

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 310**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

G06F 19/00 (2008.01)

G01N 33/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2014 PCT/US2014/069389**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15089102**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2014 E 14870547 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3080613**

54 Título: **Diagnóstico diferencial de enfermedad hepática**

30 Prioridad:

10.12.2013 US 201361914345 P

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

21.11.2019

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**LOOMBA, ROHIT;
QUEHENBERGER, OSWALD;
ARMANDO, AARON y
DENNIS, EDWARD A.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 732 310 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).

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico diferencial de enfermedad hepática

Datos relativos a la solicitud

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad conforme a 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 61/914.345, presentada el 10 de diciembre de 2014.

Esta invención se ha realizado con apoyo del gobierno gracias a las ayudas K23DK090303, concedida por los National Institutes of Health, y GM U54 069338, concedida por los National Institutes of Health. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

Campo de la invención

10 La invención se refiere en general al diagnóstico de enfermedad hepática y específicamente a la diferenciación entre hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica y testigos normales.

Información de antecedentes

15 La enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA, siglas inglesas "NAFLD") es la causa más común de hepatopatía crónica en los EE. UU. A grandes rasgos, se puede subdividir en hígado graso no alcohólico (HGNA, siglas inglesas "NAFL"), del que se cree que presenta un riesgo mínimo de progresión a cirrosis, y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA, siglas inglesas "NASH"), de la que se cree que presenta un mayor riesgo de progresión a cirrosis. Hoy por hoy, la biopsia hepática constituye la regla de oro diagnóstica para diferenciar si un paciente con EHGNA padece HGNA o bien EHNA. Sin embargo, una biopsia hepática es un procedimiento invasivo, que está limitado por la variabilidad en la toma de la muestra y el coste, y puede complicarse debido a su morbilidad, incluso con consecuencias, aunque rara vez, fatales.

20 En la actualidad no se dispone de biomarcadores precisos y no invasivos para detectar EHNA. El diagnóstico sustancialmente no invasivo (es decir, todo lo que no sea una extracción de sangre) de la EHNA es una importante necesidad médica no satisfecha.

25 Estudios anteriores han demostrado que la lipotoxicidad desempeña un papel importante en la patogénesis de la EHNA. Datos recientes sugieren que están implicados lipoproteína de baja densidad (LBD) oxidada y también otros restos lipídicos, ya que se aparecen elevados en pacientes con EHNA, si se compara con quienes padecen HGNA.

30 Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) oxidados y sus metabolitos están implicados en una amplia gama de enfermedades inflamatorias, y se han descrito en la EHGNA ácidos linoleicos y linolénicos autooxidados. Con la reciente evolución de técnicas lipidómicas basadas en cromatografía líquida-espectrometría de masas, se ha desarrollado un enfoque sólido y exhaustivo para el análisis lipidómico de centenares de ácidos grasos, acilatanolaminas y eicosanoides inflamatorios, entre ellos sus numerosos metabolitos originados por una diversidad de ciclooxigenasas, lipoxigenasas, citocromos P450 y oxidaciones no enzimáticas que producen isoprostanos, así como combinaciones de ello. Se ha prestado especial atención a los eicosanoides y metabolitos oxigenados relacionados, derivados del ácido araquidónico (AA) y otros AGPI. Actualmente se pueden cuantificar de manera rutinaria más de 150 de estos metabolitos.

40 Los pacientes a quienes se ha diagnosticado EHNA presentan un riesgo acrecentado de desarrollar cirrosis. Hoy por hoy no existe cura para la cirrosis, y los pacientes se encuentran limitados a tratamientos que pueden retrasar el avance de la enfermedad, minimizar el daño a las células hepáticas y reducir las complicaciones. El diagnóstico temprano de la EHNA puede detener la progresión de la enfermedad y evitar la progresión a cirrosis. Sin embargo, el único método actualmente disponible para diagnosticar de manera fiable la EHNA es la biopsia hepática, un procedimiento muy invasivo.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un método para predecir o evaluar el riesgo de progresión de enfermedad hepática en un paciente, según la reivindicación 1.

45 Esta invención se refiere además al uso de biomarcadores plasmáticos para diferenciar la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) del hígado graso no alcohólico (HGNA) y la enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA), y de testigos normales. En concreto, la invención se refiere al uso de niveles plasmáticos de eicosanoides libres y otros metabolitos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) para diferenciar la EHNA del HGNA y de testigos normales sin EHGNA.

50 Según se argumenta en la presente memoria, la determinación del perfil plasmático de eicosanoides y otros AGPI oxidados, según la invención, puede diferenciar entre pacientes con EHNA y pacientes con HGNA, y frente a testigos normales con fenotipo único (por ejemplo, con un contenido documentado de grasa hepática inferior a 5%, determinado por análisis de la fracción grasa mediante densidad de protones) (FGDP) en una determinación basada

en obtención de imágenes de resonancia magnética (IRM)).

5 En una realización, la invención proporciona un método para predecir o evaluar el riesgo de progresión de enfermedad hepática en un paciente diagnosticado de enfermedad hepática según la reivindicación 1, utilizando dhk-PGD2 como marcador. El método se lleva a cabo determinando la identidad y la cantidad de uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en extractos lipídicos obtenidos de una muestra de plasma procedente del paciente, y comprende medir el nivel de dhk-PGD2.

Un aumento o una disminución en uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI en comparación con un testigo adecuado, según se describe con mayor detalle en la presente memoria, son indicativos de un riesgo acrecentado de progresión de enfermedad hepática, contra lo cual se puede ajustar una terapia en consecuencia.

10 Preferiblemente, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI se miden en una muestra de plasma procedente del paciente, de la que se han extraído lípidos que contienen las moléculas diana. Se determinan la identidad y la cantidad de los eicosanoides y/o metabolitos de AGPI, y se comparan con sus niveles en testigos normales.

15 En un aspecto de esta realización, la enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) es el hígado grasa no alcohólico (HGNA). En otro aspecto, la EHGNA es la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). En un aspecto adicional, el riesgo de progresión de enfermedad hepática es la progresión a cirrosis.

20 En un aspecto adicional, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI, adicionales, se seleccionan del grupo que consiste en PGE2, tetranor-12-HETE, 15-HETE, 11,12-diHETrE, 14,15-diHETrE, 20-COOH-AA, 9-oxoODE, 12,13-EpOME o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto específico, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI, adicionales, son 11,12-diHETrE y/o 20-COOH-AA o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto preferido, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI son dhk-PGD2 y 20-COOH-AA.

25 En un aspecto adicional, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI se miden mediante ABC-COR (área bajo la curva de la característica operativa del receptor, siglas inglesas "AUROC"). En un aspecto adicional, el ABC-COR es aproximadamente al menos 0,8. En otro aspecto, el ABC-COR es aproximadamente al menos 0,9. En otro aspecto más, el ABC-COR es aproximadamente al menos 0,99.

30 En una realización adicional, la presente invención proporciona un método para distinguir la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) del hígado grasa no alcohólico en un paciente diagnosticado de enfermedad hepática. El método se lleva a cabo determinando la identidad y la cantidad de uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en extractos lipídicos obtenidos de una muestra de plasma procedente del paciente.

35 De nuevo, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI se miden preferiblemente en una muestra de plasma procedente del paciente, de la cual se han extraído lípidos que contienen las moléculas diana, aunque es posible que se pueda llevar a cabo la determinación en una muestra de plasma de la que no se han extraído lípidos. Siempre está comprendido en el método medir el nivel de dhk-PGD2. Se determinan la identidad y la cantidad de los eicosanoides y/o metabolitos de AGPI, y se comparan con sus niveles en testigos normales. Un aumento o disminución estadísticamente significativos en los niveles de los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI, en comparación con testigos normales y, para la diferenciación, con los valores obtenidos en el hígado grasa no alcohólico y la enfermedad hepática grasa no alcohólica, indican que el paciente padece EHNA. Entonces se puede aplicar una terapia en consecuencia.

40 En un aspecto, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI, adicionales, se seleccionan del grupo que consiste en PGE2, tetranor-12-HETE, 15-HETE, 11,12-diHETrE, 14,15-diHETrE, 20-COOH-AA, 9-oxoODE, 12,13-EpOME o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto específico, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI, adicionales, son 11,12-diHETrE y/o 20-COOH-AA o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto preferido, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI son dhk-PGD2 y 20-COOH-AA.

45 En un aspecto adicional, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI se miden mediante ABC-COR. En un aspecto adicional, el ABC-COR es aproximadamente al menos 0,8. En otro aspecto, el ABC-COR es aproximadamente al menos 0,9. En otro aspecto más, el ABC-COR es aproximadamente al menos 0,99.

