. En algunas formas de realización, la clase de lípidos está seleccionada del grupo que consiste en lípidos neutros, fosfolípidos, ácidos grasos totales y ésteres de colesterol. En algunas formas de realización, la clase de lípidos está seleccionada del grupo que consiste en ácidos grasos libres, ácidos grasos totales, triglicéridos, ésteres de colesterol, fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas. En algunas formas de realización, la clase de lípidos son los ácidos grasos libres. En algunas formas de realización, la clase de lípidos son los ácidos grasos totales. En algunas formas de realización, la clase de lípidos son los triglicéridos. En algunas formas de realización, la clase de lípidos son los ésteres de colesterol. En algunas formas de realización, la clase de lípidos son las fosfatidilcolinas. En algunas formas de realización, la clase de lípidos son las fosfatidiletanolaminas. En algunas formas de realización, la clase de lípidos son los fosfolípidos. En algunas formas de realización, la clase de lípidos son los lípidos neutros. En algunas formas de realización, la clase de lípidos son los diglicéridos. En algunas formas de realización, la clase de lípidos son las esfingomielinas.

35 En algunas formas de realización, se miden uno o más metabolitos lipídicos que comprenden uno o más ácidos grasos. En algunas formas de realización, uno o más metabolitos lipídicos están seleccionados del grupo que consiste en: PC18:3n6; PC20:3n6; CE14:0; CE16:1n7; CE18:1n9; CEMUFA; CEn7; CE18:1n7; CE18:2n6; CE18:3n6; CE22:5n3; CEn6; CEPUFA; PC14:0; PC16:1n7; PC18:1n9; PC18:3n3; PC18:4n3; PC20:0; PC20:1n9; PC20:4n3; PC20:5n3; PC22:0; PC22:1n9; PC24:0; PC24:1n9; PCdm; PCdm18:0; PCdm18:1n7; PCSFA; TG14:0; TG14:1n5; TG16:0; TG16:1n7; TG 18:1 n7; TGMUFA; TGn7; TGSFA; TL14:0; TL16:0; TL18:0; TL16:1n7; TL18:1n7; TL18:1n9; TL18:3n6; TL18:4n3; TG18:3n3; TG20:3n9; TG22:6n3; TG24:0; CE14:1n5; CE18:0; CE20:0; CE20:1n9; CE20:3n9; CE20:4n3; CE20:4n6; CE20:2n6; CE22:0; CE22:2n6; CE24:0; CESFA; PC20:4n6; PC22:5n6; PCn6; PCPUFA; PE20:4n6; TG15:0; TG18:2n6; TG20:0; TG20:2n6; TG20:4n6; TG20:5n3; TG22:0; TG22:2n6; TG22:1n9; TG22:4n6; TG22:5n6; TG24:1n9; TGn3; TGn6; TGPUFA; TL15:0; TL20:0; TL22:0; TL18:2n6; TL20:2n6; TL20:3n9; TL20:4n3; TL20:4n6; TL22:4n6; TL22:5n6; LY16:0; FA18:1n7; SM18:0; SM22:1n9; SMLC; PC18:0; PC22:Sn3; CE20:3n6; CELC; TGLC; TG18:3n6; TG20:4n3; TG20:3n6; TG22:5n3;LYLC; LY18:0; LY20:3n6; PE18:3n6; PE20:3n6; PE22:Sn3; FA18:0; FA20:5n3; FA18:1n9; FA20:3n6; TL20:3n6; PC18:2n6; PC20:2n6; PE20:2n6; SM16:0; PC22:6n3; PE22:6n3; LY22:6n3; PE14:0; PE18:1n7; PESFA; PELC; FA16:0; CE22:6n3, TL22:6n3; PCLC; PC18:1n7; LY18:1n7; LY18:1n9; LY18:2n6; y LY18:3n3. En algunas formas de realización, la cantidad de cada uno de los ácidos grasos es la cantidad relativa de ácido graso con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de la clase de lípidos (como se indica mediante el prefijo que precede al ácido graso).

55 Por ejemplo, en algunas formas de realización, uno o más ácidos grasos están seleccionados del grupo que consiste en: PC18:3n6; PC20:3n6; CE14:0; CE16:1n7; CE18:1n9; CEMUFA; CEn7; CE18:1n7; CE18:2n6; CE18:3n6; CE22:5n3; CEn6; CEPUFA; PC14:0; PC16:1n7; PC18:1n9; PC18:3n3; PC18:4n3; PC20:0; PC20:1n9; PC20:4n3; PC20:5n3; PC22:0; PC22:1n9; PC24:0; PC24:1n9; PCdm; PCdm18:0; PCdm18:1n7; PCSFA; TG14:0; TG 14:1 n5; TG16:0; TG16:1n7; TG18:1n7; TGMUFA; TGn7; TGSFA; TL14:0; TL16:0; TL18:0; TL16:1n7; TL18:1n7; TL18:1n9; TL18:3n6; TL18:4n3; TG18:3n3; TG20:3n9; TG22:6n3; TG24:0; CE14:1n5; CE18:0; CE20:0; CE20:1n9; CE20:3n9; CE20:4n3; CE20:4n6; CE20:2n6; CE22:0; CE22:2n6; CE24:0; CESFA; PC20:4n6; PC22:5n6; PCn6; PCPUFA; PE20:4n6; TG15:0; TG18:2n6; TG20:0; TG20:2n6; TG20:4n6; TG20:5n3; TG22:0; TG22:2n6; TG22:1n9; TG22:4n6; TG22:5n6; TG24:1n9; TGn3; TGn6; TGPUFA; TL15:0; TL20:0; TL22:0; TL18:2n6; TL20:2n6; TL20:3n9; TL20:4n3; TL20:4n6; TL22:4n6; y TL22:5n6.

65 En algunas formas de realización, el trastorno hepático es la esteatosis y/o la NAFLD y uno o más metabolitos lipídicos están seleccionados del grupo que consiste en: PC18:3n6; PC20:3n6; CE14:0; CE16:1n7;

CE18:1n9; CEMUFA; CEn7; CE18:1n7; CE18:2n6; CE18:3n6; CE22:5n3; CEn6; CEPUFA; PC14:0; PC16:1n7; PC18:1n9; PC18:3n3; PC18:4n3; PC20:0; PC20:1n9; PC20:4n3; PC20:5n3; PC22:0; PC22:1n9; PC24:0; PC24:1n9; PCdm; PCdm18:0; PCdm18:1n7; PCSFA; TG14:0; TG14:1n5; TG16:0; TG16:1n7; TG18:1n7; TGMUFA; TGn7; TGSFA; TL14:0; TL16:0; TL18:0; TL16:1n7; TL18:1n7; TL18:1n9; TL18:3n6; TL18:4n3; PC18:0; PC22:5n3; CE20:3n6; CELC; TGLC; TG18:3n6; TG20:4n3; TG20:3n6; TG22:5n3;LYLC; LY18:0; LY20:3n6; PE18:3n6; PE20:3n6; PE22:5n3; FA18:0; FA20:5n3; FA18:1 n9; FA20:3n6; TL20:3n6; CE14:1n5; CE18:0; CE20:0; CE20:1n9; CE20:3n9; CE20:4n3; CE20:4n6; CE20:2n6; CE22:0; CE22:2n6; CE24:0; CESFA; PC20:4n6; PC22:5n6; PCn6; PCPUFA; PE20:4n6; TG15:0; TG18:2n6; TG20:0; TG20:2n6; TG20:4n6; TG20:5n3; TG22:0; TG22:2n6; TG22:1n9; TG22:4n6; TG22:5n6; TG24:1n9; TGn3; TGn6; TGPUFA; TL15:0; TL20:0; TL22:0; TL18:2n6; TL20:2n6; TL20:3n9; TL20:4n3; TL20:4n6; TL22:4n6; TL22:5n6; PC18:2n6; PC20:2n6; PE20:2n6; SM16:0; PCLC; PC18:1n7; LY18:1n7; LY18:1n9; LY18:2n6; y LY18:3n3.

En algunas formas de realización, los metabolitos lipídicos PC18:3n6, PC20:3n6, CE14:0, CE16:1n7, CE18:1n9, CEMUFA, CEn7, CE18:1n7, CE18:2n6, CE18:3n6, CE22:5n3, CEn6, CEPUFA, PC14:0, PC16:1n7, PC18:1n9, PC18:3n3, PC18:4n3, PC20:0, PC20:1n9, PC20:4n3, PC20:5n3, PC22:0, PC22:1n9, PC24:0, PC24:1n9, PCdm, PCdm18:0, PCdm18:1n7, PCSFA, TG14:0, TG14:1n5, TG16:0, TG16:1n7, TG18:1n7, TGMUFA, TGn7, TGSFA, TL14:0, TL16:0, TL18:0, TL16:1n7, TL18:1n7, TL18:1n9, TL18:3n6, TL18:4n3, PC18:0, PC22:5n3, CE20:3n6, CELC, TGLC, TG18:3n6, TG20:4n3, TG20:3n6, TG22:5n3, LYLC, LY18:0, LY20:3n6, PE18:3n6, PE20:3n6, PE22:5n3, FA18:0, FA20:5n3, FA18:1n9 y/o FA20:3n6 están asociados positivamente con la esteatosis y/o la NAFLD. En algunas formas de realización, los metabolitos lipídicos CE14:1n5, CE18:0, CE20:0, CE20:1n9, CE20:3n9, CE20:4n3, CE20:4n6, CE20:2n6, CE22:0, CE22:2n6, CE24:0, CESFA, PC20:4n6, PC22:5n6, PCn6, PCPUFA, PE20:4n6, TG15:0, TG18:2n6, TG20:0, TG20:2n6, TG20:4n6, TG20:5n3, TG22:0, TG22:2n6, TG22:1n9, TG22:4n6, TG22:5n6, TG24:1n9, TGn3, TGn6, TGPUFA, TL15:0, TL20:0, TL22:0, TL18:2n6, TL20:2n6, TL20:3n9, TL20:4n3, TL20:4n6, TL22:4n6, TL22:5n6, PC18:2n6, PC20:2n6, PE20:2n6, SM16:0, PCLC, PC18:1n7, LY18:1n7, LY18:1n9, LY18:2n6 y/o LY18:3n3 están asociados negativamente con la esteatosis y/o la NAFLD.

En algunas formas de realización alternativas, el trastorno hepático es la NASH y uno o más metabolitos lipídicos están seleccionados del grupo que consiste en: PC18:3n6; PC20:3n6; CE14:0; CE16:1n7; CE18:1n9; CEMUFA; CEn7; CE18:1n7; CE18:2n6; CE18:3n6; CE22:5n3; CEn6; CEPUFA; PC14:0; PC16:1n7; PC18:1n9; PC18:3n3; PC18:4n3; PC20:0; PC20:1n9; PC20:4n3; PC20:5n3; PC22:0; PC22:1n9; PC24:0; PC24:1n9; PCdm; PCdm18:0; PCdm 18:1 n7; PCSFA; TG14:0; TG14:1n5; TG16:0; TG16:1n7; TG18:1n7; TGMUFA; TGn7; TGSFA; TL14:0; TL16:0; TL18:0; TL16:1n7; TL18:1n7; TL18:1n9; TL18:3n6; TL18:4n3; LY16:0; FA18:1n7; SM18:0; SM22:1n9; SMLC; PC18:0; PC22:5n3; CE20:3n6; CELC; TGLC; TG18:3n6; TG20:4n3; TG20:3n6; TG22:5n3;LYLC; LY18:0; LY20:3n6; PE18:3n6; PE20:3n6; PE22:5n3; FA18:0; FA20:5n3; FA18:1n9; FA20:3n6; 15-HETE; TL20:3n6; TG18:3n3; TG20:3n9; TG22:6n3; TG24:0; CE14:1n5; CE18:0; CE20:0; CE20:1n9; CE20:3n9; CE20:4n3; CE20:4n6; CE20:2n6; CE22:0; CE22:2n6; CE24:0; CESFA; PC20:4n6; PC22:5n6; PCn6; PCPUFA; PE20:4n6; TG15:0; TG18:2n6; TG20:0; TG20:2n6; TG20:4n6; TG20:5n3; TG22:0; TG22:2n6; TG22:1n9; TG22:4n6; TG22:5n6; TG24:1n9; TGn3; TGn6; TGPUFA; TL15:0; TL20:0; TL22:0; TL18:2n6; TL20:2n6; TL20:3n9; TL20:4n3; TL20:4n6; TL22:4n6; TL22:5n6; PC22:6n3; PE22:6n3; LY22:6n3; PE14:0; PE18:1n7; PESFA; PELC; FA16:0; CE22:6n3, TL22:6n3; PCLC; PC18:1n7; LY18:1n7; LY18:1n9; LY18:2n6; y LY18:3n3.

En algunas formas de realización, los metabolitos lipídicos PC18:3n6, PC20:3n6, CE14:0, CE16:1n7, CE18:1n9, CEMUFA, CEn7, CE18:1n7, CE18:2n6, CE18:3n6, CE22:5n3, CEn6, CEPUFA, PC14:0, PC16:1n7, PC18:1n9, PC18:3n3, PC18:4n3, PC20:0, PC20:1n9, PC20:4n3, PC20:5n3, PC22:0, PC22:1n9, PC24:0, PC24:1n9, PCdm, PCdm 18:0, PCdm18:1n7, PCSFA, TG14:0, TG14:1n5, TG16:0, TG16:1n7, TG18:1n7, TGMUFA, TGn7, TGSFA, TL14:0, TL16:0, TL18:0, TL16:1n7, TL18:1n7, TL18:1n9, TL18:3n6, TL18:4n3, LY16:0, FA18:1n7, SM18:0, SM22:1n9, SMLC, PC18:0, PC22:5n3, CE20:3n6, CELC, TGLC, TG18:3n6, TG20:4n3, TG20:3n6, TG22:5n3, LYLC, LY18:0, LY20:3n6, PE18:3n6, PE20:3n6, PE22:5n3, FA18:0, FA20:5n3, FA18:1n9, FA20:3n6 y/o TL20:3n6 están asociados positivamente con la NASH. En algunas formas de realización, los metabolitos lipídicos TG18:3n3, TG20:3n9, TG22:6n3, TG24:0, CE14:1n5, CE18:0, CE20:0, CE20:1n9, CE20:3n9, CE20:4n3, CE20:4n6, CE20:2n6, CE22:0, CE22:2n6, CE24:0, CESFA, PC20:4n6, PC22:5n6, PCn6, PCPUFA, PE20:4n6, TG15:0, TG18:2n6, TG20:0, TG20:2n6, TG20:4n6, TG20:5n3, TG22:0, TG22:2n6, TG22:1n9, TG22:4n6, TG22:5n6, TG24:1n9, TGn3, TGn6, TGPUFA, TL15:0, TL20:0, TL22:0, TL18:2n6, TL20:2n6, TL20:3n9, TL20:4n3, TL20:4n6, TL22:4n6, TL22:5n6, PC22:6n3, PE22:6n3, LY22:6n3, PE14:0, PE18:1n7, PESFA, PELC, FA 16:0, CE22:6n3, TL22:6n3, PCLC, PC18:1n7, LY18:1n7, LY18:1n9, LY18:2n6 y/o LY18:3n3 están asociados negativamente con la NASH.

