UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

“CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL METABOLÓMICO SÉRICO DE PACIENTES CON DIFERENTES GRADOS DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA”

Por

DR. RICARDO ANDRÉS GÓMEZ QUIROZ

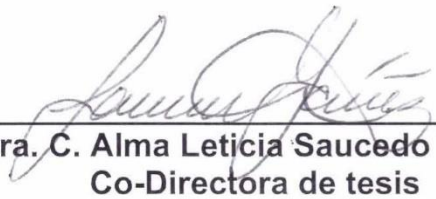
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

NOVIEMBRE, 2022

"CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL METABOLÓMICO SÉRICO DE PACIENTES CON DIFERENTES GRADOS DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA"

Aprobación de la tesis:

Dra. C. Paula Cordero Pérez
Directora de tesis



Dra. C. Alma Leticia Saucedo Yáñez
Co-Directora de tesis

Dr. Juan Fernando Góngora Rivera
Coordinador de Investigación

Dr. Med. Homero Nañez Terreros
Jefe de Departamento de Medicina Interna

Dr. Juan Francisco Moreno Hoyos Abril
Jefe de Enseñanza del Departamento de Medicina Interna

Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a mis papás Cristina y Andrés y mi hermana Diana por nunca haber dudado en apoyarme y hacérmelo saber todos los días. Agradezco a mi esposa María José por su comprensión. A todos mis compañeros de residencia que hicieron el camino más ligero. Al doctor Juan Francisco Moreno, al doctor Homero Náñez, al doctor Fernando Góngora, a la doctora Linda Muñoz y a todo equipo de profesores de Medicina Interna por todo el apoyo y el aprendizaje que me transmitieron. A todo el personal de limpieza, a todo el personal de enfermería y a todo el personal de trabajo social que me permitieron intentar hacer mi trabajo de la mejor manera.

Un gran agradecimiento a la doctora Paula Cordero y a la doctora Alma Saucedo por su tiempo y dedicación. También agradecer al doctor Ernesto Sánchez por sus contribuciones y a Oscar Mendoza por todo su trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO		PÁGINA
CAPÍTULO I		
1.	RESUMEN	13
CAPÍTULO II		
2.	INTRODUCCIÓN	
	2.1. Definición encefalopatía hepática	16
	2.2. Clasificación de la encefalopatía hepática	17
	2.3. Pruebas neuropsicológicas	19
	2.4. Factores precipitantes y fisiopatología	20
	2.5. Definición metabolómica	21
	2.6. Análisis metabolómico basado en ^{1}HRMN	23
	2.7. Metabolómica y hepatopatía crónica	24
	2.8. Justificación	26
CAPÍTULO III		
3.	HIPÓTESIS	
	3.1. Hipótesis verdadera	27
	3.2. Hipótesis nula	27
CAPÍTULO IV		
4.	OBJETIVOS	
	4.1. Objetivo general	28
	4.2. Objetivos específicos	28

CAPÍTULO V

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño metodológico 29

5.2. Selección y Tamaño de la muestra 29

5.3. Aprobación por el Comité de Ética 30

5.4. Criterios de inclusión 30

5.5. Criterios de exclusión 31

5.6. Variables 31

5.7. Consentimiento informado 32

5.8. Procedimiento 32

5.9. Análisis metabolómico de suero por ^{1}HRMN 33

5.10. Cuantificación de metabolitos 34

5.11. Análisis de datos 34

CAPÍTULO VI

6. RESULTADOS

6.1. Parámetros antropométricos 36

6.2. Parámetros hematológicos y bioquímicos 36

6.3. Perfil Metabolómico 41

6.4. Identificación de los metabolitos 42

6.5. Cuantificación de los metabolitos 46

6.6. Vías metabólicas implicadas 49

CAPÍTULO VII

7. DISCUSIÓN 50

CAPÍTULO VIII

8. CONCLUSIONES 57

CAPÍTULO IX

9. ANEXOS 59

CAPÍTULO X

10. BIBLIOGRAFÍA 62

CAPÍTULO XI

11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO 66

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1.	Escala de West Haven (WH) para la valoración clínica de la severidad de la encefalopatía hepática	**17**
2.	Descripción de la Encefalopatía Hepática según los criterios de la Asociación Americana para el estudio de las Enfermedades Hepáticas/Asociación Europea para el Estudio del Hígado 2014	**18**
3.	Factores precipitantes para EH en orden decreciente.	**20**
4.	Comparación de características analíticas entre [1]HRMN y EM.	**22**
5.	Características demográficas clasificadas por grupos de acuerdo a grado de encefalopatía.	**36**
6.	Parámetros hematológicos y bioquímicos de los 4 grupos de estudio.	**37**

INDICE DE FIGURAS

FIGURA **PÁGINA**

1. Espectro de ^{1}H-RMN (800 MHz, CPMG) del suero de un paciente con hepatocarcinoma celular. 24

En el espectro destaca por su marcada intensidad la señal del lactato, sin embargo, las señales de otros metabolitos son fácilmente distinguibles como carbohidratos, aminoácidos y lípidos.

2. Esquema de la preparación y procedimiento para generación del espectro. 33

3. Grupos de estudio para el análisis hematológico, bioquímico y metabolómico. 35

4. Comparación de parámetros hematológicos en los diversos grupos de estudio. 39

5. Comparación de parámetros bioquímicos en los diversos grupos de estudio. 40

6. Espectro de ^{1}H-RMN de suero de un paciente con EH. 41

7. Perfil metabolómico de suero por ^{1}HRMN de todos los sujetos de estudio. 41

8. Espectro de ^{1}HRMN en suero de un control sano. 42

9. Espectro de ^{1}HRMN en suero de un paciente sin encefalopatía. 43

10. Espectro de ^{1}HRMN en suero de un paciente con EHM. 43

11. Espectro de ^{1}HRMN en suero de un paciente con encefalopatía WH1. 44

12. Espectro de ^{1}HRMN en suero de un paciente con encefalopatía WH2 44

13. **Ejemplos de metabolitos que tienen diferencia de concentración entre los grupos.** **45**

14. **Perfil metabolómico de suero por ^{1}HRMN de los diversos grupos de estudio.** **46**

Para cada grupo se hizo una selección de espectros representativos.

15. **Metabolitos cuantificados en los grupos de estudio y magnificados empleando un autoescalado.** **47**

16. **Gráfico de PLS-DA de los diversos grupos de estudio.** **48**

17. **(A) Imagen tridimensional de los datos obtenidos por PLS-DA en los diversos grupos de estudio.** **48**

(B) Metabolitos que permitieron diferenciar de acuerdo a su concentración a estos grupos. **48**

18. **Vías metabólicas implicadas de acuerdo a los metabolitos diferenciales.** **49**

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT: alanina aminotransferasa

AST: aspartato aminotransferasa

BT: bilirrubina total

ºC: grados Centígrados

CG: cromatografía de gases

CL: cromatografía de líquidos

DA: análisis discriminante

EH: encefalopatía hepática

EHM: encefalopatía hepática mínima

EM: espectrometría de masas

FA: fosfatasa alcalina

g/dL: medida internacional que indica gramos por decilitro

HMDB: Human Metabolomic Data Base

^{1}HRMN: resonancia magnética nuclear de protón

HSE: hepatopatía sin encefalopatía

IMC: índice de masa corporal

kDA: Kilodalton

LCR: líquido cefalorraquídeo

mg/dL: medida internacional que indica miligramos sobre decilitros

PCA: análisis componentes principales

PHES: Psychometric Hepatic Encephalopathy Score

PLS-DA: análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales

QDA: análisis discriminante cuadrático

SNC: sistema nervioso central

SVM: máquinas de soporte vectorial

TMAO: N-óxido de trimetilamina

WH: West Haven

CAPÍTULO I

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL METABOLÓMICO SÉRICO DE PACIENTES CON DIFERENTES GRADOS DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA.

INTRODUCCIÓN

La encefalopatía hepática es caracterizada por alteraciones cognitivas y motoras las cuales se pueden presentar con diferentes grados de severidad. Estas alteraciones neurológicas son características casi patognomónicas de la cirrosis en etapas avanzadas y su manifestación indica un deterioro en la condición médica.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se analizó el perfil metabolómico en suero por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de 65 sujetos; divididos en cuatro grupos: 18 pacientes con hepatopatía crónica sin encefalopatía, 20 pacientes con encefalopatía hepática mínima y encefalopatía hepática West Haven grado 1, 12 pacientes con

encefalopatía hepática West Haven grado 2 comparados con 15 individuos sanos. Se analizó el perfil hematológico y bioquímico.

RESULTADOS

La población estuvo compuesta de 32.3% sujetos del género femenino y 67.7% del género masculino, con una mediana de edad de 21, 39, 45 y 53 años para el grupo control, HSE, EHM/WH1 y WH2 respectivamente. Al hacer el análisis de los 4 grupos se identificó: hemoglobina 14.45 g/dL (11.2-14.7), 8.75 g/dL (7.16-10.65), 8.02 g/dL (6.06-9.36), 8.81 g/dL (7.66-10.45); plaquetas 223,000 células/µL (218,500-253,500), 118,500 células/µL (72,250-146,750), 87,500 células/µL (56,400-120,000), 108,000 células/µL (99,250-143,500); creatinina 1 mg/dL (0.9-1.1), 0.7 mg/dL (0.6-0.87), 0.8 mg/dL (0.6-0.9), 1 mg/dL (0.67-1.72); AST 27 U/L (23.5-29.5), 43.5 U/L (31.25-68.75), 37 U/L (31.5-71), 62.5 U/L (50-83); bilirrubina total 0.6 mg/dL (0.4-0.75), 1.37 mg/dL (0.92-2.55), 1.7 mg/dL (0.97-2.32), 2.35 mg/dL (1.52-3.37); fosfatasa alcalina 74 U/L (68-92), 112 U/L (81.5-159.5), 108 U/L (68-142.25), 138.5 U/L (76.25-209); albúmina 4.5 g/dL (4.4-4.7), 3 g/dL (2.15-4), 2.9 g/dL (2.4-3.02), 2.15 g/dL (1.5-2.7) para control, HSE, EHM/WH1 y WH2 respectivamente.