50 En una realización adicional, la presente invención proporciona un método para distinguir la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) del hígado grasa no alcohólico y la enfermedad hepática grasa no alcohólica, que comprende medir el nivel de uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en lípidos extraídos de una muestra de plasma procedente del paciente. Un aumento en los niveles de los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI en comparación con testigos normales y, para la diferenciación, los obtenidos en el hígado grasa no alcohólico y la enfermedad hepática grasa no alcohólica, indica que el paciente padece EHNA. Entonces se puede aplicar una terapia en consecuencia.

55

En un aspecto, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI, adicionales, se seleccionan del grupo que consiste en PGE2, tetranor-12-HETE, 15-HETE, 11,12-diHETrE, 14,15-diHETrE, 20-COOH-AA, 9-oxoODE y 12,13-EpOME o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto específico, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI, adicionales, son 11,12-diHETrE y/o 20-COOH-AA. En un aspecto preferido, los uno o
5 varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI son dhk-PGD2 y 20-COOH-AA.

En un aspecto adicional, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI se miden mediante ABC-COR. En un aspecto adicional, el ABC-COR es aproximadamente al menos 0,8. En otro aspecto, el ABC-COR es aproximadamente al menos 0,9.

Ventajosamente, el método de la invención permite a los médicos intervenir potencialmente en una etapa más temprana de la enfermedad hepática de lo que ha sido posible hasta ahora, haciendo uso de una prueba no invasiva y precisa indicativa de la progresión de tal enfermedad.
10

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra metabolitos derivados del ácido araquidónico. Para cada metabolito se muestran, en las tres ramas del estudio clínico, los valores cuantitativos de ácido araquidónico (AA) libre en plasma y sus metabolitos derivados de actividades de ciclooxigenasa (COX), 5-lipoxigenasa (5-LOX), 12- y 15-lipooxigenasa (12/15-LOX) y citocromo P450 (CYP). Los resultados se representan como diagramas de cajas y bigotes, en donde el borde inferior de la caja indica el percentil 25, la línea dentro de la caja indica la mediana y el borde superior de la caja indica el percentil 75. Los bigotes indican los extremos inferior y superior del intervalo de datos.
15

La Figura 2 muestra metabolitos derivados de sustratos alternativos. Para cada metabolito se muestran, en las tres ramas del estudio clínico, los valores cuantitativos de ácido linoleico (AL), ácido α -linoléico (AAL), ácido eicosatrienoico (AET), ácido eicosapentaenoico (AEP) y ácido docosahexaenoico (ADH), libres en plasma, y sus metabolitos derivados de actividades de 5-LOX, 12/15-LOX y CYP. Los resultados se muestran como diagramas de cajas y bigotes, en donde el borde inferior de la caja indica el percentil 25, la línea dentro de la caja indica la mediana y el borde superior de la caja indica el percentil 75. Los bigotes indican los extremos inferior y superior del intervalo de datos.
20
25

La Figura 3 (Tabla 1) muestra las características de referencia demográficas, clínicas, bioquímicas e histológicas de los pacientes de la población del estudio.

La Figura 4 (Tabla 2) muestra metabolitos eicosanoides en testigos normales en comparación con la enfermedad hepática grasa no alcohólica y en comparación con la esteatohepatitis no alcohólica.

La Figura 5 (Tabla 3) muestra la precisión diagnóstica de los biomarcadores séricos que diferencian el HGNA de la EHNA.
30

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al diagnóstico de enfermedad hepática. Esta invención se refiere además al uso de biomarcadores plasmáticos para diferenciar la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) del hígado graso no alcohólico (HGNA) y de testigos normales sin enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA). Específicamente, la invención se refiere al uso de niveles plasmáticos de eicosanoides libres y otros metabolitos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) para diferenciar la EHNA del HGNA y de testigos normales sin EHGNA. Los métodos reivindicados siempre implican medir el nivel de dhk-PGD2. Los métodos descritos en los pasajes de la descripción que sigue, si no comprenden medir el nivel de dhk-PGD2, figuran solamente con fines de referencia.
35

Antes de describir las presentes composiciones y métodos, debe entenderse que esta invención no está limitada a composiciones, métodos y condiciones experimentales particulares descritas, ya que tales composiciones, métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria tiene únicamente el propósito de describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas.
40

Según se utilizan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/uno/una" y "el/la/lo" incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Así pues, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o varios métodos y/o pasos del tipo descrito en la presente memoria, que resultarán evidentes para los expertos en la materia al leer esta descripción, etc.
45

Salvo que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que esta invención pertenece. Aunque en la práctica o prueba de la invención se pueden emplear cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, se describirán ahora los métodos y materiales preferidos. Las definiciones expuestas en lo que sigue se facilitan para la mejor comprensión de la descripción, pero de ninguna manera se considerará que suplantán la comprensión de los términos sostenida por los expertos ordinarios en la técnica.
50
55

Enfermedad hepática

Una enfermedad hepática es un tipo de lesión o enfermedad del hígado. Existen más de cien tipos de enfermedades hepáticas. Las más difundidas son las siguientes: fascioliasis; hepatitis; hepatopatía alcohólica; enfermedad hepática grasa; cirrosis; colangitis hepática, biliar, esclerosante; necrosis centrilobular; síndrome de Budd-Chiari; hepatopatías hereditarias (hemocromatosis, que implica la acumulación de hierro en el organismo, y enfermedad de Wilson); amiloidosis hereditaria relacionada con transtirretina; y síndrome de Gilbert.

Según se emplea en la presente memoria, la expresión "enfermedad hepática" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que afecta al hígado. Los ejemplos de enfermedad hepática incluyen, entre otros, síndrome de Alagille; hepatopatía relacionada con el alcohol; deficiencia de antitripsina alfa-1; hepatitis autoinmune; tumores hepáticos benignos; atresia biliar; cirrosis; galactosemia; síndrome de Gilbert; hemocromatosis; hepatitis A; hepatitis B; hepatitis C; carcinoma hepatocelular; encefalopatía hepática; quistes hepáticos; cáncer de hígado; ictericia del recién nacido; enfermedad hepática grasa no alcohólica (que incluye el hígado grasa no alcohólico y la esteatohepatitis no alcohólica); cirrosis biliar primaria (CBP); colangitis esclerosante primaria (CEP); síndrome de Reye; enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo I y enfermedad de Wilson.

Enfermedad hepática grasa no alcohólica

La enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) es una de las causas del hígado grasa, que se produce cuando se deposita grasa en el hígado sin que sea debido al consumo excesivo de alcohol. La EHGNA está relacionada con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico, y puede responder a tratamientos originalmente desarrollados para otros estados resistentes a la insulina (por ejemplo, la diabetes mellitus tipo 2), tales como la pérdida de peso, la metformina y las tiazolidindionas. La EHGNA se puede subclasificar en esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) e hígado grasa no alcohólico (HGNA). La EHNA es la forma más extrema de EHGNA, y se considera como una causa importante de cirrosis hepática de origen desconocido.

La mayoría de los pacientes aquejados de EHGNA presentan pocos o ningún síntoma. Los pacientes pueden quejarse de fatiga, malestar general y molestias abdominales sordas en el cuadrante superior derecho. Puede apreciarse ictericia leve, aunque es raro. Más comúnmente, se diagnostica EHGNA después de resultados anormales en la función hepática durante análisis rutinarios de sangre. La EHGNA se asocia con resistencia a la insulina y síndrome metabólico (obesidad, hiperlipidemia combinada, diabetes mellitus (tipo II) e hipertensión arterial).

Son hallazgos habituales enzimas hepáticas elevadas y una ecografía hepática que revela esteatosis. También se puede realizar una ecografía para excluir problemas de cálculos biliares (colelitiasis). Una biopsia (examen de tejido) hepática es la única prueba de la que se acepta ampliamente que distingue definitivamente la EHNA de otras formas de enfermedad hepática, y que se puede utilizar para evaluar la gravedad de la inflamación y la fibrosis resultante.

Hígado grasa no alcohólico

El hígado grasa no alcohólico (HGNA) es un tipo de EHGNA, y se trata de una afección en la cual se acumula grasa en las células hepáticas. El HGNA presenta un riesgo mínimo de progresar hasta cirrosis. El hígado grasa simple generalmente no daña el hígado, pero es una afección que se puede identificar mediante biopsia hepática. El hígado grasa simple no está asociado con otras anomalías hepáticas, tales como cicatrización o inflamación. Es un hallazgo común en pacientes con gran sobrepeso o que padecen diabetes mellitus. Un paciente tiene un hígado grasa cuando la grasa constituye como mínimo 5% del hígado.