En algunas formas de realización, si la cantidad relativa de PC18:3n6, PC20:3n6, CE14:0, CE16:1n7, CE18:1n9, CEMUFA, CEn7, CE18:1n7, CE18:2n6, CE18:3n6, CE22:5n3, CEn6, CEPUFA, PC14:0, PC16:1n7, PC18:1n9, PC18:3n3, PC18:4n3, PC20:0, PC20:1n9, PC20:4n3, PC20:5n3, PC22:0, PC22:1n9, PC24:0, PC24:1n9, PCdm, PCdm 18:0, PCdm18:1n7, PCSFA, TG14:0, TG14:1n5, TG16:0, TG16:1n7, TG18:1n7, TGMUFA, TGn7, TGSFA, TL14:0, TL16:0, TL18:0, TL16:1n7, TL18:1n7, TL18:1n9, TL18:3n6 y/o TL18:4n3 es superior a una referencia (por ejemplo, un control normal), hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, hay indicio de insuficiencia hepática, esteatosis hepática, NAFLD y/o NASH.

En algunas formas de realización, si la cantidad relativa de CE14:1n5, CE18:0, CE20:0, CE20:1n9, CE20:3n9, CE20:4n3, CE20:4n6, CE20:2n6, CE22:0, CE22:2n6, CE24:0, CESFA, PC20:4n6, PC22:5n6, PCn6,

PCPUFA, PE20:4n6, TG15:0, TG18:2n6, TG20:0, TG20:2n6, TG20:4n6, TG20:5n3, TG22:0, TG22:2n6, TG22:1n9, TG22:4n6, TG22:5n6, TG24:1n9, TGn3, TGn6, TGPUFA, TL15:0, TL20:0, TL22:0, TL18:2n6, TL20:2n6, TL20:3n9, TL20:4n3, TL20:4n6, TL22:4n6 y/o TL22:5n6 es inferior a una referencia (por ejemplo, un control normal), hay indicio de acumulación de triglicéridos en el hígado. En algunas formas de realización, hay indicio de insuficiencia hepática, esteatosis hepática, NAFLD y/o NASH.

5

En algunas formas de realización, las cantidades de los ácidos grasos (por ejemplo, las cantidades relativas de los ácidos grasos dentro de clases concretas de lípidos) se determinan a partir de una muestra de sangre, suero, plasma o fracción de lipoproteína aislada.

10

**Marcadores eicosanoides para esteatosis, NAFLD, NASH y/u otros trastornos hepáticos**

La presente invención proporciona métodos en los que uno, algunos o todos los metabolitos lipídicos medidos en la(s) muestra(s) pueden ser eicosanoides. Se proporcionan eicosanoides ejemplares no limitativos en la Tabla 2, en la Tabla 9 del Ejemplo 5 y en la Tabla 10 del Ejemplo 5. Las abreviaturas ejemplares para los eicosanoides se indican en la Tabla 9.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**Tabla 2. Lista de eicosanoides**

5	13-14-dihidro-15-ceto PGA2	PGB2	PGD2
	PGE2	6-ceto PGF1a	PGF2a
	11b-PGF2a	15-ceto PGF2a	PGJ2
10	15-desoxi-o-12,14-PGJ2	TXB2	11-deshidro TXB2
	8-iso-PGF2a	9-HODE	13-HODE
	5-HETE	8-HETE	9-HETE
	11-HETE	12-HETE	15-HETE
15	5(S)-HEPE	12(S)-HEPE	15(S)-HEPE
	LTB4	LTB5	LTC4
	LTD4	LTE4	LTF4
20	Lipoxina A4	20-HETE	12(13)-DiHOME
	12(13)-EpOME	9(10)-EpOME	5(6)-EpETrE
	1(12)-EpETrE	14(15)-EpETrE	5,6-DiHETrE
25	8,9-DiHETrE	11,12-DiHETrE	14,15-DiHETrE
	14,15-DiHETE	17,18-DiHETE	14(15)-EpETE
	17(18)-EpETE	19(20)-DiHDPA	
30	6kPGF1a	PGJ2	8,9 DiHETrE
	D8-12 HETE	D4-6 ceto PGF1a	PGB2
	5,6 DiHETrE	9 HETE	d4-8-iso-PGF2a
35	LTB5	20 HETE	11(12) EpETrE
	D4- PGF2a	D4- PGB2	15 HEPE
	11 HETE	11bPGF2a	LTC4
40	15 desoxi 12,14 PGJ2	8 HETE	TXB2
	LTE4	12 (S) HEPE	14(15) EpETE
	D4-TXB2	LTF4	5 (S) HEPE
45	12 HETE	8-iso-PGF2a	13,14 dihidro 15 ceto PGA2
	D4- 13 HODE	D8-5 HETE	PGF2a
	LTD4	D4- 9 HODE	5 HETE
	D4- PGE2	17,18 DiHETE	13 HODE
50	5(6) EpETrE	D4- PGD2	D4- LTB4
	12(13) EpOME	11 deshidro TXB2	LTB4
	9 HODE	D4- 11 dhTXB2	14,15 DiHETE
55	9(10) EpOME	PGE2	12(13) DiHOME
	D8-15 HETE	PGD2	14,15 DiHETrE
60	15 HETE	15 ceto PGF2a	19,20 DiHDPA
	14(15) EpETrE	Lipoxina A4	11,12 DiHETrE
	17(18) EpETE		

65 En algunas formas de realización, el método puede implicar medir la cantidad de más de un metabolito lipídico, tal como 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, o más metabolitos lipídicos, que pueden incluir 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, o más marcadores ácidos grasos descritos en el presente documento y/o 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, o más marcadores

eicosanoides descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, se miden dos o más metabolitos lipídicos de la Tabla 2. En algunas formas de realización, se miden tres o más metabolitos lipídicos de la Tabla 2. En algunas formas de realización, se miden cinco o más metabolitos lipídicos de la Tabla 2. En algunas formas de realización se miden, dos o más metabolitos lipídicos de las Tablas 9 y/o 10 (véase el Ejemplo 5, más adelante). En algunas formas de realización se miden, tres o más metabolitos lipídicos de las Tablas 9 y/o 10. En algunas formas de realización, se miden cinco o más metabolitos lipídicos de las Tablas 9 y/o 10. En algunas formas de realización, se miden dos o más metabolitos lipídicos de la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 7 (véase el Ejemplo 4, más adelante), Tabla 8 (véase el Ejemplo 4, más adelante), Tabla 9 y/o Tabla 10. En algunas formas de realización, se miden tres o más metabolitos lipídicos de la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 7, Tabla 8, Tabla 9 y/o Tabla 10. En algunas formas de realización, se miden cinco o más metabolitos lipídicos de la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 7, Tabla 8, Tabla 9 y/o Tabla 10. En algunas formas de realización, se miden dos o más metabolitos lipídicos de la Tabla 7, Tabla 8 y/o Tabla 10. En algunas formas de realización, se miden tres o más metabolitos lipídicos de la Tabla 7, Tabla 8 y/o Tabla 10. En algunas formas de realización, se miden cinco o más metabolitos lipídicos de la Tabla 7, Tabla 8 y/o Tabla 10.

En algunas formas de realización, uno o más metabolitos lipídicos están seleccionados del grupo que consiste en PGB<sub>2</sub>; PGE<sub>2</sub>; PGF<sub>2</sub>α; 15-ceto-PGF<sub>2</sub>α; 5-HETE; 8-HETE; 9-HETE; 11-HETE; 12-HETE; 12-HEPE; 11,12-EpETrE; 8,9-DiHETrE. 15-HETE; PGA<sub>2</sub>M; 6-ceto-PGF<sub>1</sub>α; 11-DTXB<sub>2</sub>; 12,13-DiHOME; 9,10-EpOME; 12,13-EpOME; y 19,20-DiHDPA.

En algunas formas de realización, los siguientes eicosanoides están asociados positivamente con la NASH: PGB<sub>2</sub>; PGE<sub>2</sub>; PGF<sub>2</sub>α; 15-ceto-PGF<sub>2</sub>α; 5-HETE; 8-HETE; 9-HETE; 11-HETE; 12-HETE; 12-HEPE; 11,12-EpETrE; 8,9-DiHETrE; y 15-HETE. En algunas formas de realización, 15-HETE está asociado positivamente con la esteatosis y/o la NAFLD. En algunas formas de realización, los siguientes eicosanoides están asociados negativamente con la esteatosis y/o la NAFLD: PGA<sub>2</sub>M; 6-ceto-PGF<sub>1</sub>α; 11-DTXB<sub>2</sub>; 12,13-DiHOME; 9,10-EpOME; 12,13-EpOME; y 19,20-DiHDPA. En algunas formas de realización, el eicosanoides 19,20-DiHDPA está asociado negativamente con la NASH.

En determinadas formas de realización, el método es un método de diagnóstico de la NASH en un sujeto, que comprende no sólo determinar una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de una o más clases de lípidos en una muestra de un fluido corporal del sujeto, sino también la etapa de determinar el nivel de un eicosanoide en un fluido corporal del sujeto. En algunas formas de realización, un nivel más alto de lo normal del eicosanoide es un indicio de NASH. En algunas formas de realización, el eicosanoides está seleccionado del grupo que consiste en 15-HETE; PGB<sub>2</sub>; PGE<sub>2</sub>; PGF<sub>2</sub>α; 15-ceto-PGF<sub>2</sub>α; 5-HETE; 8-HETE; 9-HETE; 11-HETE; 12-HETE; 12-HEPE; 11,12-EpETrE; y 8,9-DiHETrE.

En algunas formas de realización, las cantidades de los eicosanoides se determinan a partir de una muestra de sangre, suero, plasma o fracción de lipoproteína aislada.

#### 40 **Otros biomarcadores para esteatosis, NAFLD, NASH y/u otros trastornos hepáticos**

La invención proporciona adicionalmente, en algunas formas de realización, métodos en los que no sólo se determina en una muestra la cantidad de uno o más metabolitos lipídicos, tal como uno o más de los ácidos grasos y/o eicosanoides proporcionados en el presente documento, sino que también se determina la cantidad de uno o más biomarcadores adicionales.

Los siguientes biomarcadores adicionales pueden ayudar a diagnosticar la esteatosis, la NAFLD y la NASH:

- (1) malonil-CoA y malonilcarnitina (los niveles aumentan con el aumento de los niveles de triglicéridos en hígado);
- (2) acilcarnitinas, butirobetaína y carnitina libre que figuran en la Tabla 3 (los niveles disminuyen con el aumento de los niveles de triglicéridos en hígado) o en el ejemplo 6; y/o
- (3) los esteroides y ácidos biliares que figuran en la Tabla 4 (los niveles aumentan con el aumento de la síntesis de colesterol) o en el Ejemplo 6.

Pueden utilizarse fluido corporal y muestras de células para medir estos biomarcadores adicionales. Los ejemplos de muestras de células incluyen, pero no se limitan a, linfocitos y macrófagos.

Tabla 3. Lista de acilcarnitinas

L-Carnitina	Butirobetaina	Acetil carnitina
Propionil carnitina	Butiril carnitina	Hexanoil carnitina
Valeril carnitina	Octanoil carnitina	Decanoil carnitina
Miristoil carnitina	Palmitoil carnitina	Estearoil carnitina
Oleoil carnitina	Linoleoil carnitina	Araquidoil carnitina
Dodecanoil carnitina		

Tabla 4. Lista de ácidos biliares y esteroides

Ácido cólico	Ácido cenodesoxicólico	Ácido desoxicólico
Ácido litocólico	Ácido glicocólico	Taurodesoxicolato
Glicocenosodesoxicolato	Taurocenosodesoxicolato	Ácido $\beta$ -Muricólico
Ácido taurolitocólico	Ácido ursodesoxicólico	Ácido taurodesoxicólico
Ácido taurocólico	Ácido glicodesoxicólico	Ácido glicolitocólico
Ácido glicoursodesoxicólico	Colesterol	Coprostanol
Colestanol	Lanosterol	Latosterol
$\beta$ -Sitosterol	Desmosterol	Campesterol
Coprosterol	Latosterol	Campesterol
Estigmasferol	-4-Colesten-3-Ona	Fucosterol

Además, los siguientes biomarcadores adicionales pueden ayudar a diagnosticar la NASH distinguiéndola de la NAFLD:

(1) Los esteroides y ácidos biliares que figuran en la Tabla 4 (los niveles aumentan con el aumento de la síntesis de colesterol) o en el Ejemplo 6;

(2) Eicosanoides incluidos, pero no limitados a, los que se muestran en la Tabla 2 (anterior), en la Tabla 9 del Ejemplo 5, o en la Tabla 10 del Ejemplo 5; y/o

(3) Citocinas, citoqueratina, quimiocinas, adipocinas o leptinas incluidas, pero no limitadas a, TNF $\alpha$ , IL-6, CCL2/MCP-1 y CCL19 (los niveles aumentan en la NASH); IL-8, IL-18, citoqueratina 8 y citoqueratina 18 (los niveles disminuyen en la NASH).

Pueden utilizarse fluido corporal y muestras de células para medir los marcadores adicionales. Los ejemplos de muestras de células incluyen, pero no se limitan a, linfocitos y macrófagos.

Puede encontrarse información adicional sobre estos biomarcadores en: (citocinas) Haukeland JW, *et al.* Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol.* Junio de 2006;44(6):1167-74; y Abiru S, *et al.* Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.*, febrero de 2006;26(1):39-45; (malonil-CoA) Savage DB, *et al.* Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases I and 2. *J Clin Invest.* Marzo de 2006;116(3):817-24; y Hammond LE, *et al.* Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 is essential in liver for the metabolism of excess acyl-CoAs. *J Biol Chem.* 8 de julio de 2005;280(27):25629-36; (butirobetaina) Higashi Y, *et al.* Effect of gamma-butyrobetaine on fatty liver in juvenile visceral steatosis mice. *J Pharm Pharmacol.* Abril de 2001;53(4):527-33.