Al analizar los espectros de ^{1}HRMN del suero se identificaron entre 41 a 43 metabolitos entre los diversos grupos de estudio, de estos fueron 14 los metabolitos que permitieron la diferenciación entre grupos, los cuales fueron: τ-metilhistidina, acetona, prolina, 3-hidroxibutirato, lisina, cisteína, treonina, glicerol, glicina, lactato,

alanina, serina, valina e isoleucina. Posteriormente los metabolitos fueron cuantificados empleando los cocientes de concentración metabolito/creatinina.

Las vías metabólicas implicadas en los metabolitos diferenciales fueron la vía del metabolismo de la glicina, serina y treonina y la vía del metabolismo del glutatión.

CONCLUSIÓN

Se logró establecer un perfil metabolómico para los diversos grupos de estudio por medio de la identificación de 14 metabolitos diferenciales.

El estudio PLS-DA a través de su imagen tridimensional permitió diferenciar entre: control sano de los grupos con y sin encefalopatía; HSE de EHM y WH1-2 pero no permitió diferenciar entre WH1 y WH2.

Las vías metabólicas que tuvieron significancia estadística e impacto asociadas a algunos de los 14 metabolitos diferenciales fueron la vía del metabolismo de la glicina, serina y treonina, así como la vía del metabolismo del glutatión.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

2.1. Definición encefalopatía hepática

La encefalopatía hepática (EH) es caracterizada por alteraciones cognitivas y motoras las cuales se pueden presentar con diferentes grados de severidad. Estas alteraciones neurológicas son características casi patognomónicas de la cirrosis en etapas avanzadas y su manifestación indica un deterioro en la condición médica. Se ha descrito que de 10 a 14% de los sujetos con diagnóstico reciente de cirrosis presentan EH y que dicha prevalencia se incrementa a 16-21% en personas con cirrosis descompensada. Se ha reportado una mortalidad del 50% en el primer año posterior al diagnóstico de la entidad clínicamente evidente (Wijdicks, 2016).

Los síntomas neurológicos pueden aparecer en el curso de una agudización de una insuficiencia hepática preestablecida. Sin embargo, puede presentarse en el contexto de una persona con un hígado sano previo al momento del daño agudo. La EH tiende a iniciar con una disminución del estado de alerta, somnolencia y aumento de la cantidad de bostezos. En algunas personas puede manifestarse con estados maniacos o hipomaníacos e irritabilidad en un inicio (Jiménez, 2010).

2.2. Clasificación de la encefalopatía hepática

La escala de West Haven (WH) es utilizada para valoración clínica de la severidad de la EH. Se divide en cuatro etapas clínicas y se ha descrito una fase preclínica conocida como encefalopatía hepática mínima (EHM). Las características clínicas previamente mencionadas se describen en las primeras dos fases de la escala de WH. Mientras que en las fases tres y cuatro hay una franca alteración de la consciencia, con atención fluctuante y respuestas lentas, si es que llegan a presentarse. Existe desorientación marcada y comportamiento aberrante que puede llegar a la fase final de coma. A continuación, se presenta la escala de WH en la tabla 1 (Jiménez, 2010).

Tabla 1. Escala de West Haven (WH) para la valoración clínica de la severidad de la encefalopatía hepática.

Grado de encefalopatía	Estado de conciencia	Función intelectual	Cambios de personalidad	Anormalidades neuromusculares
0= Normal	Sin anormalidades	Sin anormalidades	Sin anormalidades	Sin anormalidades
1= cambios leves	Patrón invertido de sueño, insomnio/hipersomnia	Alteraciones en el cálculo, periodos cortos de atención	Euforia, depresión, irritabilidad	Temblor, alteración de la concentración, Asterixis grado 1
2= cambios moderados	Respuesta lenta, letargo	Amnesia de eventos recientes, desorientación en tiempo	Cambios de personalidad, ansiedad, apatía, comportamiento inapropiado	Asterixis grado 2-3, hiperrelfexia, ataxia, dificultad para hablar
3= cambios severos	Somnolencia, semiestupor, confusión	Incapacidad para el cálculo, desorientación en lugar	Comportamiento bizarro, paranoia, ira	Clonus, rigidez, nistagmos, Babinski
4= coma	Estupor, inconciencia	Sin intelecto	Ninguno	Coma, midriasis, opistótonos

Adaptada de: "Diagnóstico y Tratamiento de la Encefalopatía Hepática en el Adulto" Guía de Práctica Clínica IMSS-685-13.

Es importante señalar que en estudios previos se ha relacionado la variabilidad inter observador e inter sitio de la aplicación de esta escala a la severidad del paciente con alteración neurológica en el cual se presupone EH como principal sospecha diagnóstica. Se ha visto que estas variabilidades son aceptables para el diagnóstico de las fases II a IV. Sin embargo, el diagnóstico de la fase I por medio de esta presenta una alta variabilidad (Córdoba, 2011).

La EH representa un reto en términos de clasificación. A este respecto, la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas y la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (AASLD/EASL, por sus siglas en inglés, respectivamente), han establecido criterios clínicos para la correcta categorización del paciente con EH, los cuales se pueden observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Descripción de la Encefalopatía Hepática según los criterios de la Asociación Americana para el estudio de las Enfermedades Hepáticas/Asociación Europea para el Estudio del Hígado 2014.

Tipo	Grado		Temporalidad	Espontanea vs Precipitada
A	EHM*	EH Cubierta	Episódica	Espontánea
	1			
B	2	EH evidente	Recurrente	Precipitada
	3			
C	4		Persistente	

EHM (encefalopatía hepática mínima), EH (encefalopatía hepática)

Los tipos A, B y C denotan la asociación de la EH con una Falla Hepática Aguda (A), con un bypass o shunt portosistémico (B) o con cirrosis (C). Se han utilizado los términos encefalopatía hepática cubierta para designar a los estadios de EHM y el grado I de la clasificación de WH. De la misma manera, la encefalopatía evidente abarcaría los grados 2, 3 y 4 de la misma clasificación. Se refiere a EH episódica aquella que ocurre en momentos con una distancia temporal mayor a 6 meses. Cuando es menor a este tiempo se le denomina recurrente, y persistente es cuando el estado neurológico alterado está la mayoría del tiempo (AASLD/EASL, 2014).

2.3. Pruebas neuropsicológicas

Es de importancia el reconocimiento de la EHM, la cual es definida por la evidencia de alteraciones neuropsiquiátricas en algunas baterías de pruebas neuropsicológicas, sin síntomas clínicos evidentes. Entre estas pruebas se encuentra el PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score), con múltiples subclasificaciones asociadas a conexión numérica y organización de figuras. Esta prueba ha sido validada en múltiples estudios de pacientes con cirrosis y pacientes de habla hispana. Además tiene la ventaja de que el tiempo de aplicación es corto. Otras pruebas utilizan mediciones psicofísicas, como el caso de la frecuencia crítica de parpadeo (Critical Flicker Frecuency, CFF), la cual evalúa la atención en general y se ha demostrado que identifica a los pacientes con un PHES anormal. Para su realización se requiere de por lo menos un equipo de realidad virtual. De forma global, estas pruebas tienen la desventaja de que el tiempo necesario para su

implementación es mayor a lo deseado para una consulta individual; y que su realización se afecta por el consumo de alcohol o drogas, las cuales son situaciones no infrecuentes en pacientes con enfermedad hepática (Jiménez, 2010) (Córdoba, 2011) (Romero, 2006).

2.4. Factores precipitantes y fisiopatología

Se han descrito múltiples factores precipitantes para la EH, los cuales se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Factores precipitantes para EH en orden decreciente.

EH episódica	**EH recurrente**
Infecciones	Trastornos electrolíticos
Sangrado gastrointestinal	Infecciones
Sobredosis de diuréticos	Sin identificar
Trastornos electrolíticos	Constipación
Constipación	Sobredosis de diuréticos
Sin identificar	Sangrado gastrointestinal

EH (encefalopatía hepática)

La fisiopatología no se ha logrado determinar de forma precisa, con diversas teorías que no han podido utilizarse confiablemente en la práctica clínica. Históricamente, el amonio derivado del metabolismo alterado de la urea ha sido reconocido como metabolito participante de la fisiopatología. Las bacterias presentes en el colon y enzimas mucosas digieren las cadenas proteicas, liberando amonio desde el intestino, que posteriormente entra a la circulación portal y se convierte a urea en el hígado. Cuando los mecanismos del ciclo de la urea fallan,

como en la insuficiencia hepática, este amonio se acumula y se libera a la circulación sistémica. En el sistema nervioso central (SNC), los niveles altos de amonio cruzan la barrera hemato-encefálica, dentro del cual los astrocitos, a través de la sintetasa de glutamina, lo convierten junto con el glutamato en glutamina, la cual actúa como osmolito e incrementa el volumen cerebral. También se ha estudiado el efecto del amonio como neurotoxina que disminuye la neurotransmisión excitatoria. Sin embargo, los estudios realizados con éste han fallado en mostrar alguna utilidad diagnóstica o terapéutica del mismo (Wijdicks, 2016).

2.5. Definición metabolómica

La metabolómica es considerada el punto final del orden jerárquico de la cascada de las ciencias “ómicas” y se encuentra en el nivel de la genómica, transcriptómica y proteómica. La metabolómica se define como la disciplina científica encargada de estudiar pequeñas moléculas denominadas metabolitos, definidos como aquellas moléculas orgánicas menores a 1,500 Daltons, que pueden ser importantes moduladores, sustratos, subproductos o bloques de construcción de diversos procesos biológicos. Por medio de su estudio es posible caracterizar el complemento de moléculas pequeñas de una muestra determinada y correlacionar las redes metabólicas en condiciones normales y patológicas, de manera cualitativa y cuantitativa (Riekeberg, 2017) (Ballarobre, 2013).

Las técnicas más utilizadas para estudios de aproximación metabolómica son las cromatografías de líquidos (CL) y gases (CG), la espectrometría de masas (EM) y la resonancia magnética nuclear de protón (^{1}HRMN). Cada plataforma tiene fortalezas y debilidades, a continuación se presenta una tabla comparativa entre la ^{1}HRMN y la EM (Gowda, 2008) (Zul, 2022).