Esteatohepatitis no alcohólica

La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) es una hepatopatía común, a menudo "silenciosa". La principal característica de la EHNA es la presencia de grasa en el hígado, junto con inflamación y lesión. La mayoría de las personas con EHNA se sienten bien y no son conscientes de que tienen un problema hepático. Sin embargo, la EHNA puede ser grave y puede conducir a la cirrosis, en la cual el hígado queda dañado y cicatrizado de manera permanente, y ya no puede funcionar adecuadamente.

Generalmente se sospecha por primera vez EHNA en una persona en la que se observan elevaciones en los resultados de las pruebas hepáticas que se incluyen en los paneles de análisis rutinarios de sangre, tales como la alanina aminotransferasa (ALT) o la aspartato aminotransferasa (AST). Cuando exámenes adicionales no revelan ninguna razón aparente para la enfermedad hepática y cuando las radiografías o los estudios del hígado mediante imágenes evidencian grasa, se sospecha EHNA. La única manera de proporcionar un diagnóstico definitivo de EHNA y distinguirla del hígado grasa simple es una biopsia hepática. Se diagnostica EHNA cuando en la biopsia se observa grasa junto con inflamación y lesión de las células hepáticas. Si el tejido muestra grasa sin inflamación y lesión, se diagnostica HGNA o EHGNA. En la actualidad, ningún análisis de sangre ni exploración puede proporcionar esta información de manera fiable.

Eicosanoides

Los eicosanoides son moléculas señalizadoras originadas por la oxidación de ácidos grasos de 20 carbonos, tales como el ácido araquidónico u otros ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Ejercen un control complejo sobre muchos sistemas del organismo; principalmente en el crecimiento, durante y después de la actividad física, la inflamación o la inmunidad, tras la ingesta de compuestos tóxicos y patógenos, y como mensajeros en el sistema nervioso central.

5 Los eicosanoides incluyen las prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano, leucotrienos y otros metabolitos formados por la adición enzimática o no enzimática de oxígeno a los AGPI.

Los eicosanoides se derivan de ácidos grasos omega-3 (ω -3) o de ácidos grasos omega-6 (ω -6). En general, los eicosanoides ω -6 son proinflamatorios; los ω -3 lo son en mucha menor medida o incluso pueden ser antiinflamatorios. Las cantidades y el balance de estas grasas en la dieta de una persona afectarán a las funciones controladas por eicosanoides en el organismo, con efectos sobre la enfermedad cardiovascular, los triglicéridos, la tensión arterial y la artritis. Medicamentos antiinflamatorios tales como la aspirina y otros AINE actúan reduciendo la síntesis de eicosanoides.

10

Existen múltiples subfamilias de eicosanoides, entre ellas las prostaglandinas, por ejemplo prostaciclina, tromboxanos, lipoxinas y leucotrienos. Dentro de cada una existen dos o tres series separadas, derivadas de un ácido graso esencial (AGE) ω -3 o de uno ω -6. Las distintas actividades de estas series explican en gran medida los efectos de las grasas ω -3 y ω -6 sobre la salud.

15

Ácido graso poliinsaturado

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son ácidos grasos que contienen más de un doble enlace en su esqueleto. Esta clase incluye muchos compuestos importantes, tales como los ácidos grasos esenciales. Los ácidos grasos poliinsaturados se pueden clasificar en distintos grupos, dependiendo de su estructura química: polienos interrumpidos con metileno, ácidos grasos conjugados y otros AGPI. Los AGPI incluyen otros ácidos grasos aparte de los que contienen 20 carbonos ("eicosa"), tales como el ácido linoleico y el ácido linolénico, que contienen 18 carbonos, y el ácido docosapentaenoico (ADP) y el ácido docosahexaenoico (ADH), que contienen 22 carbonos, pero también metabolitos del ácido araquidónico y otros ácidos grasos de 20 carbonos tales como el ácido eicosatrienoico (AET) y el ácido eicosapentaenoico (AEP) derivados de oxidaciones por ciclooxigenasas, lipoxigenasas, citocromo P450, y oxidaciones no enzimáticas. Los ejemplos de enzimas que actúan sobre el ácido araquidónico y otros AGPI para producir AGPI incluyen, como se sabe, COX, 5-LOX, 12/15-LOX y CYP. Los AGPI también pueden sufrir oxidación no enzimática.

20

Los ejemplos de eicosanoides libres y metabolitos de AGPI incluyen, pero sin estar limitados a estos, PGE2 (prostaglandina E2), dhk-PGD2 (13,14-dihidro-15-cetoprostaglandina D2, por sus siglas en inglés), tetranor-12-HETE (2,3,4,5-tetranor-12(R)-HETE), 15-HETE (ácido 15-hidroxi-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoico), 11,12-diHETrE (ácido 11,12-dihidroxi-eicosatrienoico), 14,15-diHETrE (ácido 14,15-dihidroxi-5,8,11-icosatrienoico), 20-COOH-AA (ácido 20-carboxiaraquidónico), 9-oxoODE (ácido 9-oxooctadecadienoico), 12,13-EpOME (12(13)-isoleucotoxina), TxB2 (tromboxano B2), 12-HHTrE (ácido 12-hidroxiheptadecatrienoico), 11-HETE (ácido 11-hidroxi-5Z,8Z,12E,14Z-eicosatetraenoico), 5-HETE (ácido 5-hidroxi-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoico), 5,6-diHETrE (ácido 5,6-dihidroxi-8Z,11Z,14Z-eicosatrienoico), 14,15-diHETrE (ácido 14,15-dihidroxi-5,8,11-icosatrienoico), 13-HODE (ácido 13-hidroxi-10,12,14,16,18,20-hexadecadienoico), 9-HODE (ácido 9-hidroxi-10,12,14,16,18,20-hexadecadienoico), 9,10-EpOME, 9,10-diHOME (el diol resultante de la apertura de (\pm)12,13-EpOME por la epóxido hidrolasa soluble), 12,13-diHOME, 9-HOTrE, 15-HETrE (ácido 15S-hidroxi-8Z,11Z,13E-eicosatrienoico), 12-HEPE (ácido 12-hidroxi-5,8,10,14,17-icosapentaenoico), 14-HDoHE (ácido 14-hidroxidocosahexaenoico), 16-HDoHE (ácido 16-hidroxidocosahexaenoico) y 19,20-DiHDPA (ácido 19,20-dihidroxi-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-docosapentaenoico), ácido linoleico (AL) libre en plasma, ácido α -linolénico (AAL), ácido eicosatrienoico (AET), ácido eicosapentaenoico (AEP) y ácido docosahexaenoico (ADH) y sus metabolitos derivados de 5-LOX, 12/15-LOX y CYP.

30

35

40

La presente invención también proporciona un método para predecir o evaluar el riesgo de progresión de enfermedad hepática en un paciente diagnosticado de enfermedad hepática, que comprende medir en el plasma del paciente el nivel de uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), en donde un aumento en los eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI o una disminución en uno o varios específicos, a causa de la conversión, que podría incluir la oxidación, a un eicosanoide o AGPI distinto, son indicativos de un riesgo acrecentado de progresión de enfermedad hepática. En un aspecto, la enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) es un hígado graso no alcohólico (HGNA). En otro aspecto, la EHGNA es esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).

45

50

En un aspecto particularmente útil, se muestra en la presente memoria que la determinación del perfil de eicosanoides en plasma puede diferenciar entre HGNA y EHNA. Según se describe a continuación en los Ejemplos, se han identificado varios restos eicosanoides que eran significativamente distintos entre la normalidad, el HGNA y la EHNA, los valores de 11,12-diHETrE, dhk-PGD2 y 20-COOH-AA eran muy elevados en pacientes con EHNA, en comparación con el HGNA y en comparación con testigos normales, de una manera dependiente de la dosis. Estos datos proporcionan evidencia de que 11,12-diHETrE, dhk-PGD2 y 20-COOH-AA son los principales biomarcadores eicosanoides candidatos para el diagnóstico no invasivo de EHNA.

55

Estos resultados difieren de resultados anteriormente publicados, en los que solo se habían medido metabolitos que estaban presentes en su forma libre y sin tratamiento con KOH. Aunque los niveles de eicosanoides libres son muy inferiores a los de eicosanoides esterificados a lípidos, este enfoque capta muchos más metabolitos y permite una estrategia de determinación del perfil mucho más amplia. También evita la destrucción de algunos eicosanoides y AGPI debido al tratamiento con bases o ácidos, que es un paso esencial en el análisis de eicosanoides esterificados a lípidos. En la EHGNA, el metabolismo lipídico normal está alterado, lo que lleva a niveles acrecentados de ácidos grasos libres y de síntesis de triglicéridos. Se ha demostrado que los ácidos grasos libres provocan hepatotoxicidad y pueden estimular la progresión de HGNA a EHNA a través de varios mecanismos. Pueden ser directamente citotóxicos y estimular la producción de rutas inflamatorias en hepatocitos. Estos ácidos grasos sirven también como precursores de eicosanoides inflamatorios. Es congruente con ello que los niveles plasmáticos de varios AGPI libres eran consistentemente más altos en el HGNA y la EHNA, en comparación con testigos sanos (Figuras 1 y 2).