En los métodos de la invención pueden utilizarse las mediciones de las cantidades de uno o más de estos biomarcadores adicionales, además de la medición de un metabolito lipídico. En algunas formas de realización, se mide la cantidad de uno de los biomarcadores en una muestra del sujeto. En algunas formas de realización, se miden las cantidades de dos de los biomarcadores en una muestra del sujeto. En otras formas de realización, puede medirse 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 20, o más de los biomarcadores en una muestra del sujeto.

#### Métodos de diagnóstico y supervisión

Los métodos de la invención pueden utilizarse para diagnosticar la NAFLD o la NASH. Los métodos también pueden utilizarse para evaluar la gravedad de un trastorno hepático, supervisar un trastorno hepático y/o evaluar la evolución o la regresión de un trastorno hepático.

5 En algunas formas de realización, los métodos comprenden comparar la(s) cantidad(es) de uno o más metabolitos lipídicos con una o más referencias. En algunas formas de realización, una referencia representa el nivel normal del metabolito lipídico. En algunas formas de realización, una referencia es una cantidad de metabolito lipídico medida anteriormente para el mismo sujeto. En algunas formas de realización, la referencia es una cantidad  
10 relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los triglicéridos en una muestra de un fluido corporal obtenida previamente del sujeto. En algunas formas de realización, la referencia representa la cantidad relativa del uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los triglicéridos que se encuentran en una o más muestras de un fluido corporal de uno o más sujetos con hígados normales.

15 Por ejemplo, un método de diagnóstico puede comprender determinar una cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de una o más clases de lípidos en una muestra de un fluido corporal del sujeto, y correlacionar esa cantidad con la presencia del trastorno hepático. En algunas formas de realización, el método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad relativa es superior a la referencia, hay indicio de insuficiencia hepática, esteatosis hepática, NAFLD, esteatohepatitis o NASH. En algunas formas de realización, el método puede comprender adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa con una referencia, en el que si la cantidad  
20 relativa es inferior a la referencia, hay indicio de insuficiencia hepática, esteatosis hepática, NAFLD, esteatohepatitis o NASH.

25 Asimismo, puede medirse la gravedad del trastorno hepático, en el que la cantidad relativa indica la gravedad del trastorno hepático. Además, la cantidad relativa indica el estado actual del hígado, y por lo tanto puede supervisarse un trastorno hepático y/o evaluarse la evolución o regresión del trastorno. La cantidad relativa puede medirse en dos o más instantes de tiempo. En algunas formas de realización, la cantidad relativa puede medirse en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 20, o más instantes de tiempo. Cada instante de tiempo puede estar separado una o  
30 más horas, días, semanas o meses. Midiendo la cantidad relativa en más de un instante de tiempo, el médico puede evaluar la respuesta de un sujeto al tratamiento.

En algunas formas de realización, la cantidad relativa puede compararse con una referencia. En algunas formas de realización, si la cantidad relativa es superior a la referencia, hay indicio de insuficiencia hepática, esteatosis hepática, NAFLD, esteatohepatitis o NASH. En algunas formas de realización, si la cantidad relativa es inferior a la referencia, hay indicio de insuficiencia hepática, esteatosis hepática, NAFLD, esteatohepatitis o NASH. También puede utilizarse la diferencia entre la cantidad relativa y la referencia para indicar la gravedad. Por ejemplo, a medida que la cantidad relativa se hace cada vez mayor frente a la referencia, hay indicio de una creciente gravedad de la enfermedad. O, por ejemplo, a medida que la cantidad relativa se hace cada vez menor frente a la  
40 referencia, hay indicio de una creciente gravedad de la enfermedad. Las referencias ejemplares pueden basarse en la(s) cantidad(es) de un(os) metabolito(s) lipídico(s) de, pero no limitado(s) a, individuos con hígados normales, individuos con insuficiencia hepática, individuos con esteatosis, individuos con NAFLD, individuos con esteatohepatitis, individuos con NASH, individuos con cirrosis y/o individuos con fibrosis. La referencia también puede basarse en individuos con un trastorno hepático resultado de una causa concreta, por ejemplo, una o más de las que se encuentran más adelante. La referencia también puede basarse en muestras previamente obtenidas del sujeto, por ejemplo, antes de haberse desarrollado el trastorno hepático, antes de haber comenzado el tratamiento, una vez terminado el tratamiento y/o en diferentes instantes de tiempo durante el tratamiento. En algunas formas de realización, la referencia es la cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en una o más clases de lípidos en una o más muestras de un fluido corporal previamente obtenido del sujeto.  
50 En algunas formas de realización, la referencia representa la cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en una o más clases de lípidos en una o más muestras de un fluido corporal de uno o más sujetos con hígados normales.

55 En algunas formas de realización, el sujeto es un mamífero. En algunas formas de realización, el mamífero es un primate. En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano.

En algunas formas de realización, el método es un método de supervisión de un trastorno hepático que se utiliza para determinar la respuesta del sujeto al tratamiento.

## 60 **Causas de esteatosis, NAFLD, esteatohepatitis y NASH**

Los trastornos hepáticos de ácidos grasos que pueden beneficiarse de los métodos descritos en el presente documento pueden estar originados por diversos factores. Los ejemplos no limitativos incluyen: hepatitis; esteatosis inducida por agentes infecciosos virales o no virales, tales como la fiebre amarilla, el VIH, el VHB y el VHC; esteatosis de origen medicamentoso, tal como por tamoxifeno, inhibidores de la proteína desacopladora, isoniazida, rifampicina, fibratos y agonistas del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR); causas metabólicas,  
65

tal como la obesidad, el síndrome de ovario poliquístico (PCOS), la diabetes, la resistencia a la insulina y el trastorno metabólico; causas de origen alcohólico, tal como la hepatopatía grasa alcohólica y la esteatohepatitis alcohólica; enzimopatías congénitas o alteraciones genéticas, tales como la deficiencia de citrina, la hemocromatosis y la hiperferritinemia; causas inducidas por toxinas, tales como la esteatosis inducida por toxinas o la esteatohepatitis inducida por toxinas, por ejemplo, por tetracloruro de carbono; la desnutrición; la malabsorción de nutrientes; la enfermedad celíaca; la lipodistrofia; la cirugía bariátrica; y los trasplantes de hígado.

Por lo tanto, en algunas formas de realización, el trastorno hepático está asociado con una o más afecciones seleccionadas del grupo que consiste en: hepatitis, infección por VIH, infección por VHB, infección por VHC, esteatosis inducida por virus, esteatosis inducida por un agente infeccioso no viral, esteatosis de origen medicamentoso, obesidad, síndrome de ovario poliquístico (PCOS), diabetes, resistencia a la insulina, trastorno metabólico, hepatopatía grasa alcohólica, esteatohepatitis alcohólica, una enzimopatía congénita, una alteración genética, esteatosis inducida por toxinas, esteatohepatitis inducida por toxinas, desnutrición, malabsorción de nutrientes, enfermedad celíaca, lipodistrofia, cirugía bariátrica y un trasplante de hígado.

Los métodos de diagnóstico también pueden utilizarse para la evaluación de injertos hepáticos, la idoneidad de los individuos para la donación de injerto hepático, la evaluación antes de la cirugía bariátrica, la evaluación de los pacientes con cirugía bariátrica para evaluar la respuesta a la cirugía, y la evaluación de pacientes con pérdida de peso.

### Métodos de medición de metabolitos lipídicos y biomarcadores

Pueden realizarse ensayos para el contenido de metabolitos lipídicos en una muestra de fluido corporal. En algunas formas de realización, las cantidades de los metabolitos lipídicos se determinan a partir de la(s) muestra(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en sangre, plasma, suero, fracción de lipoproteína aislada, saliva, orina, líquido linfático y líquido cefalorraquídeo. En algunas formas de realización, los ensayos pueden realizarse en sangre completa, plasma, suero o fracciones de lipoproteínas aisladas. En algunas formas de realización, la(s) muestra(s) es (son) de plasma o suero. Los ensayos para los biomarcadores adicionales pueden realizarse en un fluido corporal o una muestra de células.

En algunas formas de realización, se miden múltiples metabolitos lipídicos diferentes en la misma muestra. En otras formas de realización, cada uno de los múltiples metabolitos lipídicos se mide a partir de una muestra diferente. Si se utilizan múltiples muestras, las muestras pueden ser de los mismos o diferentes fluidos corporales del sujeto.

Los metabolitos lipídicos y otros biomarcadores pueden aislarse y/o cuantificarse fácilmente mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, incluidos, pero no limitados a, métodos que utilizan: espectrometría de masas (MS), cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), HPLC isocrática, HPLC con gradiente, cromatografía de fase normal, HPLC de fase inversa, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis capilar, microfluidica, cromatografía, cromatografía de gases (GC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC), cromatografía de afinidad, inmunoensayos y/o ensayos colorimétricos. En algunas formas de realización, los métodos de la invención utilizan MS para determinar el contenido de metabolitos lipídicos. En algunas formas de realización, los métodos de la invención utilizan un inmunoensayo para determinar el contenido de metabolitos lipídicos. En algunas formas de realización, los métodos de la invención utilizan MS para determinar la concentración de un biomarcador. En algunas formas de realización, los métodos de la invención utilizan un inmunoensayo para determinar la concentración de un biomarcador.

Los expertos en la materia conocen diversos métodos de análisis, y se describen adicionalmente en los siguientes documentos: MS: Cyr D, *et al.* A GC/MS validated method for the nanomolar range determination of succinylacetone in amniotic fluid and plasma: an analytical tool for tyrosinemia type I. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Febrero de 2006 17;832(1):24-9; Vogeser M. Abstract Liquid chromatography-tandem mass spectrometry--application in the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med.* Febrero de 2003;41(2):117-26. HPLC: Khalil PN, *et al.* Validation and application of a high-performance liquid chromatographic-based assay for determination of the inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity in erythrocytes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 23 de mayo de 2006; Fouassier M, *et al.* Determination of serotonin release from platelets by HPLC and ELISA in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: comparison with reference method by [C]-serotonin release assay; *J Thromb Haemost.* Mayo de 2006;4(5):1136-9; Badiou S, *et al.* Determination of plasma amino acids by fluorescent derivatization and reversed-phase liquid chromatographic separation. *Clin Lab.* 2004;50(3-4):153-8; Brunelli T, *et al.* Comparison of three methods for total homocysteine plasma determination. *Clin Lab.* 2001;47(7-8):393-7. CE: Zinellu A, *et al.* Assay for the simultaneous determination of guanidinoacetic acid, creatinine and creatine in plasma and urine by capillary electrophoresis UV-detection. *J Sep Sci.* Marzo de 2006;29(5):704-8; Jabeen R, *et al.* Capillary electrophoresis and the clinical laboratory. *Electrophoresis.* 23 de mayo de 2006; Gao P, *et al.* Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by a combination of monoclonal antibody-coated latex and capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* Mayo de 2006;27(9):1784-9. Microfluidics: Johannessen EA, *et al.* A suspended membrane nanocalorimeter for ultralow volume bioanalysis. *IEEE Trans Nanobioscience.* Marzo de 2002;1(1):29-36;

Herrmann M, *et al.* Enzymatically-generated fluorescent detection in microchannels with internal magnetic mixing for the development of parallel microfluidic ELISA; Lab Chip. Abril de 2006;6(4):555-60. Epub 3 de marzo de 2006; Yang S, *et al.* Blood plasma separation in microfluidic channels using flow rate control. ASAIO J. septiembre-octubre de 2005;51(5):585-90; Dupuy AM, *et al.* Protein biochip systems for the clinical laboratory; Clin Chem Lab Med. 2005;43(12):1291-302. Chromatography: Paterson S, *et al.* Validation of techniques to detect illicit heroin use in patients prescribed pharmaceutical heroin for the management of opioid dependence. Addiction. Diciembre de 2005;100(12):1832-9; Bottcher M, *et al.* Evaluation of buprenorphine CEDIA assay versus GC-MS and ELISA using urine samples from patients in substitution treatment. J Anal Toxicol. Noviembre-diciembre de 2005;29(8):769-76; Julak J. Chromatographic analysis in bacteriologic diagnostics of blood cultures, exudates, and bronchoalveolar lavages. Prague Med Rep. 2005;106(2):175-94; Boettcher M, *et al.* Precision and comparability of Abuscreen OnLine assays for drugs of abuse screening in urine on Hitachi 917 with other immunochemical tests and with GC/MS. Clin Lab. 2000;46(1-2):49-52. Immunoassays: Boettcher M, *et al.* Precision and comparability of Abuscreen OnLine assays for drugs of abuse screening in urine on Hitachi 917 with other immunochemical tests and with GC/MS. Clin Lab. 2000;46(1-2):49-52; Westermann J, *et al.* Simple, rapid and sensitive determination of epinephrine and norepinephrine in urine and plasma by non-competitive enzyme immunoassay, compared with HPLC method. Clin Lab. 2002;48(1-2):61-71; Aoyagi K, *et al.* Performance of a conventional enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen in the early phases of hepatitis C infection. Clin Lab. 2001;47(3-4):119-27; Hubl W, *et al.* A multi-center quality control study of different CA15-3 immunoassays. Clin Lab. 2005;51(11-12):641-5; Haller CA, *et al.* Comparison of an automated and point-of-care immunoassay to GC-MS for urine oxycodone testing in the clinical laboratory. J Anal Toxicol. Marzo de 2006;30(2):106-11; Bayer M, *et al.* Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of neopterin. Clin Lab. 2005;51(9-10):495-504; Groche D, *et al.* Standardization of two immunological HbA1c routine assays according to the new IFCC reference method. Clin Lab. 2003;49(11-12):657-61; Ivan D, *et al.*; German KIMS Board. Applicability of recently established reference values for serum insulin-like growth factor 1: A comparison of two assays--an (automated) chemiluminescence immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Lab. 2005;51(7-8):381-7. Colorimetric assays: Kramer KA, *et al.* Automated spectrophotometric analysis of mitochondrial respiratory chain complex enzyme activities in cultured skin fibroblasts. Clin Chem. Noviembre de 2005;51(11):2110-6; Groche D, *et al.* Standardization of two immunological HbA1c routine assays according to the new IFCC reference method. Clin Lab. 2003;49(11-12):657-61; Wolf PL. History of diagnostic enzymology: A review of significant investigations. Clin Chim Acta. 24 de marzo de 2006.