Tabla 4. Comparación de características analíticas entre ^{1}HRMN y EM.

	^{1}HRMN	CL-EM
Preparación de la muestra	Nula-mínima	Mínima-moderada
Volumen de muestra típico	200-800 µL	≤ 1 µL
Intervalo de detección típico	µM-mM	µM-pM
Tipo de metabolitos identificados	Todo tipo de compuestos que contengan átomos de hidrógeno	Todo tipo de compuestos capaces de formar iones estables
Número de metabolitos identificado por análisis	Moderado (Decenas-Centenas)	Muy alto (Decenas-Millares)
Cuantificación	Medianes múltiples tipos de estándar externo o interno	Mediante estándar externo o interno, aunque con diversas limitaciones
Tiempo de análisis instrumental	Mínimo 2 minutos (más el tiempo equilibrio térmico)	Variable y dependiente del método de separación
Reproducibilidad	Muy alta	Moderada a baja
Recuperación de la muestra	Muy alta	Nula

2.6. Análisis metabolómico basado en ^{1}HRMN

La ^{1}HRMN es una técnica empleada en la química analítica principalmente para la elucidación estructural de las moléculas. Las señales observadas en el espectro de ^{1}HRMN están relacionadas con la composición de la mezcla y a partir de un análisis cuidadoso es posible identificar las señales características de los metabolitos mayoritarios presentes. Dado el gran número de señales que son detectadas de forma simultánea, para establecer si existen diferencias en la composición de los metabolitos presentes, es necesario aplicar métodos de estadística multivariable. Algunos de los métodos más utilizados por su accesibilidad y correlación son el análisis de componentes principales (PCA) y métodos jerárquicos de análisis de cluster (HCA) como métodos no supervisados y el de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) como métodos supervisados (Cambiaghi, 2016).

A continuación, se muestra un espectro de ^{1}HRMN de una muestra de suero de un paciente con hepatocarcinoma (Fages, 2015).

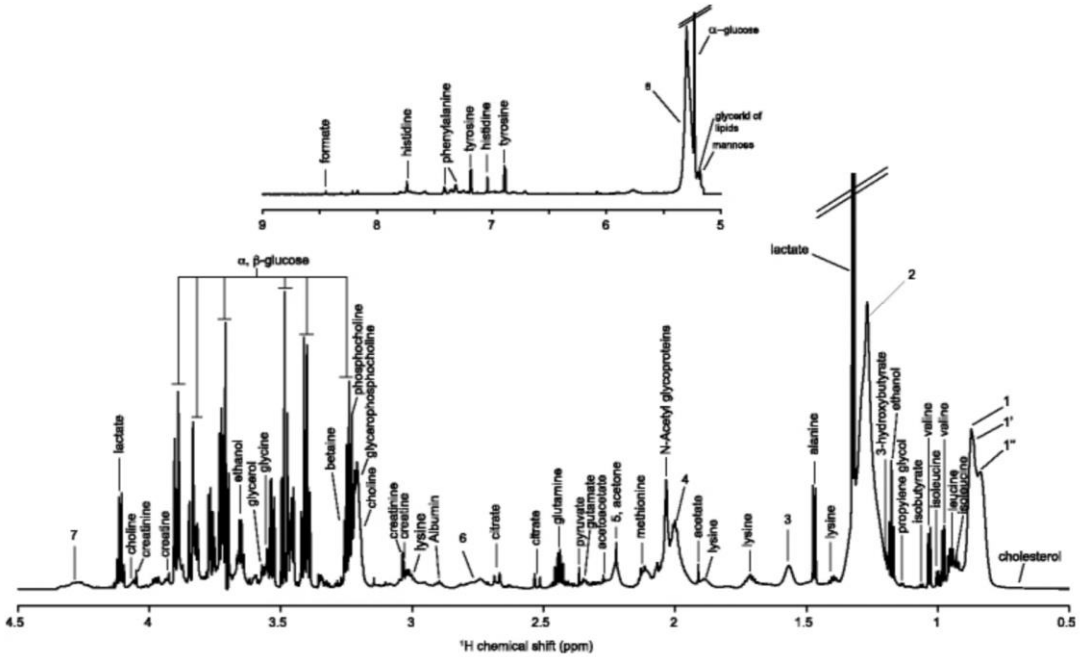


Figura 1. *Espectro de [1]H-RMN (800 MHz, CPMG) del suero de un paciente con hepatocarcinoma celular. En el espectro destaca por su marcada intensidad la señal del lactato, sin embargo, las señales de otros metabolitos son fácilmente distinguibles como carbohidratos, aminoácidos y lípidos.*

2.7. Metabolómica y hepatopatía crónica

Se ha demostrado el uso potencial de la metabolómica en la producción de perfiles metabólicos para su uso como modelos diagnósticos y terapéuticos. En lo que concierne a la EH, Dabos *et al.* compararon en el 2015 el perfil metabolómico de 18 pacientes con cirrosis sin diagnóstico de EH, 18 pacientes con cirrosis y EH y 17 controles sanos mediante espectroscopía por [1]HRMN. Se demostró que existía un aumento en el lactato y otros 5 aminoácidos involucrados en la gluconeogénesis que indicaban una alteración de la producción de energía en pacientes con hepatopatía con y sin EH en comparación con los sujetos sanos, así como un aumento del acetoacetato en pacientes con EH en comparación con aquellos sin

EH, de manera significativa, demostrando una alteración franca en la manera en que se utilizan las cetonas entre los grupos, lo cual sugiere un daño a nivel de la cetogénesis en la EH. De igual manera, se definió un perfil de 4 metabolitos que, cuando su suma era menor a 1.5 milimoles/litro, tenía una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de 84%, 88%, 89% y 83%, respectivamente. Lo interesante es la creación de perfiles metabólicos potencialmente medibles que ayuden a abordar al paciente que llega con datos clínicos de encefalopatía y que, podrían aislar causas externas en determinado momento. Se ha investigado también la diferencia en el perfil metabolómico de pacientes con EHM con controles sin EH. Jiménez *et al*., compararon el perfil metabolómico sérico de 69 controles, 62 pacientes con cirrosis sin EH subclínica y 39 pacientes con EH subclínica por medio de espectrometría de ^{1}HRMN. Los pacientes con EHM presentaron concentraciones mayores de glucosa, lactato, metionina, N-óxido de trimetilamina (TMAO) y glicerol y menores de colina, aminoácidos ramificados, alanina, glicina, acetoacetato, N-Acetil-cisteína, concluyendo que existe una diferencia marcada entre múltiples metabolitos en pacientes con y sin EH, aumentando la necesidad de la utilización de la espectrometría por ^{1}HRMN con la intención de generar dianas moleculares (Dabos, 2015) (Jiménez, 2010).

Lamentablemente, en nuestro país, no se han realizado estudios de este tipo que describan las características de la EH a nivel molecular, y que pueden estar asociadas a la progresión.

2.8. Justificación

La identificación clínica de la EH comúnmente es tardía y el uso de pruebas neuropsicológicas requiere de mucho tiempo y son poco precisas. La medición simple de un parámetro en sangre periférica que objetivamente refleje la presencia de EH en paciente con cirrosis hepática sería muy deseable en la práctica clínica diaria. Establecer un conjunto de metabolitos asociados con el desarrollo de esta enfermedad ayudaría a crear hipótesis diagnósticas, pronósticas y terapéuticas.

El estudio metabolómico por espectrometría de ^{1}HRMN representa una estrategia, con ventajas tales como la posibilidad de detección de numerosos tipos de metabolitos con una mínima preparación de la muestra.

Es por esto que establecer los perfiles metabolómicos por esta metodología en el suero de pacientes con EH permitirá caracterizar las distintas fases clínicas y plantear hipótesis moleculares útiles en el abordaje de esta enfermedad.

CAPITULO III

HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis Verdadera

Existe diferencia en los perfiles metabolómicos dependiendo del grado de encefalopatía hepática.

3.2. Hipótesis Nula

No existe diferencia en los perfiles metabolómicos dependiendo del grado de encefalopatía hepática.

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Caracterizar el perfil metabolómico sérico de diversos estadios clínicos de severidad de la EH mediante ^{1}HRMN, y establecer diferencias entre grupos.

4.2. Objetivos Específicos

- Identificar pacientes con EH en el período agudo de su hospitalización o en consulta externa y estadificarlos según la escala clínica de WH o valoración neuropsicológica, además de evaluar marcadores bioquímicos y hematológicos después de ser clasificados.
- Obtener el perfil metabolómico por ^{1}HRMN de suero de pacientes con diversos estadios de EH, pacientes con hepatopatía crónica sin EH y controles sanos.
- Analizar los perfiles metabolómicos de diversos estadios de la EH y comparar contra el grupo control de hepatopatía crónica sin EH y contra controles sanos.
- Establecer las vías metabólicas implicadas en los grupos de pacientes con EH.

CAPÍTULO V

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño metodológico

Estudio de tipo observacional, comparativo, analítico y de corte transversal; el cual fue realizado en la Unidad de Hígado, el área de hospitalización del Departamento de Medicina Interna, servicio de Urgencias y en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González y en colaboración con la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

5.2. Selección y Tamaño de la muestra

Para establecer el perfil metabolómico sérico de pacientes con hepatopatía crónica con y sin encefalopatía, fue preciso contar con la disponibilidad de grupos de pacientes que estén diagnosticados con esta patología y que fueron clasificados de acuerdo a la etapa clínica de WH o bien por pruebas neuropsicológicas.

Los grupos de pacientes invitados a participar fueron del servicio de urgencias, del área de hospitalización del servicio de Medicina Interna, de la consulta de Unidad de Hígado o bien de la consulta de Medicina Interna del Hospital

Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL. Además se compararon con un grupo de controles sanos.

Se clasificaron en 4 grupos con una n total a conveniencia.

- Pacientes con EHM o EH grado I de la escala de WH. (WH1)
- Pacientes con EH grado II de la escala de WH. (WH2)
- Pacientes con hepatopatía crónica, sin alteraciones neuropsicológicas y por lo tanto cognitivamente íntegro. (HSE)
- Sujetos sin enfermedad hepática y sin encefalopatía.