Sin embargo, no existían diferencias entre el HGNA y la EHNA, lo que sugiere que los ácidos grasos libres plasmáticos no son buenos marcadores para diferenciar entre las distintas fases de la EHGNA. Por el contrario, su conversión en eicosanoides puede constituir un mecanismo crítico en la progresión de la enfermedad, y el análisis de los niveles de eicosanoides, en lugar de los niveles de ácidos grasos, puede ser una herramienta clínica útil para discriminar entre HGNA y EHNA.

Los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI pueden seleccionarse del grupo que consiste en PGE2, dhk-PGD2, tetranor-12-HETE, 15-HETE, 11,12-diHETrE, 14,15-diHETrE, 20-COOH-AA, 9-oxoODE, 12,13-EpOME o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto específico, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI son 11,12-diHETrE, dhk-PGD2 y/o 20-COOH-AA o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto preferido, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI son dhk-PGD2 y 20-COOH-AA. En otro aspecto preferido, los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI son 20-COOH-AA.

El método se lleva a cabo determinando el nivel de uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en una muestra del plasma de un paciente. Según se emplea en la presente memoria, el término "muestra" se refiere a cualquier muestra biológica de un paciente. Los ejemplos incluyen, pero sin estar limitados a ello, saliva, cabello, piel, tejido, esputo, sangre, plasma, suero, vítreo, líquido cefalorraquídeo, orina, esperma y células.

Se extraen lípidos de la muestra de plasma, como se detalla adicionalmente en los Ejemplos. Primeramente se determinan la identidad y la cantidad de eicosanoides y/o metabolitos de AGPI en los lípidos extraídos y después se comparan con testigos adecuados. La determinación se puede realizar mediante cualquier técnica de ensayo de lípidos adecuada, preferiblemente una que tenga alta productividad; por ejemplo el análisis espectrofotométrico (tal como el método colorimétrico de evaluación por sulfo-fosfovainillina (SPV, por sus siglas en inglés) de Cheng *et al.*, *Lipids*, 46(1):95-103 (2011)). Los expertos en la técnica conocerán otros métodos analíticos adecuados para la detección y cuantificación del contenido lipídico, entre ellos, sin limitación, ELISA, RMN, UV-Vis o cromatografía gas-líquido, CLAR, UCLAR y/o EM o RIE, métodos basados en enzimas y métodos cromogénicos. La extracción de lípidos también se puede realizar mediante diversos métodos conocidos en la técnica, entre ellos el método convencional para muestras líquidas descrito en Bligh y Dyer, *Can J Biochem Physiol.*, 37, 911 (1959).

Para la determinación general de la progresión de la enfermedad hepática, se pueden comparar con valores de referencia normales los valores obtenidos. Para distinguir la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) del hígado graso no alcohólico (HGNA) en un paciente con diagnóstico de enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA); p. ej., para establecer EHNA o cirrosis y/o para diferenciar entre EHNA y HGNA. Los testigos pueden incluir testigos normales. Un aumento en los eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI en comparación con los testigos es indicativo de un riesgo acrecentado de progresión de enfermedad hepática y/o de la diferenciación deseada de la EHNA, contra lo cual se puede aplicar una terapia en consecuencia. En algunos casos se puede presentar una disminución en uno o varios eicosanoides y/o AGPI, si un metabolito normal es oxidado o convertido en otro metabolito.

Los niveles de eicosanoides libres y metabolitos de AGPI se expresan como ABC-COR (Área bajo la curva de la característica operativa del receptor). El ABC-COR se determina midiendo los niveles de eicosanoides libres y metabolitos de AGPI mediante la dilución de isótopos estables. Resumiendo, se agregan cantidades idénticas de patrones internos deuterados a cada muestra y a todos los patrones primarios utilizados para generar curvas patrón. Se calculan los niveles de eicosanoides y metabolitos de AGPI determinando las relaciones entre el metabolito endógeno y los patrones internos deuterados correspondientes. Por regresión lineal se convierten las proporciones en cantidades absolutas. Mediante análisis estadísticos, entre ellos la prueba de chi-cuadrado, la prueba de t y el ABC-COR, se evalúan los metabolitos eicosanoides individuales para determinar el rendimiento de las pruebas de diagnóstico y la capacidad para diferenciar entre HGNA y EHNA.

Un riesgo acrecentado de progresión de enfermedad hepática viene determinado por valores de ABC-COR de al menos 0,8, aproximadamente al menos 0,9, aproximadamente al menos 0,95, aproximadamente al menos 0,96, aproximadamente al menos 0,97, aproximadamente al menos 0,98, aproximadamente al menos 0,99 o 1,0.

En los siguientes ejemplos se ilustra adicionalmente la invención en todos sus aspectos. Sin embargo, los ejemplos no limitan el alcance de la invención, que está definido por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

Datos demográficos de cohorte

5 Este estudio incluyó 19 pacientes con EHGNA (10 casos de HGNA y 9 casos de EHNA) y 10 testigos normales sin EHGNA. En la Tabla 1 se describen las características de referencia detalladas, que incluyen datos demográficos, de índice de masa corporal (IMC), pruebas bioquímicas, perfil lipídico, FGDP-IRM para los testigos y datos de biopsias hepáticas de pacientes con EHGNA. Los testigos sin EHGNA eran más jóvenes, tenían un IMC más bajo y niveles séricos más bajos de ALT, AST, GGT, glucosa e insulina, como era de esperar. Los resultados de las pruebas de rutina relacionadas con el hígado y metabólicas no difirieron significativamente entre el HGNA y la EHNA (Tabla 1), salvo para los triglicéridos en plasma, que fueron ligeramente más altos en pacientes con EHNA. Comparados con pacientes aquejados de HGNA, los pacientes con EHNA tenían una histología hepática más grave, con mayor grado de esteatosis, degeneración en globo, inflamación lobular y fibrosis.

Ejemplo 2

15 Determinación del perfil lipídico de AGPI y metabolitos

No existen en la actualidad biomarcadores no invasivos con suficiente especificidad para distinguir EHNA de otros estados de hígado graso. La biopsia hepática sigue siendo el punto de referencia para identificar de manera fiable HGNA y EHNA, pero el procedimiento es invasivo y conlleva ciertos riesgos. Por tanto, existe una gran demanda en la comunidad clínica para desarrollar procedimientos no invasivos capaces de caracterizar y estadificar con precisión la EHGNA, ya que ello proporciona información valiosa sobre las opciones de tratamiento y el pronóstico. La inflamación y el estrés oxidativo contribuyen a la progresión de la enfermedad desde la esteatosis, que tiene unas consecuencias relativamente benignas, hasta la EHNA, que presenta riesgo de cirrosis y carcinoma hepatocelular. En este caso se utilizaron cromatografía de líquidos y espectrometría de masas para determinar el perfil de, y cuantificar, lípidos bioactivos y productos de peroxidación lipídica en circulación que son característicos de la inflamación hepática en pacientes con NASH.

Se determinaron los perfiles completos de eicosanoides y se evaluaron los niveles plasmáticos de eicosanoides libres derivados del ácido araquidónico (20:4 ω 6) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) relacionados, incluido el ácido linoleico (18:2 ω 6), ácido α -linolénico (18:3 ω 3), ácido dihomo-gamma-linolénico (20:3 ω 6), ácido eicosapentaenoico (20:5 ω 3) y ácido docosahexaenoico (22:6 ω 3), en cohortes bien caracterizadas de pacientes con sospecha de HGNA o EHNA, estratificados según sus puntuaciones de biopsia hepática (Tabla 1). El perfil inicial de eicosanoides comprendía 158 metabolitos individuales que la plataforma analítica de los autores de la presente invención puede medir de manera fiable. De estos, 26 eicosanoides estaban presentes a niveles medibles en las muestras de plasma de testigos, de HGNA o de EHNA (Tabla 2). Estos mediadores se generan a través de complejos mecanismos biosintéticos y múltiples rutas de modificación y degradación (27). Como se aprecia en las Figuras 1 y 2, en las muestras de testigo, de HGNA y de EHNA estaban presentes, en cantidades diversas, eicosanoides derivados de las tres rutas enzimáticas principales, la ruta de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), la ruta de la lipoxigenasa (5-LOX, 12-LOX y 15-LOX) y la ruta del citocromo P450 (CYP). En las muestras de testigos se detectaron a niveles bajos tromboxano B₂ (TXB₂), derivado de la COX, y ácido 12-hidroxiheptatrienoico (12-HHTrE), uno de los metabolitos primarios del AA producidos por la tromboxano sintasa en plaquetas humanas, pero eran significativamente superiores tanto en muestras de HGNA como de EHNA; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el HGNA y la EHNA. Por el contrario, la prostaglandina E₂ (PGE₂) era elevada solamente en las muestras de EHNA, y no se observaron diferencias entre los testigos y el HGNA (Figura 1). No se detectó prostaglandina D₂ (PGD₂) en ninguna de las muestras, pero el producto de degradación 13,14-dihidro-15-ceto-PGD₂ (dhk-PGD₂) era significativamente mayor en la EHNA en comparación con el HGNA (valor de p <0,0011) o los testigos (valor de p <0,0002) (Figura 1).