También puede utilizarse la plataforma analítica TrueMass® para los métodos de la invención. TrueMass® es una plataforma analítica que puede utilizarse para obtener datos cuantitativos a partir de suero o plasma en aproximadamente 400 metabolitos individuales implicados en el metabolismo de los lípidos estructurales y energéticos, tal como el metabolismo de los triglicéridos, el éster de colesterol y los fosfolípidos. Esta plataforma es útil para determinar los perfiles de las enfermedades, ya que los lípidos estructurales y energéticos son componentes centrales del metabolismo y se integran en prácticamente todos los procesos biológicos del cuerpo. Un conjunto de datos para una muestra de plasma o suero comprende la medición cuantitativa de colesterol libre y los siguientes ácidos grasos de las fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, lisofosfatidilcolinas, triglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y ésteres de colesterol: 14:0, 15:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0, 14:1n5, 16:1n7, 16:1n7, 18:1n9, 18:1n9, 18:1n7, 18:2n6, 18:2n6, 18:3n6, 18:3n3, 18:4n3, 20:1n9, 20:2n6, 20:3n9, 20:3n6, 20:4n6, 20:3n3, 20:4n3, 20:5n3, 22:1n9, 22:2n6, 22:4n6, 22:5n3, 22:6n3, 24:1n9, 24:6n3 y derivados plasmalógenos de 16:0, 18:0, 18:1n9 y 18:1n7. Los expertos en la materia conocen los métodos para utilizar TrueMass®, y también se describen en los siguientes documentos: solicitud de patente de Estados Unidos Nº 11/296.829 (presentada el 12/6/05); Mutch DM, *et al.* An integrative metabolism approach identifies estearoil-CoA desaturase as a target for an arachidonate-enriched diet. FASEB J. Abril de 2005;19(6):599-601. Epub 24 de enero de 2005; Stone SJ, *et al.* Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. J Biol Chem. 19 de Marzo de 2004;279(12):11767-76; Watkins SM, *et al.* Phosphatidylethanolamine-N-methyltransferase activity and dietary choline regulate liver-plasma lipid flux and essential fatty acid metabolism in mice. J Nutr. Noviembre de 2003;133(11):3386-91; Watkins SM, *et al.* Lipid metabolome-wide effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone. Lipid Res. Noviembre de 2002;43(11):1809-17.

También pueden encontrarse ejemplos no limitativos de métodos adecuados en: la publicación de patente de EE.UU. Nº 2004/0143461 y la PCT con nº de publicación WO 03/005628, titulada "Generating, Viewing, Interpreting, and Utilizing a Quantitative Database of Metabolites"; Stanton, B. *et al.* Interaction of estrogen and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) with hepatic fatty acid synthesis and metabolism of male chickens (*Gallus domesticus*). Comp. Biochem. and Physiology parte C 129 (2001) 137-150; Watkins, S.M. *et al.* Unique Phospholipid Metabolism in Mouse Heart in Response to Dietary Docosahexaenoic or  $\alpha$ -Linoleic Acids. Lipids, vol. 36, No. 3 (2001) 247-254; y Bernhardt, T.G. *et al.* Purification of fatty acid ethyl esters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. J. of Chromatography B, 675 (1996) 189-196.

Como ejemplo no limitativo, el método puede incluir las siguientes etapas: extracción; separación de la clase de lípidos, preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos, y separación y cuantificación del esteroles y el ácido graso. Un método ejemplar no limitativo incluye las siguientes etapas: (1) Extracciones: se extraerán los lípidos de 200  $\mu$ l de plasma utilizando una extracción de Folch modificada en cloroformo:metanol (2:1 v/v) (Folch, J., M. Lees, *et al.* "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues". J Biol Chem 226(1): 497-509). Cada extracción se realiza en presencia de un panel de patrones internos auténticos cuantitativos. Los lípidos extraídos se concentran y se preparan para la separación mediante HPLC. (2) Separación de las clases

de lípidos: las clases de lípidos individuales se separan del extracto mediante HPLC utilizando diversos métodos. Cada clase de lípidos separada se recoge y se seca en atmósfera de nitrógeno para prepararla para la transesterificación. (3) Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos: las clases de lípidos se transesterifican en HCl metanólico 3 N en un vial sellado en atmósfera de nitrógeno a 100°C durante 45 minutos. Los ésteres metílicos de ácidos grasos resultantes se extraen de la mezcla con hexano y se preparan para la inyección automática para la cromatografía de gases sellando los extractos de hexano en atmósfera de nitrógeno. (4) Separación y cuantificación de ácido graso y esteroles: los ésteres metílicos de ácidos grasos se separan y se cuantifican mediante cromatografía capilar de gases utilizando un cromatógrafo de gases (Hewlett-Packard modelo 6890, Wilmington, DE) equipado con una columna capilar DB-225MS de 30 m (J&W Scientific, Folsom, CA) y un detector de ionización de llama.

En la cuantificación de los metabolitos lipídicos pueden utilizarse patrones internos o sustitutos. Los patrones sustitutos son conocidos en la técnica. Se describen patrones sustitutos ejemplares no limitativos, entre otras, en las páginas 16-17 y 25-31 de la publicación PCT N° WO 03/005628, titulada "Generating, Viewing, Interpreting, and Utilizing a Quantitative Database of Metabolites", y en la publicación de patente de EE.UU. N° US 2004/0143461.

También se proporcionan patrones sustitutos ejemplares no limitativos a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Patrones sustitutos auténticos ejemplares

Metabolito	Abreviatura	Sustituto
Triglicéridos	TGxx	TG17:1n7
Ésteres de colesterol	CExx	CE19:0
Ácidos grasos libres	FAxx	FA15:1n5
Diglicéridos	DGxx	DG17:0
Colesterol libre	FC	d7-Colesterol
Fosfatidilcolina	PCxx	PC17:0
Fosfatidiletanolamina	PExx	PE15:1n5
Lisofosfatidilcolina	LYxx	LY17:0
Esfingomielina	SMxx	SM15:1n5
Prostaglandina E <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub>	dPGE <sub>2</sub>
13,14-dihidro-15-ceto Prostaglandina A <sub>2</sub>	PGA <sub>2</sub> M	dPGB <sub>2</sub>
Prostaglandina B <sub>2</sub>	PGB <sub>2</sub>	dPGB <sub>2</sub>
Prostaglandina F <sub>2a</sub>	PGF <sub>2a</sub>	dPGF <sub>2a</sub>
15-ceto-Prostaglandina F <sub>2α</sub>	15-ceto-PGF <sub>2α</sub>	dPGF <sub>2α</sub>
6-ceto-Prostaglandina F <sub>1α</sub>	6-ceto-PGF <sub>1α</sub>	dPGF <sub>2α</sub>
Tromboxano B <sub>2</sub>	TXB <sub>2</sub>	dTXB <sub>2</sub>
11-dehidro-Tromboxano B <sub>2</sub>	11-DTXB <sub>2</sub>	d11-DTXB <sub>2</sub>
Prostaglandina D <sub>2</sub>	PGD <sub>2</sub>	dPGD <sub>2</sub>
Prostaglandina J <sub>2</sub>	PGJ <sub>2</sub>	dPGB <sub>2</sub>
15-desoxi-Δ12,14-Prostaglandina J <sub>2</sub>	PGJ <sub>2</sub> M	dPGB <sub>2</sub>
11β-Prostaglandina F <sub>2α</sub>	11β-PGF <sub>2α</sub>	dPGF <sub>2α</sub>
Ácido 5(S)-Hidroxieicosatetraenoico	5-HETE	d5-HETE
Ácido 5(S)-Hidroxieicosapentaenoico	5-HEPE	d15-HETE
Leucotrieno B <sub>4</sub>	LTB <sub>4</sub>	dLTB <sub>4</sub>
Leucotrieno B <sub>5</sub>	LTB <sub>5</sub>	dLTB <sub>4</sub>
Leucotrieno C <sub>4</sub>	LTC <sub>4</sub>	dLTB <sub>4</sub>
Leucotrieno D <sub>4</sub>	LTD <sub>4</sub>	dLTB <sub>4</sub>
Leucotrieno E <sub>4</sub>	LTE <sub>4</sub>	dLTB <sub>4</sub>
Leucotrieno F <sub>4</sub>	LTF <sub>4</sub>	dLTB <sub>4</sub>
Ácido 12(S)-Hidroxieicosatetraenoico	12-HETE	d12-HETE
Ácido 12(S)-Hidroxieicosapentaenoico	12-HEPE	d15-HETE
Ácido 15(S)-Hidroxieicosatetraenoico	15-HETE	d15-HETE
Ácido 15(S)-Hidroxieicosapentaenoico	15-HEPE	d15-HETE
Lipoxina A <sub>4</sub>	LXA <sub>4</sub>	dLTB <sub>4</sub>
Ácido 8(S)-Hidroxieicosatetraenoico	8-HETE	d12-HETE
Ácido 9-Hidroxieicosatetraenoico	9-HETE	d12-HETE
Ácido 11-Hidroxieicosatetraenoico	11-HETE	d15-HETE
8-iso-Prostaglandina F <sub>2α</sub>	8-iso-PGF <sub>2α</sub>	dPGF <sub>2α</sub>

5	Ácido 9-Hidroxiocetadecadienoico	9-HODE	d9-HODE
	Ácido 13-Hidroxiocetadecadienoico	13-HODE	d13-HODE
	Ácido 20(S)-Hidroxiicosatetraenoico	20-HETE	d15-HETE
	Ácido 9,10-Epoxioctadecenoico	9,10-EpOME	d15-HETE
10	Ácido 12,13-Epoxioctadecenoico	12,13-EpOME	d15-HETE
	Ácido 12,13-Dihidroxiocetadecenoico	12,13-DiHOME	d15-HETE
	Ácido 5,6-Epoxieicosatrienoico	5,6-EpETrE	d15-HETE
15	Ácido 11,12-Epoxieicosatrienoico	11,12-EpETrE	d15-HETE
	Ácido 14,15-Epoxieicosatrienoico	14,15-EpETrE	d15-HETE
	Ácido 5,6-Dihidroxiicosatrienoico	5,6-DiHETrE	d15-HETE
	Ácido 8,9-Dihidroxiicosatrienoico	8,9-DiHETrE	d15-HETE
20	Ácido 11,12-Dihidroxiicosatrienoico	11,12-DiHETErE	d5-HETE
	Ácido 14,15-Dihidroxiicosatrienoico	14,15-DiHETrE	d15-HETE
	Ácido 14,15-Epoxieicosatetraenoico	14,15-EpETE	d15-HETE
25	Ácido 17,18-Epoxieicosatetraenoico	17,18-EpETE	d15HT
	Ácido 14,15-Dihidroxiicosatetraenoico	14,15-DiHETE	d15HT
	Ácido 17,18-Dihidroxiicosatetraenoico	17,18-DiHETE	d15HT
30	Ácido 19,20-Dihidroxicosapentaenoico	19,20-DiHDPA	d15HT

### Kits

Se describen los kits para la puesta en práctica de los métodos de la invención. Los kits incluyen (a) uno o más reactivos para medir la cantidad de uno o más metabolitos lipídicos; y (b) instrucciones de uso. Un kit puede proporcionar 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, o más reactivos para medir la cantidad de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, o más metabolitos lipídicos. El kit puede proporcionar adicionalmente uno o más reactivos para medir uno o más biomarcadores adicionales, tales como los descritos anteriormente, y en las Tablas 2-4. En algunas formas de realización, el kit incluye uno o más reactivos para su uso en un inmunoensayo. En algunas formas de realización, el kit incluye uno o más reactivos para su uso en un ensayo de MS. En algunas formas de realización, el reactivo es un anticuerpo. Los expertos en la técnica conocen los métodos de fabricación de anticuerpos.

En el presente documento se describe un kit para su uso en cada uno de los métodos descritos en el presente documento, en el que el kit comprende (a) un anticuerpo contra un metabolito lipídico; y (b) instrucciones de uso. En algunas formas de realización, el kit comprende adicionalmente: (c) un segundo anticuerpo contra un segundo metabolito lipídico. En algunas formas de realización, los kits comprenden adicionalmente (D) un tercer anticuerpo contra un tercer metabolito lipídico. En algunas formas de realización, el metabolito lipídico primero, segundo y/o tercero es un ácido graso.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos:

### EJEMPLOS

#### MATERIALES Y MÉTODOS PARA LOS EJEMPLOS 1-3

#### **Poblaciones de estudio**

El primer conjunto de datos comprendía cuarenta y nueve (49) muestras de biopsia de hígado, que se sometieron a determinación de perfiles para determinar la composición de triglicéridos hepáticos y la correlación con las concentraciones de triglicéridos hepáticos. Entre estas muestras había ocho (8) sujetos clasificados como NASH, seis (6) sujetos clasificados como NAFLD y treinta y cinco (35) muestras normales según la evaluación de un examen patológico del tejido. Estas 49 muestras de hígado se obtuvieron de hombres y mujeres de diversas razas (blanca, negra y no definida). Nueve de los sujetos con hígado normal proporcionaron muestras de plasma coincidentes. Estas muestras se utilizaron para proporcionar una correlación entre el contenido de triglicéridos en hígado y metabolitos lipídicos en plasma.

Un segundo conjunto de datos incluía muestras de suero de ocho sujetos con insuficiencia hepática y ocho individuos normales (mediante biopsia hepática). Este conjunto de datos se utilizó para confirmar los hallazgos del análisis de la biopsia hepática.

## 5 **Métodos analíticos**

Se extrajeron los lípidos del plasma y los tejidos en presencia de patrones internos auténticos mediante el método de Folch *et al.* (Folch, J., *et al.* 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509) utilizando cloroformo-metanol (2:1, v/v). Para cada análisis se utilizaron 200  $\mu$ l de plasma. Se separaron las clases de lípidos individuales dentro de cada extracto mediante cromatografía preparativa en capa fina como se describe en Watkins, S.M., *et al.* 2001. "Unique phospholipid metabolism in mouse heart in response to dietary docosahexaenoic or  $\{\alpha\}$ -linolenic acids". *Lipids.* 36: 247-254. Se aplicaron puntualmente los compuestos patrones auténticos de las clases de lípidos en las dos calles exteriores de la placa de cromatografía en capa fina para permitir localizar las clases de lípidos de la muestra. Se raspó de la placa cada fracción lipídica y se transesterificó en HCl metanólico 3 N en un vial sellado en atmósfera de nitrógeno a 100°C durante 45 minutos. Los ésteres metílicos de ácidos grasos resultantes se extrajeron de la mezcla con hexano que contenía hidroxitolueno butilado al 0,05% y se prepararon para la cromatografía de gases sellando los extractos de hexano en atmósfera de nitrógeno.