5.3. Aprobación por el comité de ética

El estudio fue aprobado por el comité de ética institucional con el registro: MI19-00007.

5.4. Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años.
- Diagnóstico de hepatopatía crónica de cualquier etiología y ausencia total de la misma.
- Diagnóstico de EH en grado de severidad 1 o 2 o ausencia de la misma determinado mediante prueba neuropsicológica.

- Pacientes que ingresaron al servicio de urgencias o consulta externa de Medicina Interna o Unidad de Hígado del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” UANL.
- Firma de consentimiento informado.

5.5. Criterios de exclusión

- Pacientes con alteración del estado de la consciencia con duda diagnóstica, en los que no se descartaron causas secundarias que pudieron causar o agravar EH, tales como: traumatismo craneoencefálico, sangrado intracraneal, síndrome urémico, infección del SNC, intoxicación.
- Pacientes con EH por insuficiencia hepática aguda.
- Pacientes que no contaran con laboratorios generales debido a cualquier causa.
- En el grupo 4, se excluyeron sujetos con una condición comórbida aguda que alteró el análisis de los resultados, así como aquellos con alteración de las pruebas de función hepática por cualquier causa.

5.6. Variables

a) Datos demográficos: edad, sexo.
b) Datos antropométricos: peso, IMC.
c) Parámetros hematológicos y bioquímicos: hemoglobina, leucocitos, plaquetas, glucosa, creatinina, aspartato aminotransferasa (AST), alanina

aminotransferasa (ALT), bilirrubina total (BT), fosfatasa alcalina (FA), albúmina.

5.7. Consentimiento informado

Para la aplicación del consentimiento informado se determinó que el investigador principal o tesista explicara el contenido del consentimiento previo a la inclusión del sujeto para posteriormente ser firmado por escrito. Se explicó el estudio que se realizó y aclaró posibles dudas. Mismo consentimiento fue firmado por el sujeto en cuestión y 2 testigos antes de realizar cualquier procedimiento. Finalmente se proporcionó una copia del consentimiento al sujeto y el otro fue anexado a la carpeta de investigación.

5.8. Procedimiento

Para el análisis bioquímico se tomaron muestras de sangre en ayuno, mientras que para las muestras que se usaron para el análisis metabolómico no se requirió periodo de ayuno. Para las muestras que se usaron para el análisis bioquímico se siguieron los protocolos del Hospital Universitario, mientras que para las muestras que se usaron para el análisis metabolómico se estableció como máximo 1 hora entre la toma de la muestra y su refrigeración para posteriormente mantenerse a -80°C.

5.9. Análisis metabolómico de suero por ^{1}HRMN.

Para la preparación de las muestras para estudio de ^{1}HRMN se tomó una alícuota de 400 µL de suero a la que se le añadieron 400 µL de buffer de fosfatos 0.2 M a pH 7.4 (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, Sigma-Aldrich, USA) al 20% de agua deuterada (D_2O al 0.75% TSP, Sigma-Aldrich, USA), se homogenizó mediante agitación vórtex por 30 segundos y posteriormente fueron criopreservadas a -80 °C hasta su análisis por ^{1}HRMN. Los experimentos de ^{1}HRMN se realizaron en un equipo Aligent de 600 MHz. (Figura 2) Los datos de ^{1}HRMN se obtuvieron a través del experimento Carr-Purcell-Meibomm-Gill (CPMG) con presaturación, que permite eliminar la detección de la señal del agua y filtrar las señales de las proteínas presentes en el suero aprovechando las diferencias de relación entre estas macromoléculas y los metabolitos. Los espectros de ^{1}HRMN se pre-procesaron con el software MestReNova 14.3.0. Para la identificación de metabolitos diferenciales se utilizó el software Chenomx NMR Suite 9.0 Professional, lo que permitió realizar la asignación de las señales con datos previamente reportados en la literatura que fueron verificados con valores de constantes de acoplamiento de ^{1}H y datos de desplazamiento químico de ^{13}C a partir del espectro HSQC de muestras seleccionadas (Psychogios, 2011).

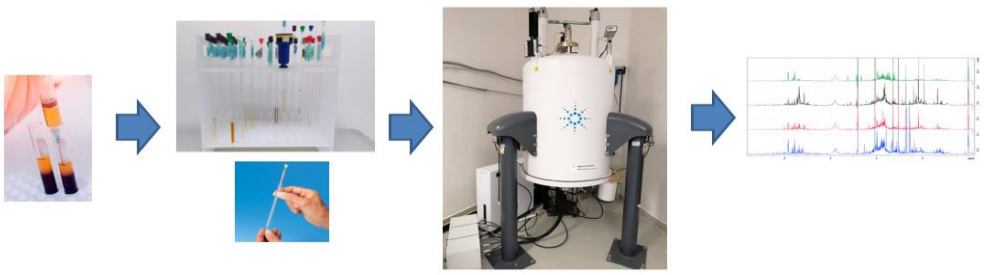


***Figura 2**. Esquema de la preparación y procedimiento para generación del espectro.*

5.10. Cuantificación de metabolitos

Se tomaron en cuenta los metabolitos identificados previamente que presentaron una señal que fuera posible cuantificar y fueron integrados de forma manual con el software TopSpin 3.6. Se determinó una concentración relativa de los metabolitos empleando el análisis estadístico multivaribale de los cocientes de concentración metabolito/creatinina en la plataforma MetaboAnalyst obteniendo los datos de entrada para la construcción del modelo y empleando posteriormente el método PLS-DA.

5.11. Análisis de datos

Todos los datos fueron capturados en una base de datos a través del paquete Excel y se realizó un análisis descriptivo y análisis bivariado para comparar características poblacionales básicas. Para la ejecución estadística se utilizó el software estadístico R versión 4.0. Un valor de $p<0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

CAPITULO VI

RESULTADOS

Se analizaron 65 sujetos en el estudio que fueron asignados en grupos de acuerdo a su estadificación clínica empleando la escala de WH o empleando la prueba de PHES, como se muestra en la Figura 3. A los cuales se analizaron los siguientes parámetros hematológicos y marcadores bioquímicos: hemoglobina, leucocitos, plaquetas, glucosa, creatinina, AST, ALT, BT, FA y albúmina. Posteriormente se analizó a estos grupos el perfil metabolómico.

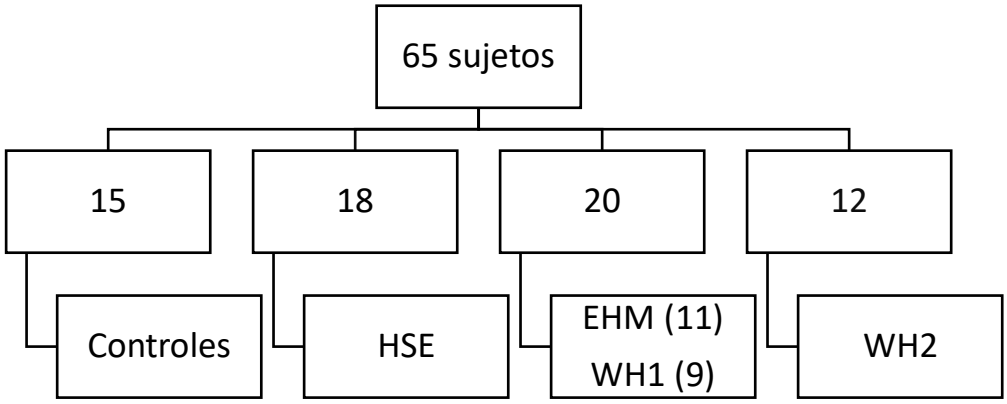


Figura 3. *Grupos de estudio para el análisis hematológico, bioquímico y metabolómico. HSE (hepatopatía sin encefalopatía), EHM/WH1 (encefalopatía hepática mínima/West Haven 1), WH2 (West Haven 2).*

6.1. Parámetros antropométricos.

De los 65 sujetos analizados en este estudio, 21 fueron mujeres (32.3%) y 44 hombres (67.7%). La mediana de edad fue de 48 años en la población total, con una mediana de 21 años en el grupo control, 39 años en el grupo de paciente con HSE, 45 años en el grupo de pacientes con EHM y WH1 y 53 años en el grupo de pacientes con encefalopatía WH2. En la tabla 5 se muestran las características de cada grupo.

Tabla 5. Características demográficas clasificadas por grupos de acuerdo a grado de encefalopatía.

n=65	***Controles n=15***	***HSE n=18***	***EHM/WH1 n=20***	***WH2 n=12***	***valor de p***
Edad	*21.5(20.0-23.0)*	*39.5(30.0-49.0)*	*45.7(34.0-55.5)*	*53.7(41.0-58.0)*	*<0.001*
Peso	*75.0(65.2-82.1)*	*72.8(65.0-79.5)*	*70.0(65.0-80.0)*	*75.0(68.1-78.5)*	*0.65*
IMC	*25.4(24.5-28.1)*	*26.4(24.2-27.6)*	*25.4(23.7-28.1)*	*26.1(24.7-27.8)*	*0.94*

HSE (hepatopatía sin encefalopatía), EHM/WH1 (encefalopatía hepática mínima/West Haven 1), WH2 (West Haven 2).

6.2. Parámetros hematológicos y bioquímicos

Los parámetros hematológicos y bioquímicos analizados fueron hemoglobina, leucocitos, plaquetas, glucosa, creatinina, AST, ALT, BT, FA y albúmina.

En el grupo total se obtuvo una mediana de hemoglobina de 11.5 g/dL, leucocitos 5,600 células/µL, plaquetas 120,000 células/µL, glucosa de 95 mg/dL,

creatinina 0.9 mg/dL, AST 38 U/L, ALT 25 U/L, BT 1.25 mg/dL, FA 104 U/L y albúmina 3 g/dL. En la tabla 6 se reportan las medianas y rangos intercuartiles de los parámetros hematológicos y bioquímicos previamente mencionados.