También estaban incrementados en la EHGNA los metabolitos derivados de LOX. Es de destacar que, mientras que los productos derivados del AA por las vías de 5-LOX y 12/15-LOX aparecen como los más elevados en el HGNA (Figura 1), los metabolitos de AGPI relacionados, entre ellos ácido linoleico, ácido α -linolénico, ácido dihomo-gamma-linolénico, AEP y ADH eran generalmente más elevados en la EHNA (Figura 2). Análogamente, los metabolitos derivados del AA por la vía CYP estaban predominantemente elevados en la EHNA, pero no presentaban cambios en el caso del HGNA en comparación con los testigos sanos (Figuras 1 y 2). En particular, el ácido 11,12-dihidroieicosatrienoico (11,12-diHETrE) y el ácido 14,15-dihidroieicosatrienoico (14,15-diHETrE) estaban significativamente elevados en la EHNA en comparación con el HGNA o los testigos. Estos metabolitos se producen por la acción de la epóxido hidrolasa soluble (EHs) sobre ácidos epoxieicosatrienoicos, que son los productos primarios de la vía de la epoxigenasa CYP sobre el sustrato inicial AA. Se han atribuido a los ácidos epoxieicosatrienoicos una serie de efectos biológicos, entre ellos vasodilatación cardioprotectora, acciones antimigratorias sobre los leucocitos y acciones antiinflamatorias. La conversión de los epóxidos a sus dioles correspondientes por parte de las EHs disminuye sus niveles funcionales y, con ello, disminuye los beneficios para la salud asociados. De manera similar, se ha informado de que el ácido 20-hidroieicosatetraenoico (20-HETE), un metabolito del AA sintetizado por la ruta de la hidroxilasa CYP, posee importantes propiedades vasoactivas. En las muestras de EHNA no se detectó 20-HETE en el plasma, pero sí se encontró un aumento constante del ácido

20-carboxiaraquidónico (20-COOH-AA), aunque sin alcanzar significación estadística en este conjunto de muestras, en particular al comparar el HGNA con la EHNA (Tabla 2). La conversión de 20-HETE a 20-COOH-AA es catalizada por enzimas CYP, y es responsable de la reducción de la bioactividad.

Ejemplo 3

5 Identificación de un panel de eicosanoides como herramienta diagnóstica para detectar EHNA

Basándose en la Tabla 2, se encontró que nueve biomarcadores eran significativos en la evaluación de la EHGNA. Se evaluaron, utilizando ABC-COR, sus rendimientos individuales como prueba diagnóstica, que se exponen en la Tabla 3. El mejor candidato como biomarcador único para diferenciar el HGNA de la EHNA fue 11,12s-diHETrE, con un ABC-COR de 1. Además, se encontró que un panel que comprende dhk-PGD2 y 20-COOH-AA tiene un ABC-COR de 1.

Ejemplo 4

Métodos

15 Diseño del estudio y participantes. Este estudio consistió en un análisis transversal derivado de un estudio anidado prospectivo de casos y testigos, que incluía tres grupos de pacientes con fenotipo único: pacientes aquejados de EHGNA (tanto EHNA como HGNA) comprobada por biopsia, y testigos normales sin EHGNA. Todos los participantes habían sido derivados desde la UCSD NASDD Research Clinic, y fueron atendidos entre enero de 2011 y noviembre de 2012 (18-20). Todos los participantes proporcionaron un consentimiento informado por escrito y se sometieron a una consulta de investigación clínica estandarizada y detallada que incluía historial médico, historial de consumo de alcohol y su cuantificación (utilizando el cuestionario AUDIT y de Skinner), examen físico, antropometría, pruebas bioquímicas en ayunas, así como la exclusión detallada de otras causas de enfermedad hepática (véanse a continuación los criterios de inclusión y exclusión). Se obtuvo una muestra de plasma en ayunas la mañana de la consulta de investigación clínica y se almacenó en un congelador a -80 °C ubicado en la UCSD NAFLD Translational Research Unit.

25 Descripción de la cohorte. Todos los casos de EHGNA incluidos en este estudio presentaban un diagnóstico de EHGNA confirmado por biopsia hepática. La biopsia fue puntuada por un patólogo hepático experimentado, que carecía de acceso a los datos clínicos, lipídicos y de imágenes. Para puntuar las biopsias se utilizó el sistema de puntuación histológica NASH CRN. Se registró en todos los pacientes la puntuación de actividad de EHGNA (NAS, por sus siglas en inglés) y las puntuaciones de fibrosis. La puntuación NAS abarca de 0 a 8 y es la suma del grado de esteatosis (de 0 a 3), inflamación lobular (de 0 a 3) y degeneración hepatocelular en globo (de 0 a 2). La fibrosis hepática abarca de 0 a 4, siendo 0 la ausencia de fibrosis y 4 la cirrosis.

Definición de EHNA. Se clasificaron como aquejados de EHNA los pacientes con EHGNA confirmada por biopsia que presentaban esteatosis macrovesicular predominantemente de zona 3 e inflamación lobular y presencia de degeneración en globo clásica.

35 Criterios de inclusión y exclusión para la EHGNA. Los criterios de inclusión incluían una edad mínima de 18 años durante el proceso de consentimiento, capacidad y voluntad de dar consentimiento informado por escrito, un historial mínimo o nulo de consumo de alcohol congruente con EHGNA (véanse los criterios de exclusión) y obtención de plasma dentro de los 90 días posteriores a la biopsia hepática. Los criterios de exclusión incluían pruebas clínicas o histológicas de hepatopatía alcohólica: consumo regular y excesivo de alcohol dentro de los 2 años anteriores a la entrevista, definido como una ingesta de alcohol superior a 14 "bebidas" por semana en un hombre o más de 7 "bebidas" por semana en una mujer. Alrededor de 10 g de alcohol equivalen a una "unidad de bebida". Una unidad equivale a 30 ml (1 onza) de licor destilado, una cerveza de 355 ml (12 onzas) o un vaso de vino de 120 ml (4 onzas), causas secundarias de esteatosis hepática, entre ellas anteriores intervenciones quirúrgicas, cirugía bariátrica, nutrición parenteral total, síndrome del intestino corto, medicamentos esteatogénicos, evidencia de hepatitis B crónica, señalada por la presencia de HBsAg en el suero, evidencia de hepatitis C crónica, señalada por la presencia de ARN anti-VHC o ARN de VHC en el suero, evidencia de otras causas de enfermedad hepática, tales como la deficiencia de antitripsina alfa-1, enfermedad de Wilson, enfermedad por almacenamiento de glucógeno, disbetalipoproteinemia, hemocromatosis fenotípica conocida, hepatopatía autoinmune o lesión hepática inducida por fármacos, o enfermedad sistémica subyacente concomitante que, en opinión del investigador, pudiera interferir en el estudio.

50 Definición de testigos normales. El aspecto novedoso de este estudio era la inclusión de un grupo testigo normal sin EHGNA, singularmente bien caracterizado. Se clasificó a los participantes como normales sin EHGNA gracias a la cuantificación precisa de la grasa hepática, por una fracción de grasa obtenida por FGDP-IRM inferior a 5% (18, 20). La biopsia hepática no es ética en individuos normales. Otras medidas no invasivas, tales como las ecografías y la tomografía computarizada, son inexactas y carecen de sensibilidad, especialmente con una fracción de grasa hepática entre 1 y 10%. Por lo tanto, en este estudio se utilizó FGDP-IRM para el diagnóstico preciso de ausencia de esteatosis hepática (Noureddin *et al.*, *Hepatology* (2013), 58:1930). La FGDP-IRM es sumamente precisa, sensible, reproducible y exacta.