Se separaron y cuantificaron los ésteres metílicos de ácidos grasos mediante cromatografía capilar de gases utilizando un cromatógrafo de gases (Hewlett-Packard modelo 6890, Wilmington, DE) equipado con una columna capilar DB-225MS de 30 m (J&W Scientific, Folsom, CA) y un detector de ionización de llama como se describe en Watkins, S.M., *et al.* 2001. "Unique phospholipid metabolism in mouse heart in response to dietary docosahexaenoic or  $\{\alpha\}$ -linolenic acids". *Lipids.* 36: 247-254.

Una vez generado un cromatograma, el software analítico (Atlas 2003; Thermo Electron Corporation) identificó cada analito metabolito lipídico de interés en base al patrón de referencia y generó un área bruta. El área bruta, los parámetros de forma de pico y el factor de respuesta para cada analito se exportaron a un sistema de gestión de la información, en el que se utilizó un algoritmo de integración para generar las áreas corregidas para cada analito de interés. Los datos cuantitativos se calcularon tomando la relación entre el área del pico del analito y el área del sustituto apropiado. Esta relación se multiplicó por la concentración del sustituto en la muestra original para generar datos en un microgramo por gramo de formato de muestra. A continuación, se dividió cada analito por su peso molecular y se multiplicó por 1.000 para calcular los nmoles de analito por gramo de muestra. Los datos de porcentaje en moles para cada clase de lípidos se calcularon dividiendo la concentración de cada ácido graso por la suma de las concentraciones de ácidos grasos dentro de esa clase.

## **Métodos estadísticos**

Rechazo de valores atípicos. Los metabolitos no detectados en más del 30% de los sujetos no se incluyeron en el análisis estadístico.

Datos. Se utilizaron los datos de porcentaje en moles no transformados para correlacionarlos con el contenido de triglicéridos hepáticos y también se utilizaron para la confirmación de los resultados en el estudio de insuficiencia hepática.

Correlaciones. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para evaluar la relación de cada metabolito con los triglicéridos hepáticos totales. Los metabolitos de la Tabla 6 se correlacionaron con los triglicéridos hepáticos totales ( $\alpha < 0,2$ ) y se compararon con las diferencias observadas en suero entre los individuos normales y con insuficiencia hepática. Los metabolitos que tuvieron un efecto contrario en los individuos con disfunción hepática (mediante un prueba de la *t* de Student para muestras no relacionadas en dos grupos: normal y con insuficiencia hepática) no se incluyeron en la Tabla 6.

## EJEMPLO 1

### 55 CORRELACIÓN DE LAS COMPOSICIONES DE ÁCIDOS GRASOS EN PLASMA Y EN HÍGADO

Se descubrió que podían ensayarse metabolitos lipídicos expresados como un porcentaje de composición de clases de lípidos, que se correlacionan con el contenido de triglicéridos hepáticos, a partir de sangre. Para determinar el potencial de las mediciones hemáticas para reflejar con precisión las composiciones de ácidos grasos de la clase de lípidos hepáticos, se correlacionaron las composiciones de ácidos grasos de las clases de lípidos individuales a partir de muestras de plasma-hígado emparejadas de seres humanos normales (del primer conjunto de sujetos). La correlación entre la composición de plasma sanguíneo e hígado era excelente para las clases de triglicéridos y fosfatidilcolina, y en parte bueno para la clase de ésteres de colesterol (Fig. 2). Esto indicaba que la composición de ácidos grasos del plasma sanguíneo de triglicérido y fosfatidilcolina era un indicador preciso de la composición de ácidos grasos en hígado de los triglicéridos y la fosfatidilcolina, respectivamente. Por lo tanto, las mediciones basadas en plasma sanguíneo de ácidos grasos pueden indicar la cantidad cuantitativa de triglicéridos

en el hígado (esteatosis), siempre que los datos de la composición en hígado se correlacionen bien con la esteatosis.

5 Se identificaron 15-20 marcadores de esteatosis proporcionales en las biopsias de hígado humano que proporcionaron una excelente clasificación y que eran coherentes con una sola ruta de biosíntesis de lípidos, y predictivos del contenido de triglicéridos en hígado. En la Figura 4 se muestra la curva de eficacia diagnóstica (ROC) para el TG20:4n6 en hígado.

#### 10 EJEMPLO 2

#### CORRELACIÓN ENTRE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA Y LAS COMPOSICIONES DE ÁCIDOS GRASOS HEPÁTICOS

15 En este experimento se utilizó el primer conjunto de datos. Las muestras de hígado de 49 sujetos se clasificaron en función del grado de esteatosis hepática e inflamación. Seis sujetos se clasificaron como NAFLD y ocho sujetos se clasificaron como NASH. Se supuso que todas las demás muestras eran normales. Se determinaron los perfiles de las muestras utilizando la tecnología TrueMass®; muchos metabolitos resultaron correlacionarse positivamente o negativamente con las concentraciones totales de triglicéridos hepáticos. En concreto, los ácidos grasos monoinsaturados se correlacionan en general positivamente con la esteatosis y los ácidos grasos esenciales se correlacionaron en general negativamente con la esteatosis. Un ejemplo de un metabolito que se correlacionaba bien con los triglicéridos hepáticos totales fue el ácido graso 20:4n6, expresado como un porcentaje de todos los ácidos grasos presentes en los triglicéridos (Fig. 3).

25 La Figura 3 muestra la relación entre las concentraciones de triglicéridos hepáticos (nmoles/g) y la proporción relativa de 20:4n6 en los triglicéridos hepáticos (expresado como un porcentaje en moles de ácidos grasos totales de los triglicéridos). La proporción relativa de TG20:4n6 era una excelente variable independiente de la concentración total de triglicéridos en hígado. A pesar de estar clasificadas como normales, varias muestras normales presentaron NAFLD-niveles de triglicéridos, y la proporción relativa de 20:4n6 siguió siendo una excelente variable independiente de las concentraciones totales de triglicéridos.

#### 30 EJEMPLO 3

#### MARCADORES DE NAFLD Y NASH

35 Los marcadores metabolitos de NAFLD y NASH de la Tabla 6 se seleccionaron en base a su correlación observada y/o predicha con el contenido total de triglicéridos del hígado. Además, estos marcadores mostraron cierta correlación útil en la clasificación de los 16 sujetos ensayados con función hepática normal o insuficiencia hepática.

40

45

50

55

60

65

Tabla 6. Marcadores metabolitos lipídicos hemáticos de esteatosis hepática (en base a porcentaje en moles)

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

<u>Clase de lípidos</u>	<u>Se correlaciona positivamente</u>	<u>Se correlaciona negativamente</u>
<b>Triglicéridos</b>	TG14:0	TG15:0
	TG14:1n5	TG18:2n6
	TG16:0	TG18:3n3
	TG18:1n7	TG20:0
	TGMUFA	TG20:2n6
	TGn7	TG20:3n6
	TGSFA	TG20:3n9
	TG16:1n7	TG20:4n6
		TG20:5n3
		TG22:0
		TG22:1n9
		TG22:2n6
		TG22:4n6
		TG22:5n3
		TG22:5n6
		TG22:6n3
	TG24:0	
	TG24:1n9	
	TGn3	
	TGn6	

ES 2 527 438 T3

		TGPUFA
	<b>Ácidos grasos libres</b>	FA16:1n7
5	<b>Fosfatidilcolinas</b>	PC14:0
		PC18:1n7
		PC16:1n7
		PC20:4n6
		PC18:1n7
10		PC22:5n6
		PC18:1n9
		PCn6
		PC18:3n3
		PCPUFA
		PC18:3n6
		PC22:5n3
15		PC18:4n3
		PC20:0
		PC20:1n9
		PC20:2n6
20		PC20:3n6
		PC20:4n3
		PC20:5n3
25		PC22:0
		PC22:1n9
		PC24:0
30		PC24:1n9
		PCdm
		PCdm18:0
35		PCdm18:1n7
		PCSFA
	<b>Fosfatidiletanolaminas</b>	PE20:4n6
40	<b>Ésteres de colesterol</b>	CE16:1n7
		CE14:1n5
		CE18:1n7
		CE18:0
		CE18:1n9
		CE20:0
45		CE18:2n6
		CE20:1n9
		CE18:3n6
		CE20:2n6
		CE22:5n3
		CE20:3n9
		CE22:6n3
50		CE20:4n3
		CEMUFA
		CE20:4n6
		CEn6
		CE22:0
		CEn7
		CE22:2n6
55		CEPUFA
		CE24:0
		CE14:0
		CESFA
	<b>Ácidos grasos totales</b>	14:0
60		15:0
		16:0
		20:0
		18:0
		22:0
		16:1n7
		18:2n6

65

	18:1n7	20:2n6
	18:1n9	20:3n9
5	18:3n6	20:4n3
	18:4n3	20:4n6
	18:4n3	22:4n6
10		22:5n6

## EJEMPLO 4

## 15 MARCADORES ÁCIDOS GRASOS DE NAFLD Y NASH EN PLASMA

**Población de estudio**

20 Se recogieron un conjunto de muestras plasmáticas de NASH, NAFLD y de control normales para examinar las diferencias en la composición lipídica en plasma. Hubo 30 pacientes con NASH, 7 pacientes con NAFLD y 12 controles normales.

**Métodos analíticos**

25 Se cuantificaron los metabolitos lipídicos a partir de muestras de hígado, suero y plasma en ayunas. Los lípidos medidos incluyeron colesterol, ésteres de colesterol (CE), diglicéridos (DG), colesterol libre (FS), ácidos grasos libres (FA), lisofosfatidilcolina (LY), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y triglicéridos (TG). Para las clases de lípidos CE, DG, FA, LY, PC, PE y TG se cuantificaron los siguientes componentes de los ácidos grasos  
 30 14:0, 15:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0, 14:1n5, 16: 1n7, 18:1n7, 18:1n9, 20:1n9, 20:3n9, 22:1n9, 24:1n9, 18:2n6, 18:3n6, 20:2n6, 20:3n6, 20:4n6, 22:2n6, 22:4n6, 22:5n6, 18:3n3, 18:4n3, 20:3n3, 20:4n3, 20:5n3, 22:5n3, 22:6n3, 24:6n3, derivados plasmalógenos de 16:0, 18:0, 18:1n7 y 18:1n9, t16:1n7 t18:1n9 t18:2n6. En este ejemplo, el término "LC" indica que el valor mostrado es la concentración total de la clase de lípidos expresada como nmoles por gramo de suero o plasma. Por lo tanto, en este ejemplo, la abreviatura PC18:2n6 indica el porcentaje de fosfatidilcolina en plasma o suero compuesta de ácido linoleico (18:2n6), el término TGLC indica la cantidad absoluta (en nmoles por gramo) de triglicérido presente en plasma o suero.

40 Los lípidos de la muestra se extrajeron en presencia de patrones sustitutos auténticos para cada clase de lípidos mediante una extracción líquido:líquido, creando un extracto lipídico. La masa de la muestra y del sustituto se registró en esta etapa con el fin de determinar con precisión la cantidad de material analizado. Se utilizó la masa de la muestra y de los patrones sustitutos para calcular la cantidad cuantitativa de cada ácido graso en cada clase de lípidos.

45 Las clases fosfolípidos y lípidos neutros se separaron entre sí mediante una extracción en fase sólida con un colector de vacío Vac Elut 20 de Varian y cartuchos SPE preparado con sílice LC-SI de Supelco. Una vez preparados estos extractos, se separaron las clases de lípidos neutros mediante cromatografía preparativa en capa fina sobre placas de TLC de gel de sílice G-60. Las clases de fosfolípidos se separaron mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento en un HPLC serie 1100 de Agilent, con una columna Sperex 5u OH Diol de Phenomenex (250 x 4,6 mm, 5 micrómetros) y un detector evaporativo de dispersión de luz SEDEX 75. Una vez aislada cada clase, la clase de lípidos se transesterificó con ácido sulfúrico al 1% en metanol, lo que dio como resultado la formación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). La mezcla de FAME para cada clase se separó y se cuantificó mediante cromatografía capilar de gases (GC) en un GC6890 de Agilent, con una columna capilar de sílice fundida HP-88 de J&W Scientific (30 m x 25 um, película de 0,2 um) y un detector de ionización de llama.

55 **Métodos estadísticos**

60 Se evaluaron los datos de porcentaje en moles y las concentraciones de la clase de lípidos para los marcadores de NAFLD y NASH. Los datos no se transformaron para el análisis. Los metabolitos no detectados en más del 30% de los sujetos no se incluyeron en el análisis estadístico. Se utilizaron pruebas de la *t* bilaterales para comparar los grupos (NASH frente a Normales, y NASH frente a Normales).

**Resultados**

65 Las Tablas 7 y 8 muestran los marcadores asociados significativamente con la NASH y la NAFLD, respectivamente. La mayoría de las clases de lípidos en los sujetos con NASH y NAFLD no difirieron significativamente de la normalidad. La fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina estaban significativamente reducidas

en la NASH con respecto a la normalidad (valores de p de la prueba de la *t*: 0,001; 0,021). La fosfatidilcolina y la lisofosfatidilcolina estaban significativamente reducidas en la NAFLD con respecto a la normalidad (valores de p de la prueba de la *t*: 0,05; 0,042). Se obtuvieron resultados muy similares a partir del ensayo no paramétrico de Wilcoxon.

5 Los ácidos grasos Omega 3 estaban reducidos, especialmente el DHA, en los sujetos con NASH con respecto a los controles normales. Se observaron disminuciones en DHA en la NASH con respecto a los controles normales, tanto cuantitativamente como en términos de composición en CE, PC y PE. El DHA estaba significativamente reducido en la NASH en FA, LY y TG sólo en cuanto a la composición. El 18:3n3 estaba significativamente reducido en PC, tanto cuantitativamente como en términos de composición, mientras que sólo estaba significativamente reducido en términos de composición en los ácidos grasos libres. El 22:5n3 estaba significativamente aumentado en términos de composición en PC en la NASH y la NAFLD con respecto a los sujetos normales.