Tabla 6. Parámetros hematológicos y bioquímicos de los 4 grupos de estudio.

n=65	Controles n=15	HSE n=18	EHM/WH1 n=20	WH2 n=12	Valor de *p*
Biometría hemática					
Hemoglobina	14.4(11.2-14.7)	8.7(7.1-10.6)	8.0(6.0-9.3)	8.8(7.6-10.4)	<0.001
Plaquetas	223,000(218,500-253,500)	118,500(72,250-146,750)	87,500(56,400-120,000)	108,000(99,250-143,500)	<0.001
Leucocitos	5,700(5,300-7,450)	5,250(3,972-7,395)	4,350(2,660-6,680)	8,060(5,675-11,625)	0.06
Química sanguínea					
Glucosa	93.0(88.5-97.0)	103.5(90.2-120.2)	98.0(84.5-134.0)	97.0(86.7-133.2)	0.54
Creatinina	1.0(0.9-1.1)	0.7(0.6-0.8)	0.8(0.6-0.9)	1.0(0.6-1.7)	0.004
Pruebas de función hepática					
AST	27.0(23.5-29.5)	43.5(31.2-68.7)	37.0(31.5-71.0)	62.5(50.0-83.0)	<.001
ALT	22.0(16.0-29.0)	27.5(24.0-38.5)	23.5(17.0-40.5)	25.0(19.5-29.5)	0.22
BT	0.6(0.4-0.7)	1.3(0.9-2.5)	1.7(0.9-2.3)	2.3(1.5-3.3)	<.001
FA	74.0(68.0-92.0)	112.0(81.5-159.5)	108.0(68.0-142.2)	138.5(76.2-209.0)	0.04
Albúmina	4.5(4.4-4.7)	3.0(2.1-4.0)	2.9(2.4-3.0)	2.1(1.5-2.7)	<.001

HSE (hepatopatía sin encefalopatía), EHM/WH1 (encefalopatía hepática mínima/West Haven 1), WH2 (West Haven 2), AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa), BT (bilirrubina total), FA (fosfatasa alcalina).

Al realizar un análisis estadístico post hoc para evaluar las diferencias entre los grupos se obtuvieron los siguientes resultados hematológicos (Figura 4) y bioquímicos (Figura 5) significativamente diferentes:

- Hemoglobina: Control vs HSE p=0.001; Control vs EHM/WH1 y WH2 p<0.001. No hubo significancia estadística entre los grupos HSE, EHM/WH1 y WH2.

- Plaquetas: Control vs HSE p=0.001; Control vs EHM/WH1 p<0.001; Control vs WH2 p=0.001. No hubo diferencias entre los grupos HSE, EHM/WH1 y WH2.
- Creatinina: Control vs HSE p=0.001; Control vs EHM/WH1 p=0.01. No hubo significancia estadística entre Control y WH2 ni entre los grupos HSE, EHM/WH1 y WH2.
- AST: Control vs HSE p=0.01; Control vs EHM/WH1 p=0.01; Control vs WH2 p<0.001. No hubo diferencias entre los grupos HSE, EHM/WH1 y WH2.
- Fosfatasa alcalina: no hubo diferencias entre grupos.
- Bilirrubina total: Control vs HSE p=0.001; Control vs EHM/WH1 p<0.001; Control vs WH2 p<0.001. No hubo significancia estadística entre los grupos HSE, EHM/WH1 y WH2.
- Albúmina: Control vs HSE p<0.001; Control vs EHM/WH1 p<0.001; Control vs WH2 p<0.001. No hubo significancia estadística entre los demás grupos.

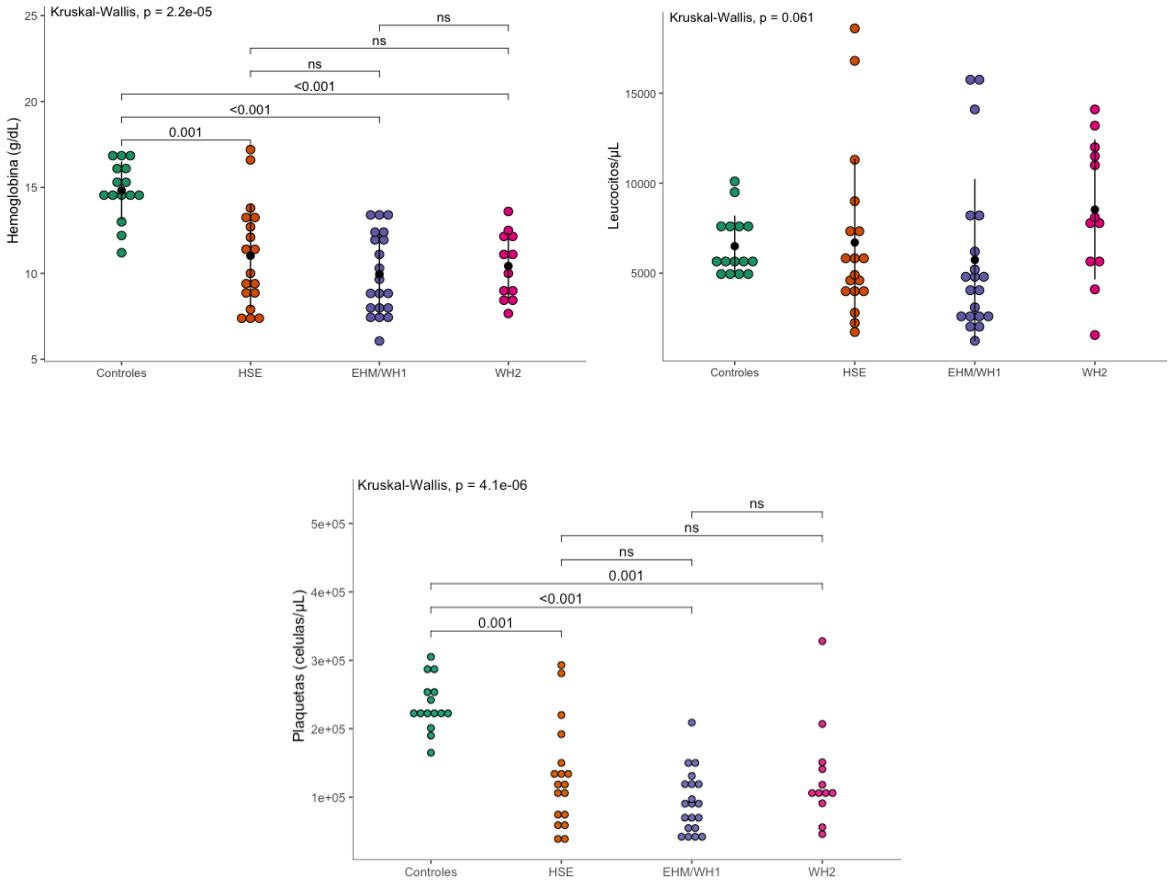
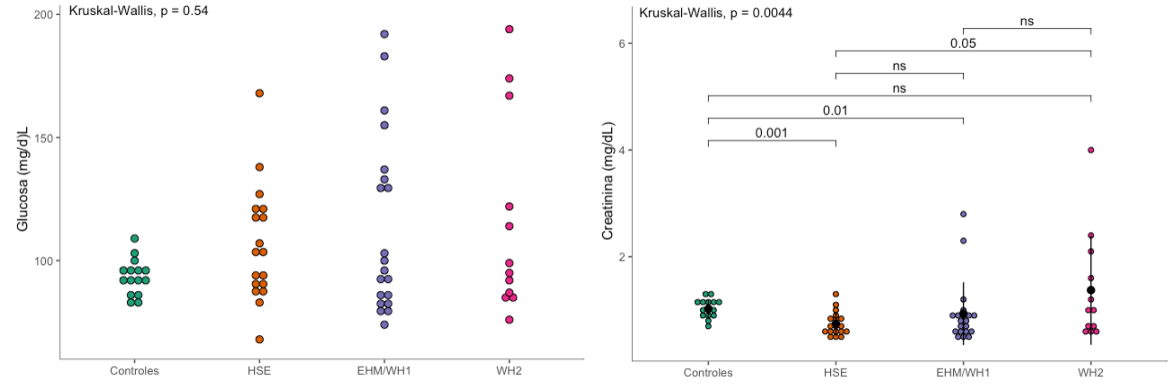


Figura 4. *Comparación de parámetros hematológicos en los diversos grupos de estudio. Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis.*