5 Criterios de inclusión y exclusión para la cohorte de testigos normales (sin EHGNA). Los criterios de inclusión en el grupo testigo sano (sin EHGNA) incluían (1) edad superior a 18 años; (2) FGDP-IRM hepática <5%; y (3) carencia de antecedentes conocidos de enfermedad hepática. Los criterios de exclusión incluían (1) edad inferior a 18 años; (2) enfermedad sistémica significativa; (3) incapacidad para someterse a IRM; y (4) evidencia de posible enfermedad hepática, incluida cualquier biopsia hepática previa, antígeno superficial de hepatitis B positivo, ARN vírico de hepatitis C o serologías autoinmunes, deficiencia de antitripsina alfa-1, pruebas genéticas de hemocromatosis o ceruloplasmina baja.

10 Extracción de lípidos. Se obtuvieron dentro de los 90 días posteriores a la biopsia hepática muestras de plasma para la determinación del perfil lipídico y la FGDP-IRM, para los casos y los testigos, respectivamente. Todas las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C, se descongelaron de una vez y se utilizaron inmediatamente para aislar ácidos grasos y eicosanoides libres como se ha descrito con anterioridad. Resumiendo, se añadió un cóctel de 15 26 patrones internos deuterados (adquiridos individualmente a Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) a 50 µl de plasma, y con metanol al 10% se llevó a un volumen de 1 ml. Después se purificaron las muestras mediante extracción en fase sólida sobre columnas Strata-X (Phenomenex, Torrance, CA), utilizando un procedimiento de activación consistente en lavados consecutivos con 3 ml de metanol al 100% seguidos de 3 ml de agua. Se eluyeron luego los eicosanoides con 1 ml de metanol al 100%, se secó a vacío el eluyente y se disolvió en 50 µl de tampón A, compuesto por agua/acetonitrilo/ácido acético 60/40/0,02 = 60/40/0,02 (v/v/v), y se utilizó inmediatamente para el análisis, de la manera siguiente: para el análisis de ácidos grasos libres se añadieron patrones de ácidos grasos 20 deuterados a 50 µl de plasma, y se aislaron los ácidos grasos libres mediante extracción selectiva con metanol e isooctano. Se derivatizaron los ácidos grasos extraídos y se analizaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas, de la manera descrita (Dumlao *et al.* (2011), 1811:724).

25 Cromatografía líquida de fase inversa y espectrometría de masas. Se analizaron y se cuantificaron los eicosanoides en plasma mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM). Resumiendo, se separaron los eicosanoides mediante cromatografía de fase inversa utilizando una columna BEH Shield de 1,7 µm, 2,1x100 mm (Waters, Milford, MA) y un sistema Acquity UPLC (Waters, Milford, MA). Se equilibró la columna con tampón A y se inyectaron 5 µl de muestra por medio del inyector automático. Se eluyeron las muestras con un gradiente escalonado que comenzaba con 100% de tampón A durante 1 minuto, luego cambiaba a 50% de tampón B (compuesto por 50% de acetonitrilo, 50% de isopropanol y 0,02% de ácido acético) en el transcurso de 3 minutos, y después hasta 100% de tampón B en el transcurso de 1 minuto. La cromatografía líquida estaba interconectada 30 con una fuente de iones IonDrive Turbo V, y se realizó un análisis por espectrometría de masas en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo AB SCIEX 6500 QTrap (AB SCIEX, Framingham, MA). Se midieron los eicosanoides utilizando ionización por electropulverización en modo de ion negativo y seguimiento de múltiples reacciones (MRM, por sus siglas en inglés) utilizando las transiciones de ion precursor/ion producto más abundantes y específicas, para construir un método de adquisición capaz de detectar 158 analitos y 26 patrones internos. Se fijó en ~4.500 V el voltaje de pulverización de iones a una temperatura de 550 °C. La activación colisional de los iones precursores de los eicosanoides se logró con nitrógeno como gas de colisión, estando el potencial de disgregación, el potencial de 35 entrada y la energía de colisión optimizados para cada metabolito. Se identificaron los eicosanoides haciendo coincidir su señal de MRM y el tiempo de retención cromatográfico con los de patrones idénticos puros.

40 Cuantificación de lípidos. Se cuantificaron eicosanoides y ácidos grasos libres mediante el método de dilución con isótopo estable. Resumiendo, se agregaron cantidades idénticas de patrones internos deuterados a cada muestra y a todos los patrones primarios utilizados para generar curvas patrón. Para calcular la cantidad de eicosanoides y ácidos grasos libres en una muestra se calcularon las proporciones entre las áreas de pico del metabolito endógeno y los patrones internos deuterados correspondientes. Se convirtieron las proporciones en cantidades absolutas mediante análisis de regresión lineal de curvas patrón generadas en condiciones idénticas.

45 Análisis estadístico. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado (χ^2) para comparar entre variables categóricas, y la prueba de la t para comparar entre variables continuas. Se examinaron las diferencias en los perfiles plasmáticos de eicosanoides entre los testigos normales, los pacientes con HGNA leve comprobado por biopsia y los pacientes con EHNA comprobada por biopsia. Por último, se examinó la precisión diagnóstica de nueve biomarcadores que proporcionaban diferencias significativas, como biomarcadores para diferenciar el HGNA de la EHNA. Se consideró 50 estadísticamente significativo un valor de p de dos colas 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software estadístico SAS versión 9.4 (Cary, NC, SAS Inc.).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para predecir o evaluar el riesgo de progresión de enfermedad hepática en un paciente diagnosticado de enfermedad hepática, que comprende medir el nivel de dhk-PGD2 en una muestra de sangre, suero o plasma aislada del paciente, en donde un aumento o una disminución de dhk-PGD2 en comparación con testigos normales son indicativos de un riesgo acrecentado de progresión de enfermedad hepática.
2. El método según la reivindicación 1, que comprende (a) extracción de lípidos de la muestra de sangre, suero o plasma; (b) identificación y cuantificación del nivel de dhk-PGD2 en los lípidos extraídos; y (c) comparación de los niveles determinados con los de un testigo normal, en donde un aumento o una disminución de dhk-PGD2 en comparación con los testigos son indicativos de un riesgo acrecentado de progresión de enfermedad hepática.
- 10 3. El método según la reivindicación 1, en donde la enfermedad hepática es una enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA), preferiblemente en donde la EHGNA es esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).
4. El método según la reivindicación 1, en donde se comunican a un médico los resultados obtenidos, preferiblemente en donde el médico confirma que los resultados indican progresión de enfermedad hepática y aplica al paciente terapia en consecuencia.
- 15 5. El método según la reivindicación 1, que comprende además medir el nivel de uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI seleccionados del grupo que consiste en PGE2, tetranor-12-HETE, 15-HETE, 11,12-diHETrE, 14,15-diHETrE, 20-COOH-AA, 9-oxoODE, 12,13-EpOME o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente en donde los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI son 11,12-diHETrE y/o 20-COOH-AA, preferiblemente en donde los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI son 20-COOH-AA.
- 20 6. El método según la reivindicación 1, en donde se mide dhk-PGD2 mediante ABC-COR, preferiblemente en donde el ABC-COR es aproximadamente al menos 0,8, o en donde el ABC-COR es aproximadamente al menos 0,9 o en donde el ABC-COR es aproximadamente al menos 0,99.
7. El método según la reivindicación 1, en donde el riesgo de progresión de enfermedad hepática es la progresión a cirrosis.
- 25 8. Un método sustancialmente no invasivo para distinguir esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) de hígado graso no alcohólico y enfermedad hepática grasa no alcohólica en un paciente diagnosticado de enfermedad hepática, que comprende medir el nivel de dhk-PGD2 en una muestra de sangre, suero o plasma obtenida del paciente, en donde un aumento o disminución de los niveles de dhk-PGD2 indican que el paciente padece EHNA.
- 30 9. El método según la reivindicación 8, que comprende (a) extracción de lípidos de la muestra de sangre, suero o plasma; (b) identificación y cuantificación del nivel de dhk-PGD2 en los lípidos extraídos; y (c) comparación de los niveles determinados con los obtenidos en caso de hígado graso no alcohólico y enfermedad hepática grasa no alcohólica en un paciente diagnosticado de enfermedad hepática y opcionalmente también testigos normales, en donde un aumento o disminución de dhk-PGD2 en comparación con los testigos son indicativos de que el paciente padece EHNA.
- 35 10. El método según la reivindicación 8, que comprende además medir el nivel de uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI seleccionados del grupo que consiste en PGE2, tetranor-12-HETE, 15-HETE, 11,12-diHETrE, 14,15-diHETrE, 20-COOH-AA, 9-oxoODE, 12,13-EpOME o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente en donde los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI son 11,12-diHETrE y/o 20-COOH-AA, preferiblemente en donde los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI son 20-COOH-AA.
- 40 11. El método según la reivindicación 10, en donde los uno o varios eicosanoides libres y/o metabolitos de AGPI se miden mediante ABC-COR.
12. El método según la reivindicación 11, en donde el ABC-COR es aproximadamente al menos 0,8
13. El método según la reivindicación 11, en donde el ABC-COR es aproximadamente al menos 0,9.
- 45 14. El método según la reivindicación 11, en donde el ABC-COR es aproximadamente al menos 0,99.