15 Si bien el 18:2n6 estaba cuantitativamente reducido de manera significativa en los fosfolípidos en la NASH y la NAFLD con respecto a los sujetos normales, el 20:3n6, estaba significativamente aumentado en CE, FA y TG. En términos de composición, el 18:2n6 estaba significativamente reducido sólo en LY, mientras que el 20:3n6 estaba aumentado en todas las clases de lípidos, excepto DG en la NASH y la NAFLD con respecto a los sujetos normales.

20 Los ácidos grasos saturados estaban significativamente aumentados en la NASH con respecto a los controles normales en PE, PC y DG. Los sujetos con NAFLD también tendían a tener ácidos grasos saturados más elevados que los controles normales. En términos de composición, sólo el 18:0 estaba aumentado en la NASH y la NAFLD en CE, LY y PC.

25 **Tabla 7. Marcadores de NASH (la significación estadística en la prueba de la *t* a un valor de p de 0,1 se muestra entre paréntesis)**

Clase de lípidos	Aumentado con respecto a la normalidad	Reducido con respecto a la normalidad
<b>Diacilglicerol</b>	DG20:3n6 (0,0868) DG22:Sn6 (0,0418)	
<b>Triacilglicerol</b>	TG 18:1n7 (0,0709) TG20:3n6 (0,0025)	TG18:3n3 (0,0934) TG20:3n9 (0,0999) TG22:6n3 (0,0364) TG24:0 (0,0602)
<b>Ácido grasos libre</b>	FA18:1n7 (0,0015) FA18:1n9 (0,0018) FA20:3n6	FA16:0 (0,0448) FA18:3n3 (0,0051) FA22:6n3 (0,0018)
<b>Fosfolípidos</b>	PC118:0 (0,004) PC18:3n6 (0,0181) PC20:3n6 (0,0001) PC20:4n3 (0,0219) PC22:1n9 (0,0503) PC22:4n6 (0,0002) PC22:5n3 (0,016) PC22:5n6 (0,0147) PCdm18:1n7 (0,0805) PE18:3n6 (0,0409) PE20:1n9 (0,0432) PE20:3n6 (0,0044) PE22:4n6 (0,0016) PE22:5n3 (0,0694)	PCLC (0,001) PC18:3n3 (0,0378) PC22:6n3 (0,0405) PELC (0,0211) PE14:0 (0,0674) PE22:6n3 (0,0025)

5	<b>Ésteres de colesterol</b>	CE18:0 (0,0266) CE18:1n7 (0,0986) CE18:3n6 (0,0752) CE20:3n6 (0,0001) CE24:0 (0,0855)	CE22:6n3 (0,0345)
10	<b>Esfingomielina</b>	SP16:1n7 (0,0695) SP18:0 (0,0994) SP20:3n6 (0,0112) SP22:1n9 (0,0038)	SP22:6n3 (0,0651)
15	<b>Lisofosfatidilcolina</b>	LY16:0 (0,0557) LY18:0 (0,0031) LY20:3n6 (0,0076) LY20:3n9 (0,0737) LY20:4n3 (0,0441)	LY18:1n7 (0,086) LY18:1n9 (0,036) LY18:2n6 (0,0004) LY18:3n3 (0,0703) LY22:6n3 (0,0323)

25 **Tabla 8. Marcadores de NAFLD (la significación estadística en la prueba de la t a un valor de p de 0,1 se muestra entre paréntesis)**

30	<b>Clase de lípidos</b>	<b>Aumentado con respecto a la normalidad</b>	<b>Reducido con respecto a la normalidad</b>
	<b>Diacilglicerol</b>	DG20:3n6 (0,0516)	DG22:1n9 (0,0304)
35	<b>Triacilglicerol</b>	TG20:3n6 (0,0226) TG22:5n3 (0,0814)	TG22:2n6 (0,0702)
40	<b>Ácidos grasos libres</b>	FA18:1n9 (0,0192) FA20:3n6 (0,0244) FA22:5n3 (0,0166)	
45	<b>Fosfolípidos</b>	PC18:0 (0,006) PC18:3n6 (0,0156) PC20:3n6 (0,0003) PC20:4n3 (0,0214) PC22:5n3 (0,0037)	PCLC (0,0315) PC18:1n7 (0,0058) PC18:2n6 (0,0714) PC20:2n6 (0,0035)
50	<b>Ésteres de colesterol</b>	CE18:3n6 (0,0139) CE20:3n6 (0,0018)	
	<b>Esfingomielina</b>	SP20:3n6 (0,0164)	SP16:0 (0,037)
55	<b>Lisofosfatidilcolina</b>	LY 15:0 (0,0659) LY 18:0 (0,0959) LY20:3n6 (0,0004)	LYLC (0,0419) LY18:1n7 (0,0017) LY18:2n6 (0,0025)

60 Contrariamente a lo que se identificó en el Ejemplo 3, en este estudio concreto, se descubrió que los siguientes metabolitos no estaban asociados positivamente con la esteatosis: PC20:2n6, PC18:1n7 y CE22:6n3. Además, en este estudio, contrariamente a lo que se identificó en el Ejemplo 3, se descubrió que los siguientes metabolitos no estaban asociados negativamente con la esteatosis: TG20:3n6, TG22:5n3 y PC22:5n3.

65 EJEMPLO 5

MARCADORES EICOSANOIDES DE NAFLD Y NASH EN PLASMA

**Población de estudio**

Se utilizó un subconjunto de la población de estudio utilizada en el Estudio Tres para determinar las diferencias en la composición lipídica de eicosanoides entre sujetos con NASH, NAFLD y normales. Hubo 26

5

**Métodos analíticos**

Se extrajeron los eicosanoides de 250 µl de plasma o suero mediante precipitación de proteínas y filtrado antes de cargarlos en un LC/MS. Se añadieron a cada muestra veinte microlitros de una mezcla de sustitutos deuterados para la cuantificación y se mezclaron bien. Se añadieron a cada muestra de plasma/suero, 10 µl de solución antioxidante (0,2 mg/ml BHT.EDTA en MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50) y se mezcló bien. La precipitación de proteínas se llevó a cabo añadiendo a cada muestra 1 ml de metanol, seguido de mezcla. Las muestras se centrifugaron a -4°C y 17.000 g durante 10 minutos. Los sobrenadantes se secaron en atmósfera de nitrógeno durante 2 horas a 10 psi. Las muestras secas se reconstituyeron con 60 µl de metanol:agua desionizada (50:50). Después de mezclar, las muestras se transfirieron a viales silanizados para muestreador automático para el análisis LC/MSMS. Las muestras se inyectaron en una columna C18 Stable Bond de Agilent (150 x 2,1 mm, 1,8 micrómetros) conectada a un 4000 QTRAP de Applied Biosystems. Los analitos se ionizaron mediante electronebulización negativa y el espectrómetro de masas se operó en el modo MS en tándem.

10

15

20

En la siguiente Tabla 9 se proporcionan las abreviaturas para varios eicosanoides.

Tabla 9. Eicosanoides

25

Metabolito	Abreviatura
Prostaglandina E <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub> o PGE2
13,14-dihidro-15-ceto Prostaglandina A <sub>2</sub>	PGA <sub>2</sub> M o PGA2M
Prostaglandina B <sub>2</sub>	PGB <sub>2</sub> o PGB2
Prostaglandina F <sub>2a</sub>	PGF <sub>2α</sub> o PGF2α
15-ceto-Prostaglandina F <sub>2α</sub>	15-ceto-PGF <sub>2α</sub> o 15-ceto-PGF2α
6-ceto-Prostaglandina F <sub>1α</sub>	6-ceto-PGF <sub>1α</sub> o 6-ceto-PGF1α
Tromboxano B <sub>2</sub>	TXB <sub>2</sub> o TXB2
11-deshidro-Tromboxano B <sub>2</sub>	11-DTXB <sub>2</sub> o 11-DTXB2
Prostaglandina D <sub>2</sub>	PGD <sub>2</sub> o PGD2
Prostaglandina J <sub>2</sub>	PGJ <sub>2</sub> o PGJ2
15-desoxi-Δ12,14-Prostaglandina J <sub>2</sub>	PGJ <sub>2</sub> M o PGJ2M
11β-Prostaglandina F <sub>2α</sub>	11β-PGF <sub>2α</sub> o 11β-PGF2α
ácido 5(S)-Hidroxieicosatetraenoico	5-HETE
ácido 5(S)-Hidroxieicosapentaenoico	5-HEPE
Leucotrieno B <sub>4</sub>	LTB <sub>4</sub> o LTB4
Leucotrieno B <sub>5</sub>	LTB <sub>5</sub> o LTB5
Leucotrieno C <sub>4</sub>	LTC <sub>4</sub> o LTC4
Leucotrieno D <sub>4</sub>	LTD <sub>4</sub> o LTD4
Leucotrieno E <sub>4</sub>	LTE <sub>4</sub> o LTE4
Leucotrieno F <sub>4</sub>	LTF <sub>4</sub> o LTF4
ácido 12(S)-Hidroxieicosatetraenoico	12-HETE
ácido 12(S)-Hidroxieicosapentaenoico	12-HEPE

30

35

40

45

50

55

60

65

5	ácido 15(S)-Hidroxieicosatetraenoico	15-HETE
	ácido 15(S)-Hidroxieicosapentaenoico	15-HEPE
	Lipoxina A <sub>4</sub>	LXA <sub>4</sub> o LXA4
	ácido 8(S)-Hidroxieicosatetraenoico	8-HETE
10	ácido 9-Hidroxieicosatetraenoico	9-HETE
	ácido 11-Hidroxieicosatetraenoico	11-HETE
	8-iso-Prostaglandina F <sub>2α</sub>	8-iso-PGF <sub>2α</sub> o 8-iso-PGF2a
	ácido 9-Hidroxiotadecadienoico	9-HODE
15	ácido 13-Hidroxiotadecadienoico	13-HODE
	ácido 20(S)-Hidroxieicosatetraenoico	20-HETE
	ácido 9,10-Epoxioctadecenoico	9,10-EpOME
20	ácido 12,13-Epoxioctadecenoico	12,13-EpOME
	ácido 12,13-Dihidroxiotadecenoico	12,13-DiHOME
	ácido 5,6-Epoxieicosatrienoico	5,6-EpETrE
25	ácido 11,12-Epoxieicosatrienoico	11,12-EpETrE
	ácido 14,15-Epoxieicosatrienoico	14,15-EpETrE
	ácido 5,6-Dihidroxiieicosatrienoico	5,6-DiHETrE
	ácido 8,9-Dihidroxiieicosatrienoico	8,9-DiHETrE
30	ácido 11,12-Dihidroxiieicosatrienoico	11,12-DiHETrE
	ácido 14,15-Dihidroxiieicosatrienoico	14,15-DiHETrE
	ácido 14,15-Epoxieicosatetraenoico	14,15-EpETE
35	ácido 17,18-Epoxieicosatetraenoico	17,18-EpETE
	ácido 14,15-Dihidroxiieicosatetraenoico	14,15-DiHETE
	ácido 17,18-Dihidroxiieicosatetraenoico	17,18-DiHETE
40	ácido 19,20-Dihidroxidocosapentaenoico	19,20-DiHDPa

### Métodos estadísticos

Se evaluaron los datos cuantitativos (pmoles por gramo de plasma) para los marcadores de NAFLD y NASH. Los datos cuantitativos no se transformaron para el análisis. Los metabolitos no detectados en más del 30% de los sujetos no se incluyeron en el análisis estadístico. Se utilizaron pruebas de la *t* bilaterales para comparar los grupos (NASH frente a Normales y NASH frente a Normales).

### Resultados

La tabla 10 muestra los metabolitos eicosanoides que estaban asociados significativamente con la NASH y la NAFLD. El grupo con NAFLD tenía la 13,14-dihidro-15-ceto Prostaglandina A<sub>2</sub>, el 11-deshidro-Tromboxano B<sub>2</sub> y el ácido 12,13-Dihidroxiotadecenoico significativamente más elevados. El ácido 19,20-Dihidroxidocosapentaenoico estaba significativamente reducido según la prueba de la *t*, pero no alcanzó significación estadística mediante el ensayo de Wilcoxon.

El grupo con NASH tenía la prostaglandina E<sub>2</sub>, la 15-ceto-prostaglandina F<sub>2α</sub> y el leucotrieno D<sub>4</sub> significativamente más elevados según la evaluación del ensayo de Wilcoxon, pero no alcanzaron significación estadística mediante la prueba de la *t*. Los HETE, incluidos 5-HETE, 8-HETE, 9-HETE, 11-HETE, 12-HETE y 15-HETE, estaban significativamente aumentados en la NASH frente a la normalidad en ambos ensayos. El 11-HETE y 15-HETE estaban anticorrelacionados linealmente, pero más fuertemente anticorrelacionados en una escala logarítmica, con el DHA en algunas clases de lípidos.

65

**Tabla 10. Marcadores de NASH Y NAFLD (la significación estadística en la prueba de la *t* a un valor de *p* de 0,1 se muestra entre paréntesis)**

NASH		NAFLD	
Aumentado	Reducido	Aumentado	Reducido
PGB <sub>2</sub> (0,0815)	19,20-DiHDPA (0,063)	15-HETE (0,0937)	PGA <sub>2</sub> M (0,0296)
PGE <sub>2</sub> (0,0627)			6-ceto-PGF <sub>1α</sub> (0,0896)
PGF <sub>2α</sub> (0,0542)			11-DTXB <sub>2</sub> (0,0027)
15-ceto-PGF <sub>2α</sub> (0,0603)			12,13-DiHOME (0,009)
5-HETE (0,019)			9,10-EpOME (0,0785)
8-HETE (0,0012)			12,13-EpOME (0,0977)
9-HETE (0,0031)			19,20-DiHDPA (0,0297)
11-HETE (0,0001)			8-iso-PGF <sub>2α</sub> (0,0976)
12-HETE (0,0206)			
15-HETE (0,0001)			
12-HEPE (0,0902)			
11,12-EpETrE (0,0744)			
8,9-DiHETrE (0,0004)			

## EJEMPLO 6

## CLASIFICACIONES BASADAS EN COMBINACIONES DE MARCADORES

Pueden construirse ensayos diagnósticos para NASH directamente a partir de los metabolitos marcadores descritos o a partir de combinaciones simples de estos marcadores. Puesto que cada aplicación diagnóstica requiere características de rendimiento únicas, las concentraciones de metabolitos pueden combinarse en algoritmos simples para proporcionar la sensibilidad y la especificidad necesarias para un ensayo concreto deseado.