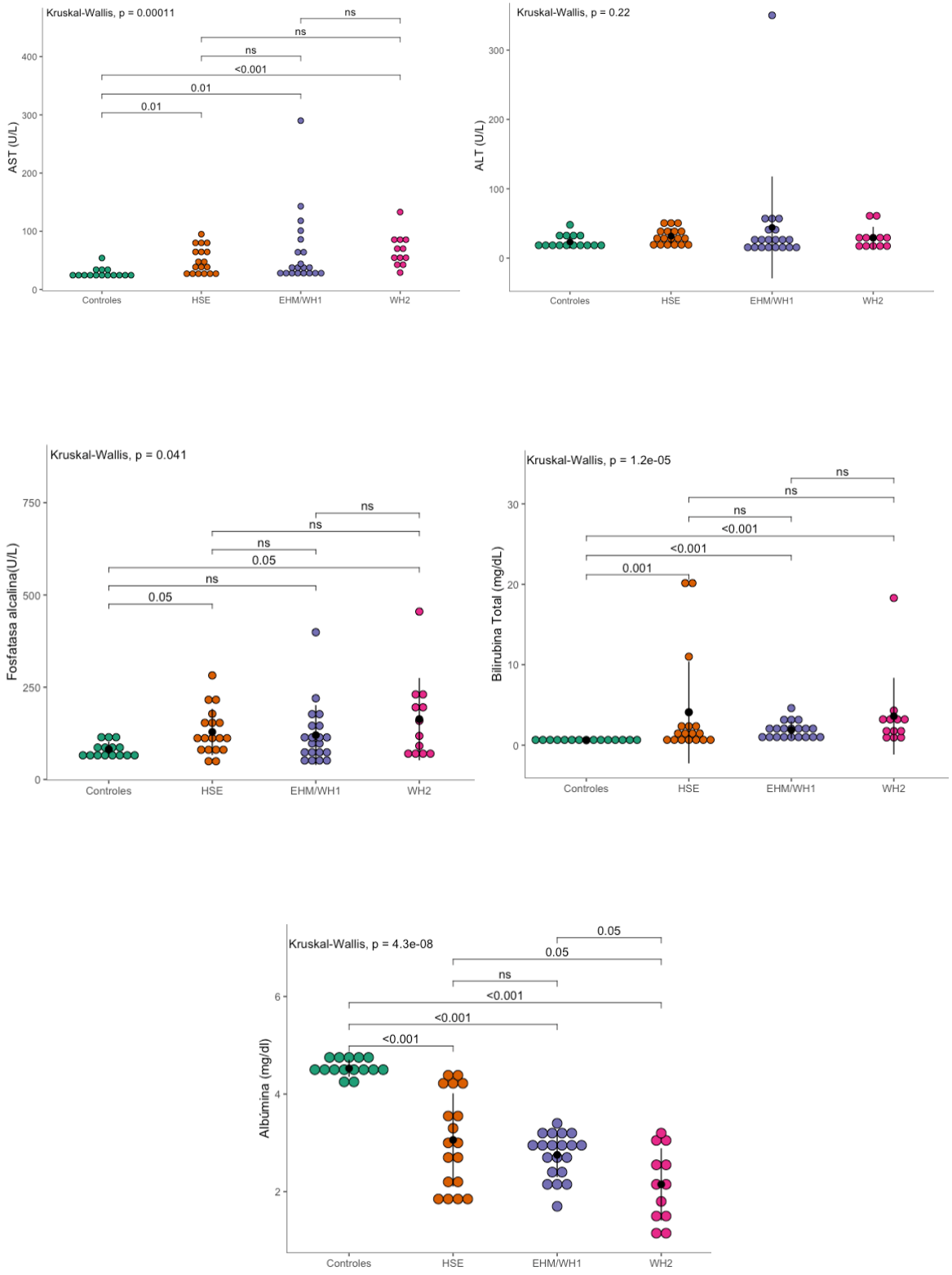


Figura 5. *Comparación de parámetros bioquímicos en los diversos grupos de estudio.*

6.3. Perfil metabolómico

En la figura 6 se muestra un espectro de ^{1}H-RMN de suero identificándose que cada señal corresponde a las señales de los diferentes metabolitos medidos en esta muestra biológica.

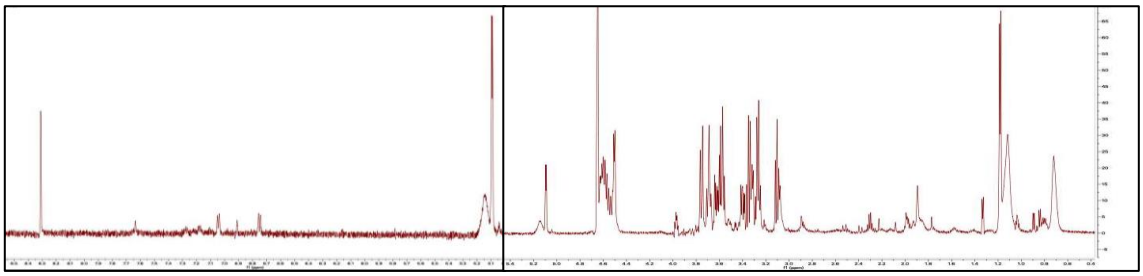


Figura 6. *Espectro de ^{1}H-RMN de suero de un paciente con EH (400 MHz, 10% D_2O), en donde se observan las señales características de los metabolitos presentes en este biofluido.*

En la figura 7 se observan los espectros de ^{1}HRMN de los 65 sujetos incluidos en los diversos grupos de estudio.

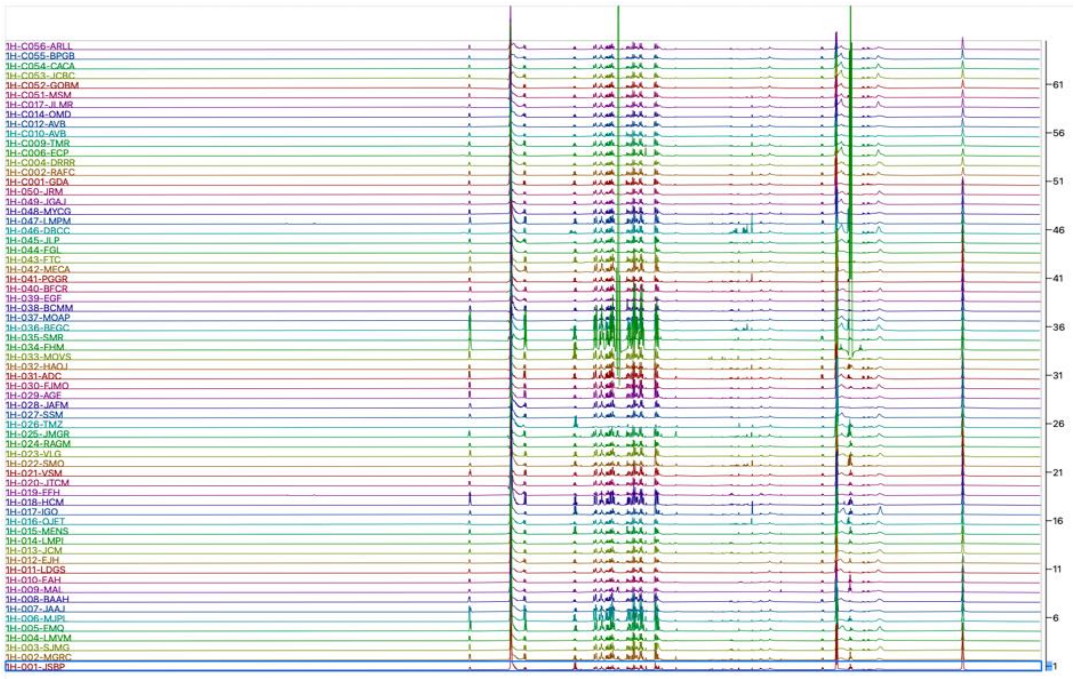


Figura 7. *Perfil metabolómico de suero por ^{1}HRMN de todos los sujetos de estudio.*

6.4. Identificación de los metabolitos

Al analizar los espectros de ^{1}HRMN del suero se identificaron diversos metabolitos. En las figuras 8 a la 12 se muestra un ejemplo de los espectros tanto del grupo control sano, así como de los pacientes con hepatopatía con y sin encefalopatía.