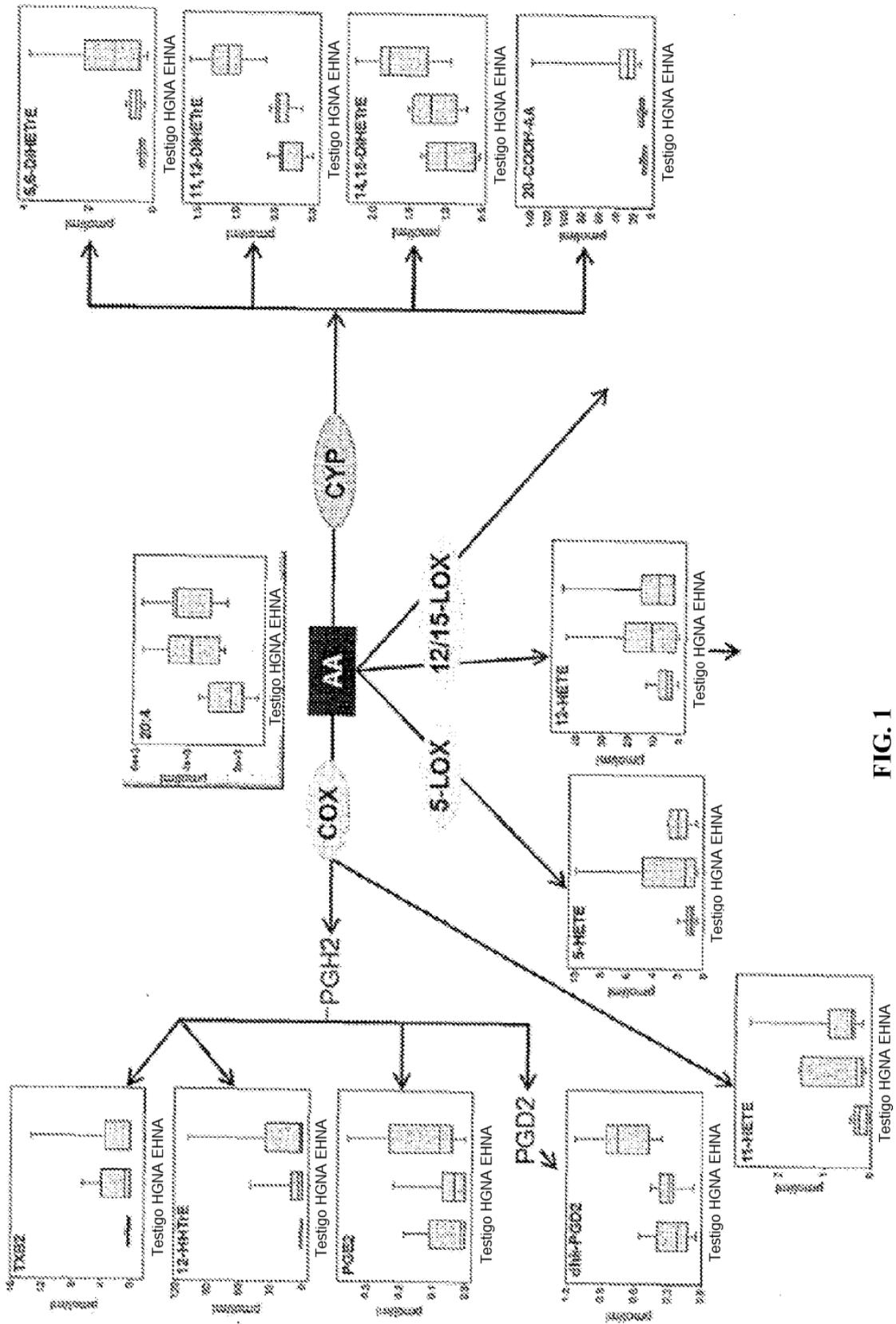


FIG. 1

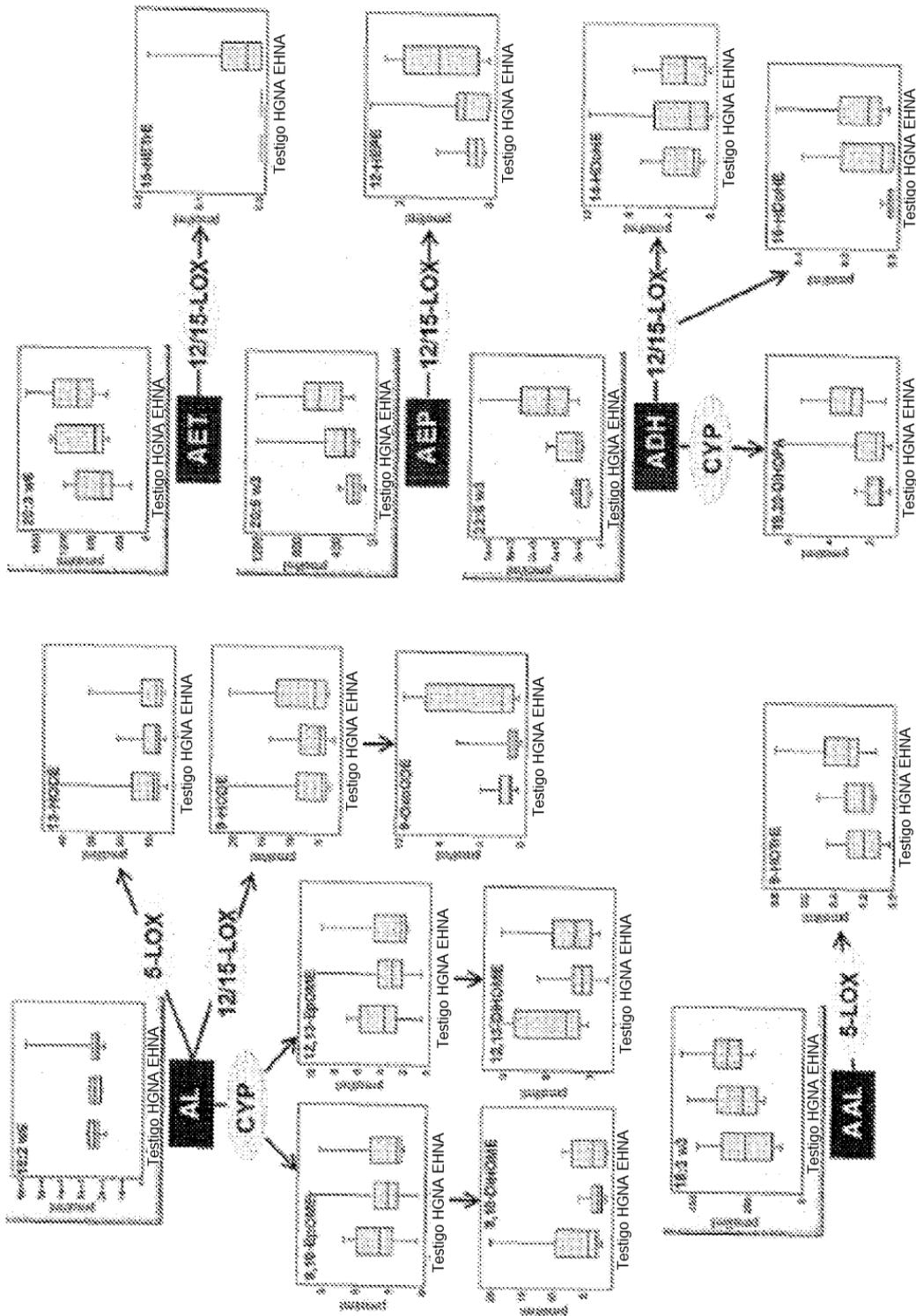


FIG. 2

Tabla 1. Características de referencia demográficas, clínicas, bioquímicas e histológicas de los pacientes de la población del estudio