Se utilizaron los resultados del Ejemplo 4 y del Ejemplo 5 para desarrollar clasificadores para distinguir la NASH de la NAFLD y sujetos normales. Se evaluaron combinaciones lineales de pares de metabolitos por su capacidad para clasificar la NASH frente a la NAFLD utilizando una curva de eficacia diagnóstica (ROC). Las características de rendimiento evaluadas en este experimento incluyeron el área bajo la curva ROC (ROC AUC), la sensibilidad y la especificidad del ensayo. En la Tabla 11, más adelante, se muestran ejemplos de combinaciones que proporcionaron sensibilidad y especificidad globales (Combinación 1), gran sensibilidad con menor especificidad (Combinaciones 2 y 3) y gran especificidad con menor sensibilidad (Combinaciones 4 y 5).

A pesar de elegirse una combinación lineal de metabolitos como método algorítmico para este ejemplo, puede utilizarse cualquier algoritmo (incluidas relaciones, etc.) para generar una variable de ensayo a partir de los metabolitos reivindicadas.

**Tabla 11. Rendimiento de las combinaciones lineales de metabolitos en la clasificación de la NASH frente a la NAFLD y sujetos normales**

	Par de metabolitos	ROC AUC	Sensibilidad	Especificidad	Umbral
1.	15-HETE   15-ceto-PGF <sub>2α</sub>	0,90	0,88	0,94	0,58
2.	TG18:1n7   PC20:3n6	0,81	0,97	0,58	0,34
3.	11-HETE   CE22,6n3	0,82	1,00	0,56	0,34
4.	11-HETE   PCTL	0,87	0,60	1,00	0,81
5.	PC22:6n3   PC18:3n3	0,83	0,60	1,00	0,74

El rendimiento del ensayo deseado dependerá de la aplicación (por ejemplo, si un sujeto va a someterse a un procedimiento invasivo en base al ensayo, lo más útil puede ser garantizar un alto grado de especificidad). El rendimiento del ensayo puede modularse eligiendo los componentes metabolitos individuales del algoritmo y el umbral (valor crítico) para la clasificación. Los metabolitos elegidos para incluirse en el algoritmo pueden ser cualquiera de los marcadores eicosanoides o ácidos grasos descritos en el presente documento o cualquiera de las siguientes acilcarnitinas, esteroides, ácidos biliares u oxisteroides: **Metabolitos carnitina y acilcarnitinas:** L-carnitina, g-butirotbetaína; trimetillisina; acetilcarnitina; propionilcarnitina; butirilcarnitina; valerilcarnitina; hexanoilcarnitina; octanoilcarnitina; decanoilcarnitina; dodecanoilcarnitina; miristoilcarnitina; palmitoilcarnitina; estearoilcarnitina; oleoilcarnitina; linoleoilcarnitina. **Esteroides, ácidos biliares y oxisteroides:** colesterol; 7-deshidrocolesterol; desmosterol; lanosterol; latasterol; colestanol; coprostanol; b-sitosterol; campesterol; estigmasterol; 4-colesten-7a-ol-3-ona; 7a-hidroxicolesterol; 27-hidroxicolesterol; 25-hidroxicolesterol; 24S-hidroxicolesterol; 4b-hidroxicolesterol; ácido cólico; ácido quenodesoxicólico; ácido desoxicólico; ácido litocólico; ácido glicólico; ácido glicoquenodesoxicólico; ácido glicodesoxicólico; ácido glicolitocólico; ácido taurocólico; ácido tauroquenodesoxicólico; ácido taurodesoxicólico; ácido taurolitocólico; ácido ursodesoxicólico; ácido glicoursodesoxicólico.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar o supervisar la hepatopatía grasa no alcohólica (NAFLD) o la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en un paciente humano, que comprende:

(A) determinar una cantidad de dos o más metabolitos lipídicos en una o más muestras seleccionadas del grupo que consiste en muestras de sangre, plasma y suero; y

(B) correlacionar las cantidades de los dos o más metabolitos lipídicos con la presencia de NAFLD o NASH; en el que los metabolitos lipídicos comprenden un par de metabolitos lipídicos seleccionados del grupo que consiste en:

(i) 15-HETE y 15-ceto-PGF<sub>2α</sub>;

(ii) TG18:1n7 y PC20:3n6;

(iii) 11-HETE y CE22.6n3;

(iv) 11-HETE y PCTL; y

(v) PC22:6n3 y PC18:3n3; y

en el que los metabolitos lipídicos 15-HETE, TG18:1n7, PC20:3n6 y PC18:3n3 están asociados positivamente con la NAFLD; los metabolitos lipídicos 15-HETE, 15-ceto-PGF<sub>2α</sub>, TG18:1n7, PC20:3n6, 11-HETE y PC18:3n3 están asociados positivamente con la NASH; y los metabolitos lipídicos PC22:6n3 y CE22.6n3 están asociados negativamente con la NASH.

2. Método según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente realizar las etapas (A) y (B) con uno o más metabolitos lipídicos seleccionados del grupo que consiste en: PC18:3n6; PC20:3n6; CE14:0; CE16:1n7; CE18:1n9; CEMUFA; CEn7; CE18:1n7; CE18:2n6; CE18:3n6; CE22:5n3; CEn6; CEPUFA; PC14:0; PC16:1n7; PC18:1n9; PC18:4n3; PC20:0; PC20:1n9; PC20:4n3; PC20:5n3; PC22:0; PC22:1n9; PC24:0; PC24:1n9; PCdm; PCdm 18:0; PCdm18:1n7; PCSFA; TG14:0; TG14:1n5; TG16:0; TG16:1n7; TGMUFA; TGn7; TGSFA; TL14:0; TL16:0; TL18:0; TL16:1n7; TL18:1n7; TL18:1n9; TL18:3n6; TL18:4n3; TG18:3n3; TG20:3n9; TG22:6n3; TG24:0; CE14:1n5; CE18:0; CE20:0; CE20:1n9; CE20:3n9; CE20:4n3; CE20:4n6; CE20:2n6; CE22:0; CE22:2n6; CE24:0; CESFA; PC20:4n6; PC22:5n6; PCn6; PCPUFA; PE20:4n6; TG15:0; TG18:2n6; TG20:0; TG20:2n6; TG20:4n6; TG20:5n3; TG22:0; TG22:2n6; TG22:1n9; TG22:4n6; TG22:5n6; TG24:1n9; TGn3; TGn6; TGPUFA; TL15:0; TL20:0; TL22:0; TL18:2n6; TL20:2n6; TL20:3n9; TL20:4n3; TL20:4n6; TL22:4n6; TL22:5n6; LY16:0; FA18:1n7; SM18:0; SM22:1n9; SMLC; PGB2; PGE2; PGF<sub>2α</sub>; 5-HETE; 8-HETE; 9-HETE; 12-HETE; 12-HEPE; 11,12-EpETrE; 8,9-DiHETrE; PC18:0; PC22:5n3; CE20:3n6; CELC; TGLC; TG18:3n6; TG20:4n3; TG20:3n6; TG22:5n3; LYLC; LY18:0; LY20:3n6; PE18:3n6; PE20:3n6; PE22:5n3; FA18:0; FA20:5n3; FA18:1n9; FA20:3n6; PC18:2n6; PC20:2n6; PE20:2n6; SM16:0; PGA2M; 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>; 11-DTXB2; 12,13-DiHOME; 9,10-EpOME; 12,13-EpOME; PE22:6n3; LY22:6n3; PE14:0; PE18:1n7; PESFA; PELC; FA 16:0; TL22:6n3; PCLC; PC18:1n7; LY18:1n7; LY18:1n9; LY18:2n6; LY18:3n3; y 19,20-DiHDPa.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que uno o más metabolitos lipídicos comprenden uno o más ácidos grasos, y en el que la(s) cantidad(es) de uno o más ácidos grasos son cantidad(es) relativa(s) de uno o más ácidos grasos con respecto al contenido total de ácidos grasos en los lípidos de una o más clases de lípidos en una o más muestras.

4. Método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente comparar las cantidades de los dos o más metabolitos lipídicos con una o más referencias.

5. Método según la reivindicación 2, en el que el trastorno hepático es la NAFLD y

(a) los metabolitos lipídicos TG16:1n7, PC18:3n6, PC20:3n6, CE14:0, CE16:1n7, CE18:1n9, CEMUFA, CEn7, CE18:1n7, CE18:2n6, CE18:3n6, CE22:5n3, CEn6, CEPUFA, PC14:0, PC16:1n7, PC18:1n9, PC18:3n3, PC18:4n3, PC20:0, PC20:1n9, PC20:4n3, PC20:5n3, PC22:0, PC22:1n9, PC24:0, PC24:1n9, PCdm, PCdm18:0, PCdm18:1n7, PCSFA, TG14:0, TG14:1n5, TG16:0, TG18:1n7, TGMUFA, TGn7, TGSFA, TL14:0, TL16:0, TL18:0, TL16:1n7, TL18:1n7, TL18:1n9, TL18:3n6, TL18:4n3, PC18:0, PC22:5n3, CE20:3n6, CELC, TGLC, TG18:3n6, TG20:4n3, TG20:3n6, TG22:5n3, LYLC, LY18:0, LY20:3n6, PE18:3n6, PE20:3n6, PE22:5n3, FA18:0, FA20:5n3, FA18:1n9, FA20:3n6, 15-HETE y/o TL20:3n6 están asociados positivamente con el trastorno hepático;

y

(b) los metabolitos lipídicos PC20:2n6, CE14:1n5, CE18:0, CE20:0, CE20:1n9, CE20:3n9, CE20:4n3, CE20:4n6, CE20:2n6, CE22:0, CE22:2n6, CE24:0, CESFA, PC20:4n6, PC22:5n6, PCn6, PCPUFA, PE20:4n6, TG15:0, TG18:2n6, TG20:0, TG20:2n6, TG20:4n6, TG20:5n3, TG22:0, TG22:2n6, TG22:1n9, TG22:4n6, TG22:5n6, TG24:1n9, TGn3, TGn6, TGPUFA, TL15:0, TL20:0, TL22:0, TL18:2n6, TL20:3n9, TL20:4n3, TL20:4n6, TL22:4n6, TL22:5n6, PC18:2n6, PE20:2n6, SM16:0, PGA2M, 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>, 11-DTXB2, 12,13-DiHOME, 9,10-EpOME, 12,13-EpOME, PCLC, PC18:1n7, LY18:1n7, LY18:1n9, LY18:2n6, LY18:3n3 y/o 19,20-DiHDPa están asociados negativamente con el trastorno hepático.