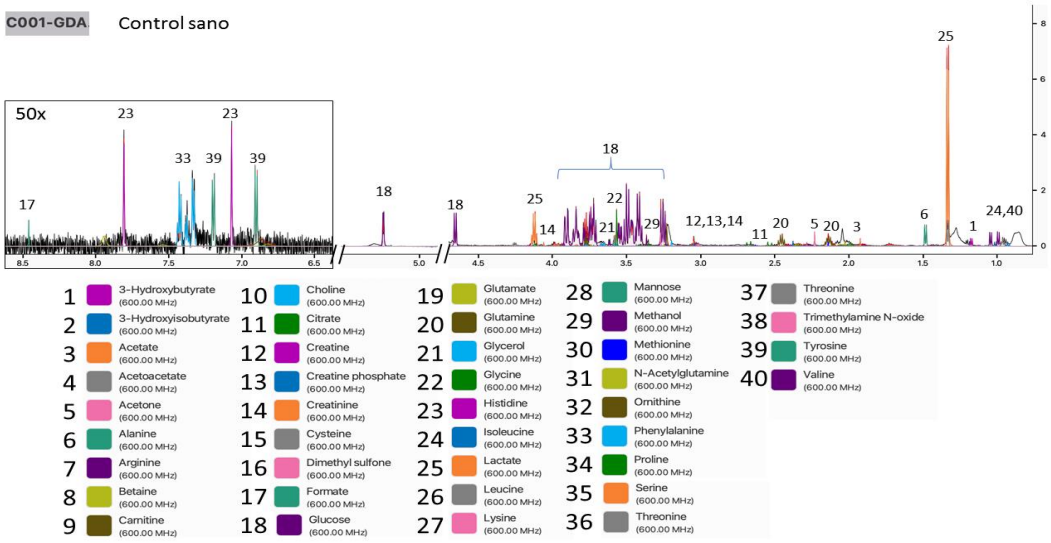


Figura 8. *Espectro de ^{1}HRMN en suero de un control sano.*

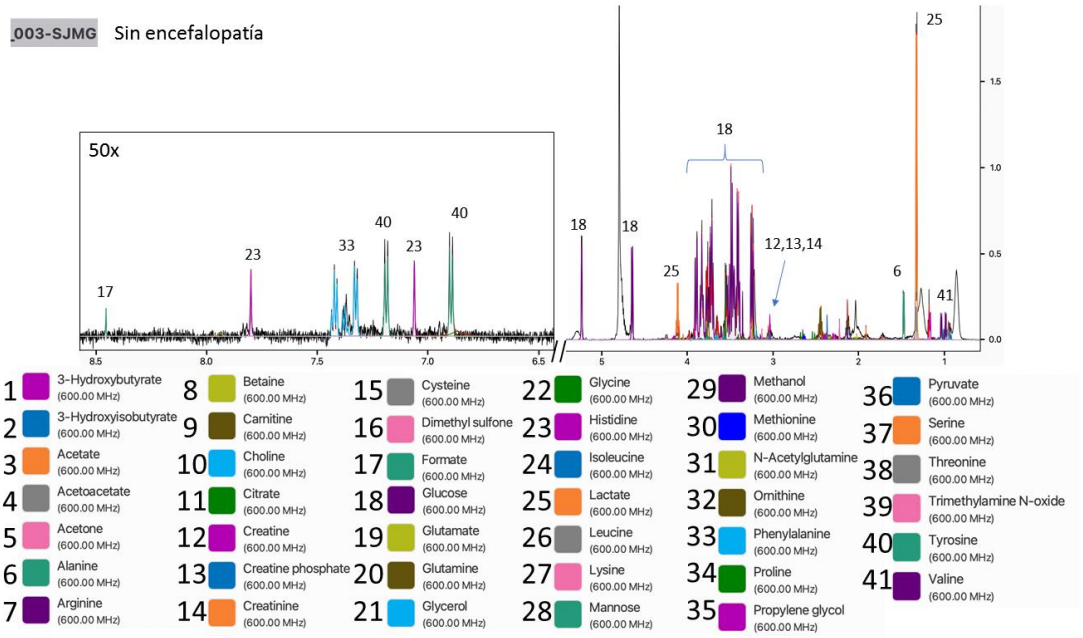


Figura 9. *Espectro de [1]HRMN en suero de un paciente sin encefalopatía.*

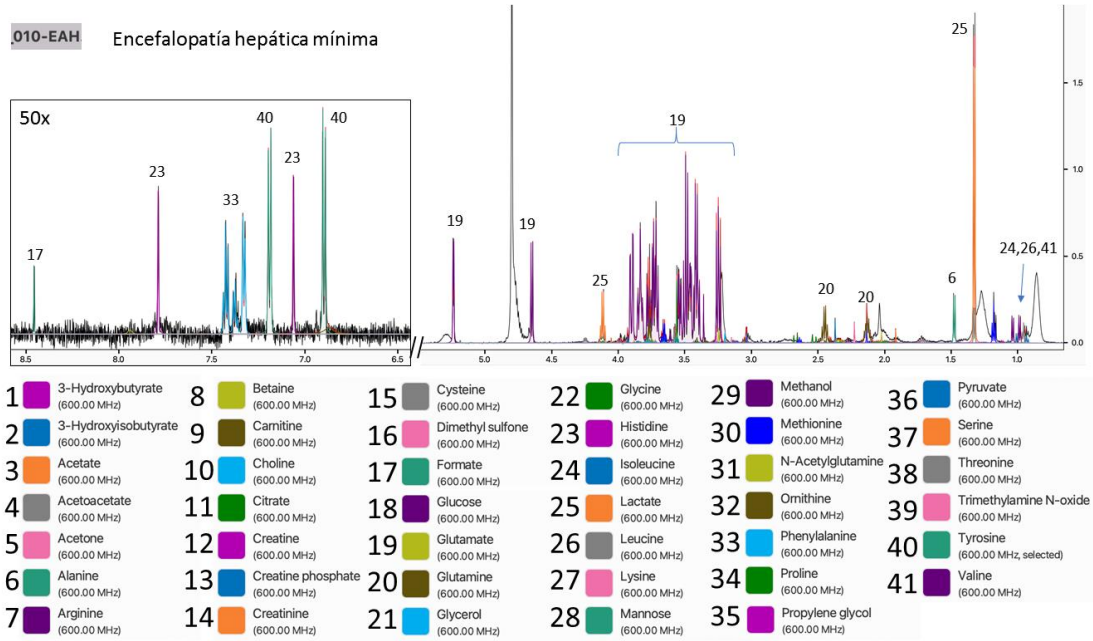


Figura 10. *Espectro de [1]HRMN en suero de un paciente con EHM.*

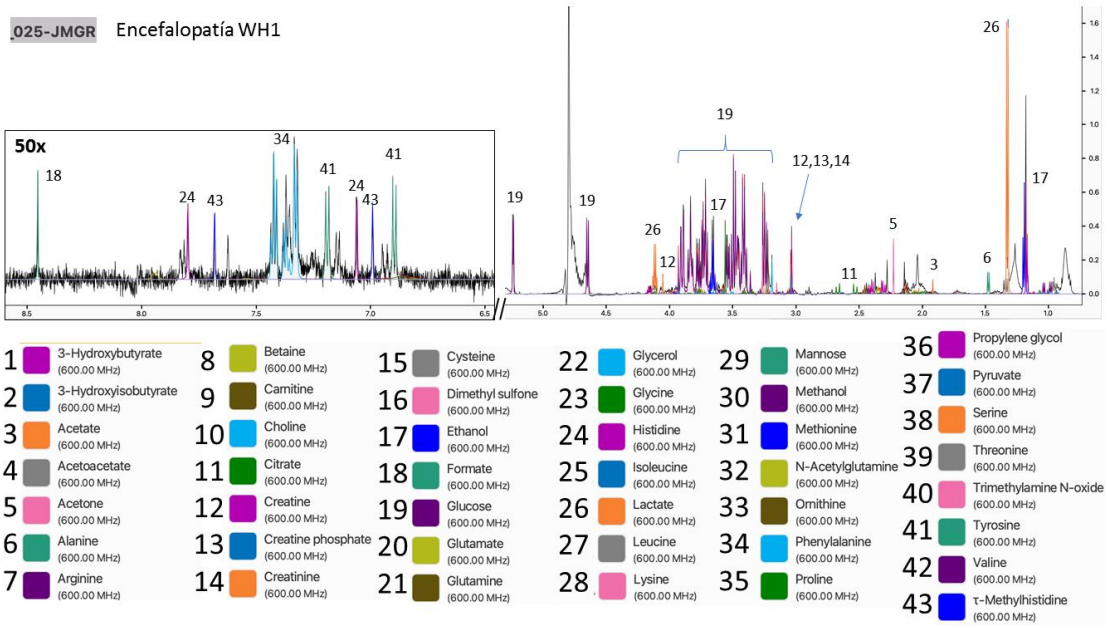


***Figura 11**. Espectro de ^{1}HRMN en suero de un paciente con encefalopatía WH1.*

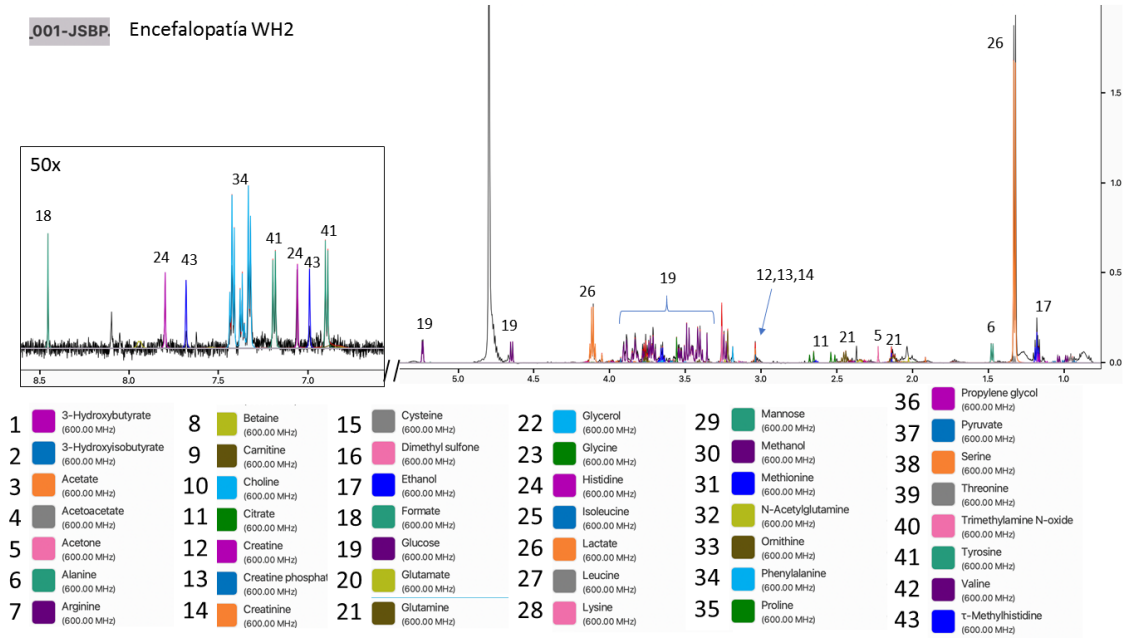


***Figura 12**. Espectro de ^{1}HRMN en suero de un paciente con encefalopatía WH2.*

En las figuras 13 y 14 se muestran los espectros por ^{1}HRMN separados de acuerdo a los diversos grupos de estudio donde llama la atención como se modifican las señales de citrato, piruvato, valina, formiato, histidina, fenilalanina y tirosina.

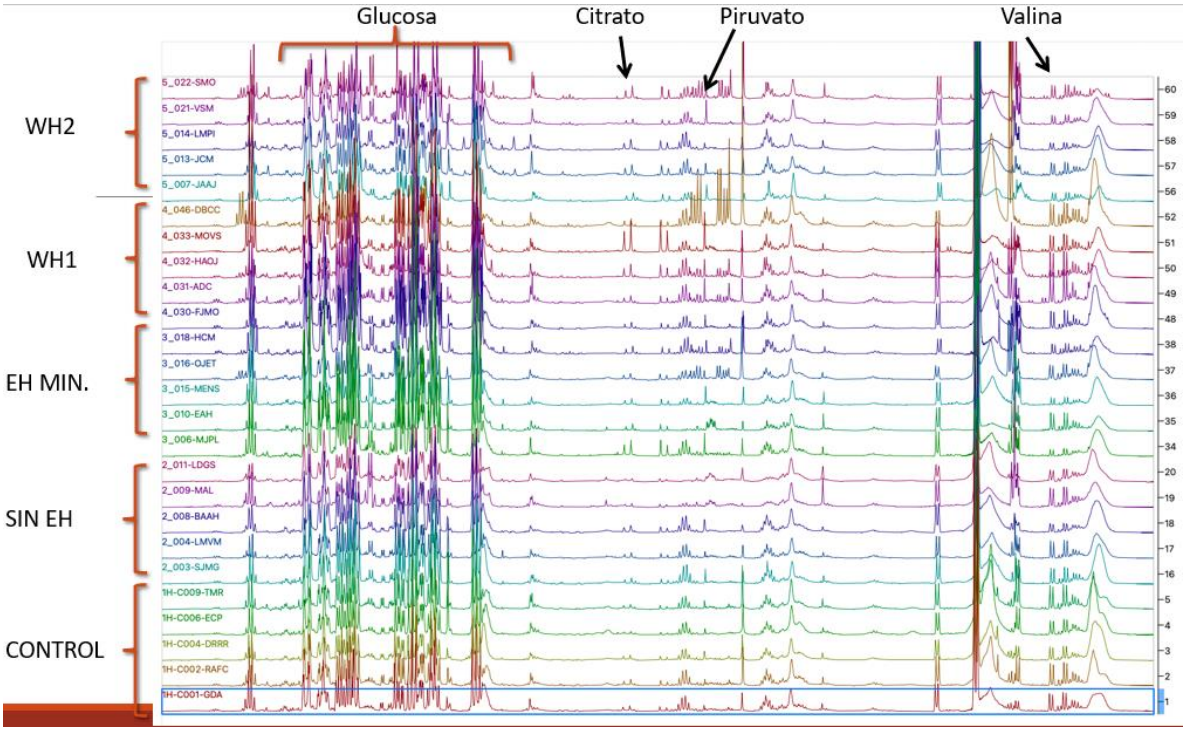


Figura 13. *Ejemplos de metabolitos que tienen diferencia de concentración entre los grupos.*