	Testigos n=10	HGNA, n=10	EHNA, n=9	Valores p de testigo frente a HGNA	Valores p de HGNA frente a EHNA
Edad	31,8 ± 15,66	48,90 ± 14,03	45,89 ± 12,94	0,019	0,633
Sexo	40% masculino	44% masculino	40% masculino		
IMC	24,73 ± 4,17	29,49 ± 5,39	29,59 ± 5,01	0,041	0,966
Datos de laboratorio					
Plaquetas	240500 ± 48808,58	264900 ± 53371,76	244888,89 ± 52312,63	0,300	0,400
Leucocitos	7,05 ± 1,90	7,13 ± 2,28	5,96 ± 0,87	0,892	0,101
Fosf. alc.	71,9 ± 23,65	85,70 ± 40,42	78,78 ± 18,19	0,367	0,638
ALT	16,7 ± 8,51	61,10 ± 39,73	104,33 ± 61,79	0,006	0,053
AST	23,1 ± 8,71	35,00 ± 12,53	66,33 ± 32,69	0,025	0,013
Bilirr. d.	0,12 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,12 ± 0,04	1,000	0,628
Bilirr. t.	0,49 ± 0,30	0,53 ± 0,21	0,56 ± 0,25	0,732	0,763
GGT	18,8 ± 19,52	46,20 ± 24,03	72,89 ± 38,47	0,012	0,067
Glucosa	88,7 ± 5,93	99,00 ± 13,41	97,11 ± 8,68	0,046	0,612
Hba1c	5,6 ± 0,30	5,79 ± 0,82	5,84 ± 0,45	0,505	0,947
Insulina	8,7 ± 4,35	13,54 ± 6,23	14,78 ± 10,31	0,003	0,608
TP	10,98 ± 0,58	10,59 ± 1,33	10,27 ± 0,80	0,411	0,657
Col.	172,9 ± 21,46	196,60 ± 33,20	229,67 ± 28,97	0,077	0,050
TG	87,5 ± 41,70	124,80 ± 52,37	221,22 ± 108,43	0,096	0,034
LAD	56,1 ± 12,36	55,00 ± 18,34	55,44 ± 24,78	0,664	0,847
LBD	97,6 ± 18,40	116,50 ± 129,00	129,00 ± 26,88	0,063	0,284
Histología hepática					
Esteatosis		0,75 ± 0,5	2,33 ± 0,82		0,005
Fibrosis		0 ± 0	1,60 ± 0,89		0,016
NAS		1,75 ± 0,5	6,33 ± 1,03		0,0001
Deg. hep. globo		0 ± 0	1,50 ± 0,84		0,007
Inf. lob.		1 ± 0	2,17 ± 0,41		0,001
Inf. portal		0,5 ± 0,55	0,17 ± 0,41		0,262

Los valores de p en negrita son estadísticamente significativos (p ≤ 0,05).

Diferencias entre grupos evaluadas con la prueba de la t.

IMC, Índice de masa corporal; AST, Aspartato aminotransferasa; ALT, Alanina aminotransferasa;

Hgb A1c, Hemoglobina A1c; LBD, Lipoproteína de baja densidad; LAD, Lipoproteína de alta densidad;

AGL, Ácidos grasos libres; PRC, Proteína reactiva con C; Fosf. alc., Fosfatasa alcalina;

GGT, Gamma-glutamil transferasa; HOMA, Evaluación del modelo homeostático;

NAS, Puntuación de actividad de EHGNA.

FIG. 3

Tabla 2. Metabolitos eicosanoides en testigos normales en comparación con hígado graso no alcohólico y en comparación con esteatohepatitis no alcohólica

	Testigos n=10	HGNA n=10	EHNA n=9	Valores p de testigo frente a HGNA†	Valores p de testigo frente a EHNA†	Valores p de HGNA frente a EHNA†	Valores p de comparar todos los grupos‡
Metabolitos derivados del ácido araquidónico (unidades = pmol/ml)							
Tx82	0,23 ± 0,22	4,53 ± 8,52	5,47 ± 9,86	0,1452	0,1499	0,8251	0,2704
12-HHTe	1,05 ± 0,78	8,05 ± 16,00	23,07 ± 37,70	0,1485	0,1181	0,3242	0,1295
PGE2	0,05 ± 0,05	0,05 ± 0,07	14,63 ± 0,12	0,9999	0,0437	0,0485	0,0408
dhk-PGD2	0,25 ± 0,15	0,29 ± 0,11	0,72 ± 0,27	0,4895	0,0002	0,0011	<0,0001
11-HETE	0,22 ± 0,15	0,63 ± 0,82	0,75 ± 0,80	0,0681	0,0830	0,7138	0,1279
5-HETE	1,04 ± 0,47	3,06 ± 3,65	1,85 ± 0,87	0,1156	0,0211	0,3300	0,1427
12-HETE	5,47 ± 4,04	14,15 ± 14,04	13,42 ± 14,77	0,0683	0,1521	0,9141	0,2162
tetrano-12-HETE	0,24 ± 0,11	0,25 ± 0,23	0,42 ± 0,20	0,9992	0,0196	0,0956	0,0714
15-HETE	1,32 ± 0,35	2,08 ± 0,63	1,03 ± 0,53	0,0036	0,1684	0,0011	0,0004
5,6-diHETE	0,39 ± 0,09	0,53 ± 0,19	1,25 ± 1,20	0,0109	0,0521	0,1128	0,0188
11,12-diHETE	0,34 ± 0,18	0,41 ± 0,13	1,11 ± 0,31	0,2949	<0,0001	<0,0001	<0,0001
14,15-diHETE	0,95 ± 0,31	1,14 ± 0,30	1,64 ± 0,45	0,1847	0,0011	0,0101	0,0008
20-COOH-AA	7,41 ± 2,57	10,13 ± 3,48	38,94 ± 42,14	0,0607	0,0552	0,0747	0,0131
Metabolitos derivados de sustratos alternativos (unidades = pmol/ml)							
13-HODE	13,27 ± 12,07	10,18 ± 5,24	12,41 ± 8,80	0,4721	0,8629	0,5059	0,7419
9-HODE	7,03 ± 6,14	6,25 ± 3,80	8,82 ± 6,51	0,7384	0,5444	0,3018	0,5984
9-oxoODE	1,59 ± 1,19	1,40 ± 2,00	4,60 ± 4,60	0,7955	0,0887	0,0801	0,0420
9,10-EpOME	4,08 ± 2,06	3,72 ± 2,78	3,73 ± 2,57	0,7446	0,7458	0,9928	0,9345
9,10-diHOME	6,67 ± 6,00	3,14 ± 1,27	4,70 ± 2,57	0,0991	0,3611	0,1268	0,1450
12,13-EpOME	1,89 ± 1,53	1,39 ± 1,63	5,64 ± 5,72	0,4936	0,0882	0,0592	0,2048
12,13-diHOME	5,56 ± 2,55	3,59 ± 1,36	4,65 ± 2,07	0,0446	0,4103	0,1976	0,1182
8-HOTe	0,35 ± 0,47	0,25 ± 0,13	0,37 ± 0,22	0,5436	0,8789	0,1520	0,6628
15-HETE	--	--	0,04 ± 0,06	--	--	--	--
12-HEPE	0,40 ± 0,37	1,40 ± 2,61	1,16 ± 0,90	0,2618	0,0991	0,7909	0,3775
14-HDOHE	2,81 ± 2,21	5,71 ± 8,35	3,14 ± 2,70	0,3125	0,7725	0,3765	0,4233
16-HDOHE	0,01 ± 0,02	0,11 ± 0,14	0,18 ± 0,16	0,0542	0,0139	0,3312	0,0201
19,20-DiHOPA	1,71 ± 0,52	2,39 ± 1,72	3,14 ± 1,28	0,2558	0,0101	0,2996	0,0671

HGNA, enfermedad hepática grasa no alcohólica; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica.

Los datos se expresan como media ± desviación típica.

†Diferencias entre grupos evaluadas con prueba de la t.

‡Comparación entre todos los grupos evaluada utilizando análisis de varianza.

Los valores de p en negrita son estadísticamente significativos (p≤0,05).

FIG. 4

Tabla 3. Precisión diagnóstica de biomarcadores séricos para diferenciar HGNA de EHNA

Biomarcador	ABC-COR	IC 95%	Valor de p*
PGE2	0,81	0,60 – 1,00	0,0043
dhk-PGD2	0,93	0,82 – 1,00	<0,0001
tetranor-12-HETE	0,61	0,59 – 1,00	0,0077
15-HETE	0,91	0,76 – 1,00	<0,0001
11,12-diHETE	1,00	--	--
14,15-diHETE	0,82	0,62 – 1,00	0,0022
20-COOH-AA	0,96	0,86 – 1,00	<0,0001
5-oxoODE	0,73	0,48 – 0,99	0,0732
12,13-EpOME	0,87	0,68 – 1,00	0,0001
Panel:			
dhk-PGD2 + 20-COOH-AA	1,00	--	--

FIG. 5