6. Método según la reivindicación 2, en el que el trastorno hepático es la NASH y

- 5 (a) los metabolitos lipídicos TG16:1n7, PC18:3n6, PC20:3n6, CE14:0, CE16:1n7, CE18:1n9, CEMUFA, CEn7, CE18:1n7, CE18:2n6, CE18:3n6, CE22:5n3, CEn6, CEPUFA, PC14:0, PC16:1n7, PC18:1n9, PC18:3n3, PC18:4n3, PC20:0, PC20:1n9, PC20:4n3, PC20:5n3, PC22:0, PC22:1n9, PC24:0, PC24:1n9, PCdm, PCdm18:0, PCdm18:1n7, PCSFA, TG14:0, TG14:1n5, TG16:0, TG18:1n7, TGMUFA, TGn7, TGSFA, TL14:0, TL16:0, TL18:0, TL16:1n7, TL18:1n7, TL18:1n9, TL18:3n6, TL18:4n3, LY16:0, FA18:1n7, SM18:0, SM22:1n9, SMLC, PGB2, PGE2, PGF2 $\alpha$ , 15-ceto-PGF2 $\alpha$ , 5-HETE, 8-HETE, 9-HETE, 11-HETE, 12-HETE, 12-HEPE, 11,12-EpETrE, 8,9-DiHETrE, PC18:0, PC22:5n3, CE20:3n6, CELC, TGLC, TG18:3n6, TG20:4n3, TG20:3n6, TG22:5n3, LYLC, LY18:0, LY20:3n6, PE18:3n6, PE20:3n6, PE22:5n3, FA18:0, FA20:5n3, FA18:1n9, FA20:3n6, 15-HETE y/o TL20:3n6 están asociados positivamente con el trastorno hepático; y
- 10 (b) los metabolitos lipídicos TG20:4n6, TG18:3n3, TG20:3n9, TG22:6n3, TG24:0, CE14:1n5, CE 18:0, CE20:0, CE20:1n9, CE20:3n9, CE20:4n3, CE20:4n6, CE20:2n6, CE22:0, CE22:2n6, CE24:0, CESFA, PC20:4n6, PC22:5n6, PCn6, PCPUFA, PE20:4n6, TG15:0, TG18:2n6, TG20:0, TG20:2n6, TG20:4n6, TG20:5n3, TG22:0, TG22:2n6, TG22:1n9, TG22:4n6, TG22:5n6, TG24:1n9, TGn3, TGn6, TGPUFA, TL15:0, TL20:0, TL22:0, TL18:2n6, TL20:2n6, TL20:3n9, TL20:4n3, TL20:4n6, TL22:4n6, TL22:5n6, PC22:6n3, PE22:6n3, LY22:6n3, PE14:0, PE18:1n7, PESFA, PELC, FA16:0, CE22:6n3, TL22:6n3, PCLC, PC18:1n7, LY18:1n7, LY18:1n9, LY18:2n6, LY18:3n3 y/o 19,20-DiHDDPA están asociados negativamente con el trastorno hepático.
- 20 7. Método según la reivindicación 3, que comprende adicionalmente realizar las etapas (A) y (B) con uno o más ácidos grasos seleccionados del grupo que consiste en: PC18:3n6; PC20:3n6; CE14:0; CE18:1n9; CEMUFA; CEn7; CE18:1n7; CE18:2n6; CE18:3n6; CE22:5n3; CEn6; CEPUFA; PC14:0; PC16:1n7; PC18:1n9; PC18:3n3; PC18:4n3; PC20:0; PC20:1n9; PC20:4n3; PC20:5n3; PC22:0; PC22:1n9; PC24:0; PC24:1n9; PCdm18:0; PCdm18:1n7; PCSFA; TG14:0; TG14:1n5; TG16:0; TG18:1n7; TGMUFA; TGn7; TGSFA; TL14:0; TL16:0; TL18:0; TL16:1n7; TL18:1n7; TL18:1n9; TL18:3n6; TL18:4n3; TG18:3n3; TG20:3n9; TG22:6n3; TG24:0; CE14:1n5; CE18:0; CE20:0; CE20:1n9; CE20:3n9; CE20:4n3; CE20:4n6; CE20:2n6; CE22:0; CE22:2n6; CE24:0; CESFA; PC20:4n6; PC22:5n6; PCn6; PCPUFA; PE20:4n6; TG15:0; TG18:2n6; TG20:0; TG20:2n6; TG20:4n6; TG20:5n3; TG22:0; TG22:2n6; TG22:1n9; TG22:4n6; TG22:5n6; TG24:1n9; TGn3; TGn6; TGPUFA; TL15:0; TL20:0; TL22:0; TL18:2n6; TL20:2n6; TL20:3n9; TL20:4n3; TL22:4n6; y TL22:5n6.
- 30 8. Método según la reivindicación 3 ó 7, que comprende adicionalmente la etapa de comparar la cantidad relativa de uno o más ácidos grasos con una referencia.
- 35 9. Método según la reivindicación 8 cuando depende de la reivindicación 7, en el que si
- 40 (a) la cantidad relativa de TG16:1n7, PC18:3n6, PC20:3n6, CE14:0, CE16:1n7, CE18:1n9, CEMUFA, CEn7, CE18:1n7, CE18:2n6, CE18:3n6, CE22:5n3, CEn6, CEPUFA, PC14:0, PC16:1n7, PC18:1n9, PC18:3n3, PC18:4n3, PC20:0, PC20:1n9, PC20:4n3, PC20:5n3, PC22:0, PC22:1n9, PC24:0, PC24:1n9, PCdm, PCdm18:0, PCdm18:1n7, PCSFA, TG14:0, TG14:1n5, TG 16:0, TG18:1n7, TGMUFA, TGn7, TGSFA, TL14:0, TL16:0, TL18:0, TL16:1n7, TL18:1n7, TL18:1n9, TL18:3n6 y/o TL18:4n3 es superior a la referencia; y/o (b) la cantidad
- 45 relativa de TG20:4n6, TG18:3n3, TG20:3n9, TG22:6n3, TG24:0, CE14:1n5, CE18:0, CE20:0, CE20:1n9, CE20:3n9, CE20:4n3, CE20:4n6, CE20:2n6, CE22:0, CE22:2n6, CE24:0, CESFA, PC20:4n6, PC22:5n6, PCn6, PCPUFA, PE20:4n6, TG15:0, TG18:2n6, TG20:0, TG20:2n6, TG20:4n6, TG20:5n3, TG22:0, TG22:2n6, TG22:1n9, TG22:4n6, TG22:5n6, TG24:1n9, TGn3, TGn6, TGPUFA, TL15:0, TL20:0, TL22:0, TL18:2n6, TL20:2n6, TL20:3n9, TL20:4n3, TL20:4n6, TL22:4n6 y/o TL22:5n6 es inferior a la referencia; hay indicio de hepatopatía grasa no alcohólica (NAFLD) o esteatohepatitis no alcohólica (NASH).
- 50 10. Método de diagnóstico de la NASH en un sujeto, que comprende las etapas del método según la reivindicación 3, y que comprende adicionalmente la etapa de determinar el nivel de un eicosanoide en un fluido corporal del sujeto, en el que un nivel superior al normal es un indicio de NASH.
- 55 11. Método según la reivindicación 10, en el que el eicosanoide está seleccionado del grupo que consiste en 15-HETE; PGB2; PGE2; PGF2 $\alpha$ ; 15-ceto-PGF2 $\alpha$ ; 5-HETE; 8-HETE; 9-HETE; 11-HETE; 12-HETE; 12-HEPE; 11,12-EpETrE; y 8,9-DiHETrE.
- 60 12. Método según la reivindicación 3 ó 7, en el que se determinan las cantidades relativas de dos o más ácidos grasos.
- 65 13. Método según la reivindicación 2 ó 3, en el que el método de supervisión se utiliza para determinar la respuesta del sujeto al tratamiento.
14. Método según la reivindicación 2, que comprende adicionalmente determinar la cantidad relativa de un segundo metabolito lipídico diferente en una muestra de un fluido corporal del sujeto, en el que el segundo metabolito lipídico seleccionado del grupo consiste en TG16:1n7, PC18:3n6; PC20:3n6; CE14:0; CE16:1n7; CE18:1n9; CEMUFA; CEn7; CE18:1n7; CE18:2n6; CE18:3n6; CE22:5n3; CEn6; CEPUFA; PC14:0; PC16:1n7; PC18:1n9; PC18:3n3; PC18:4n3; PC20:0; PC20:1n9; PC20:4n3; PC20:5n3; PC22:0; PC22:1n9; PC24:0; PC24:1n9; PCdm; PCdm18:0; PCdm18:1n7; PCSFA; TG14:0; TG14:1n5; TG16:0; TG 18:1n7; TGMUFA; TGn7; TGSFA; TL14:0; TL16:0; TL18:0;

TL16:1n7; TL18:1n7; TL18:1n9; TL18:3n6; TL18:4n3; CE14:1n5; CE18:0; CE20:0; CE20:1n9; CE20:3n9; CE20:4n3; CE20:4n6; CE20:2n6; CE22:0; CE22:2n6; CE24:0; CESFA; PC20:4n6; PC22:5n6; PCn6; PCPUFA; PE20:4n6; TG15:0; TG18:2n6; TG20:0; TG20:2n6; TG20:4n6; TG20:5n3; TG22:0; TG22:2n6; TG22:1n9; TG22:4n6; TG22:5n6; TG24:1n9; TGn3; TGn6; TGPUFA; TL15:0; TL20:0; TL22:0; TL18:2n6; TL20:2n6; TL20:3n9; TL20:4n3; TL20:4n6; TL22:4n6 y TL22:5n6.

5

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto es un candidato a donante de injerto hepático, que está siendo evaluado para una cirugía bariátrica, se ha sometido a una cirugía bariátrica o está siendo supervisando para bajar de peso.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

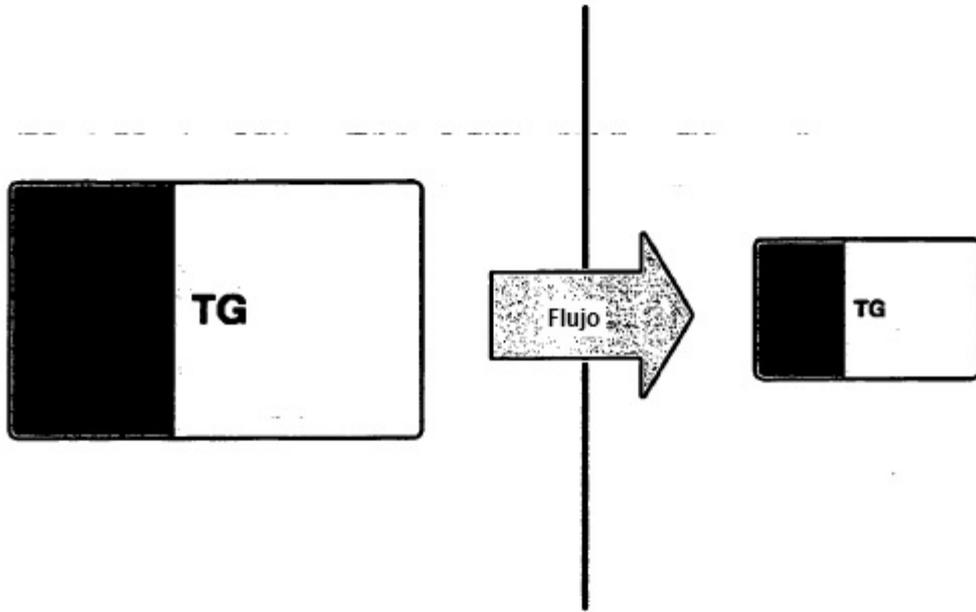


FIG. 1

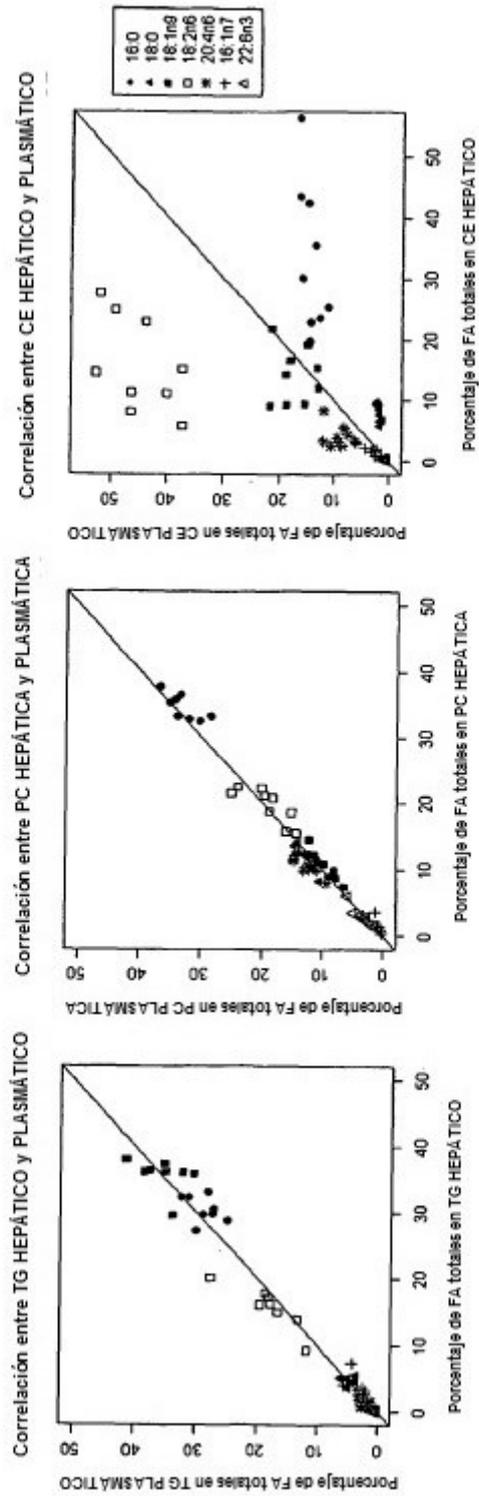


FIG. 2

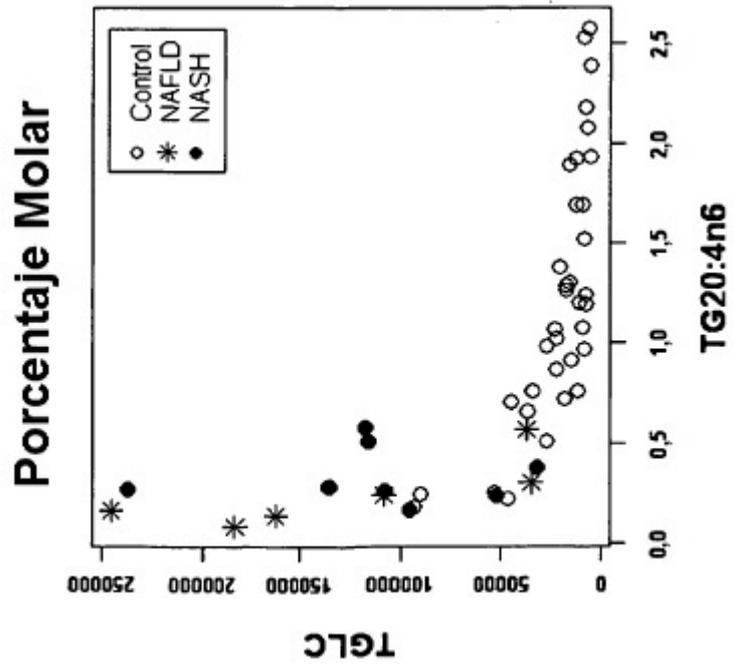
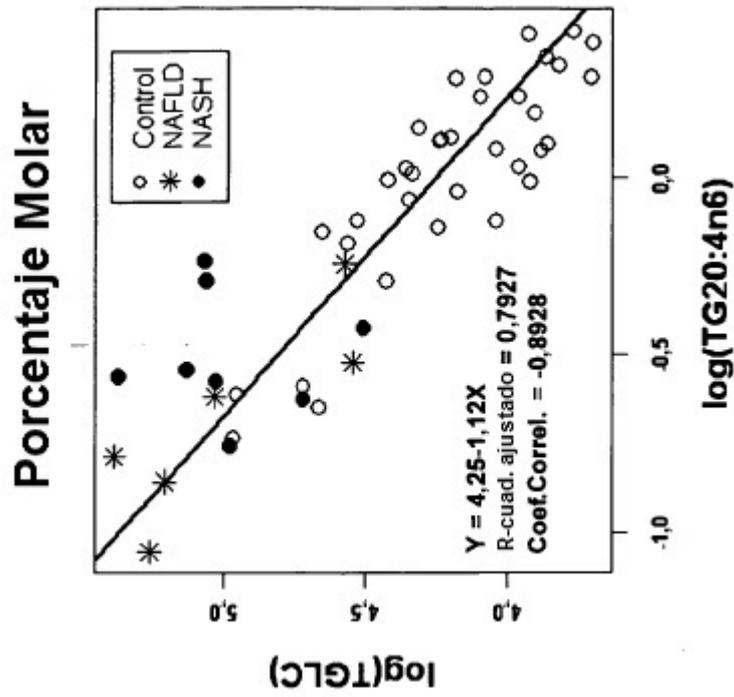
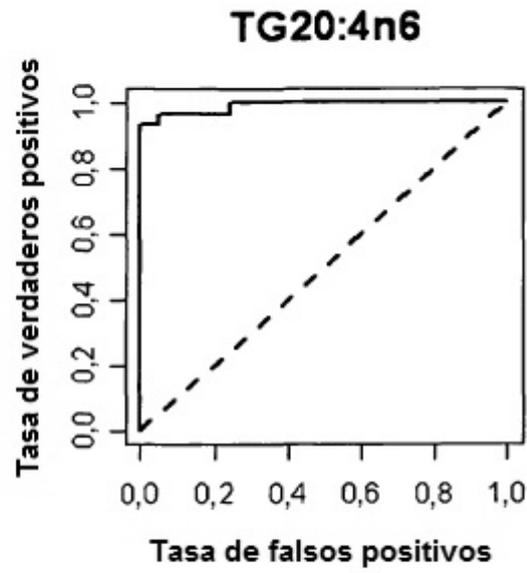


FIG. 3



**Límite de Referencia: 0,76**  
**Especificidad: 1,00**  
**Sensibilidad: 0,93**

FIG. 4