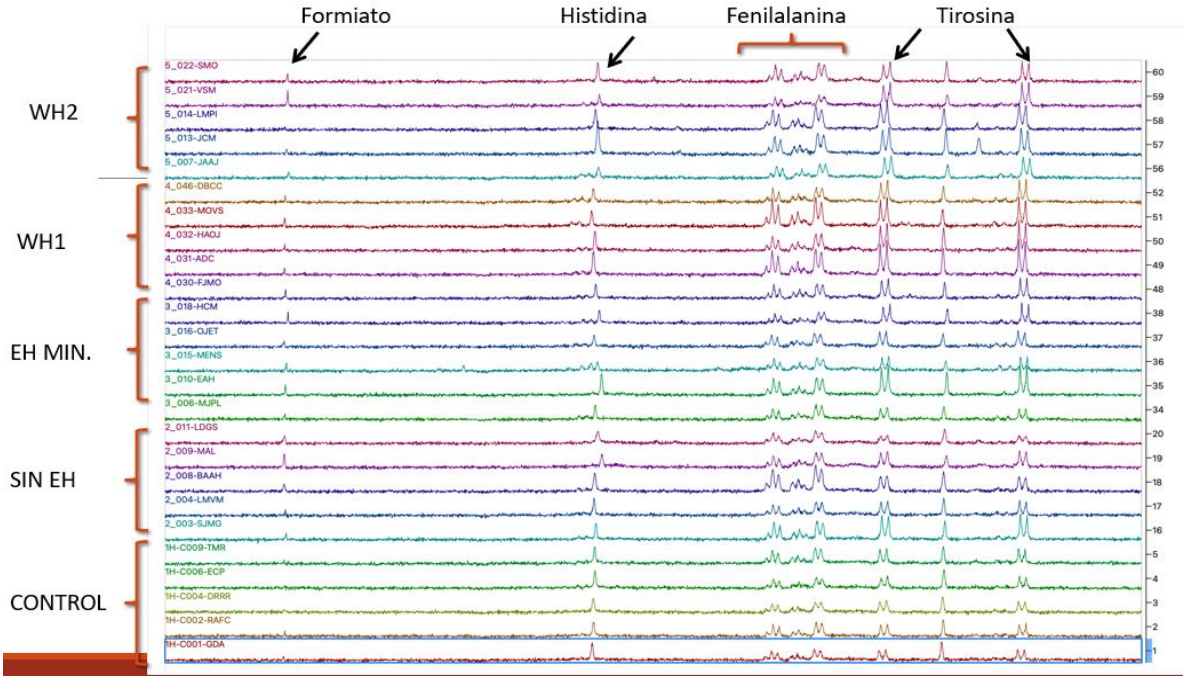


Figura 14. *Perfil metabolómico de suero por ^{1}HRMN de los diversos grupos de estudio. Para cada grupo se hizo una selección de espectros representativos.*

6.5. Cuantificación de los metabolitos

Aunque se identificaron diversos metabolitos en los grupos de estudio solo fue posible cuantificar metabolitos que cumplían con las condiciones de presentar al menos una señal de buena relación señal/ruido y con poco o ningún solapamiento con señales adyacentes.

Posterior a la identificación se cuantificaron diversos metabolitos empleando los cocientes de concentración metabolito/creatinina. En la Figura 15 se muestra los diversos metabolitos posterior a la normalización de las concentraciones de estos mismos.

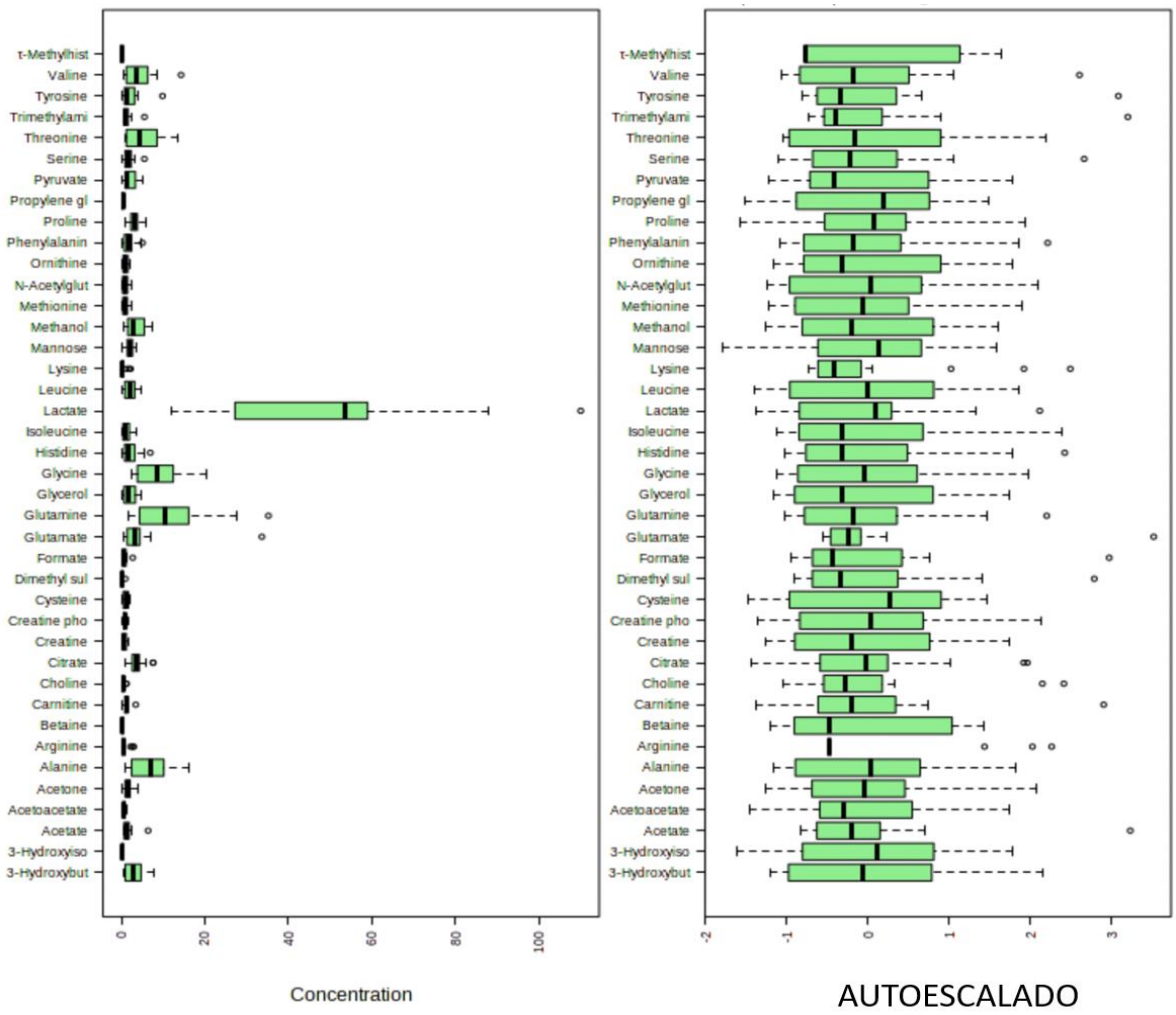


***Figura 15**. Metabolitos cuantificados en los grupos de estudio y magnificados empleando un autoescalado.*

En la Figura 16 se observan los gráficos obtenidos al realizar el estudio del PLS-DA donde al comparar el componente 1 con el componente 2 y de este tipo de estudio se observa una diferencia evidente entre sujetos del grupo control con los grupos con HSE y EHM, sin embargo, no se observa diferenciación entre WH1 y WH2, mientras que al comparar el componente 2 con el componente 3 se logra separar en forma más evidente a los pacientes con EHM de los demás grupos.

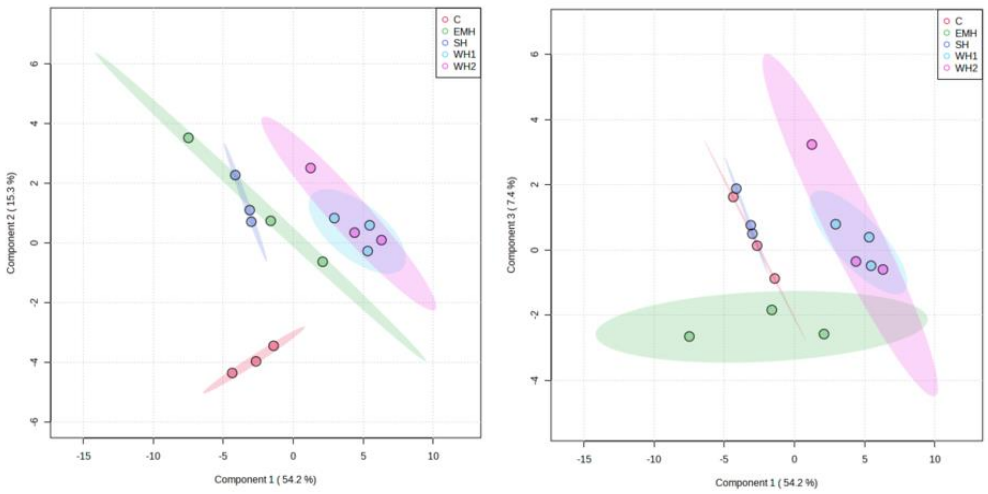


***Figura 16**. Gráfico de PLS-DA de los diversos grupos de estudio.*

Al transferir estos datos a una imagen tridimensional se logró identificar de forma más precisa las diferencias entre los diversos grupos, logrando evidenciar 14 metabolitos que permitieron diferenciar a los grupos de acuerdo a sus concentraciones (Figura 17).

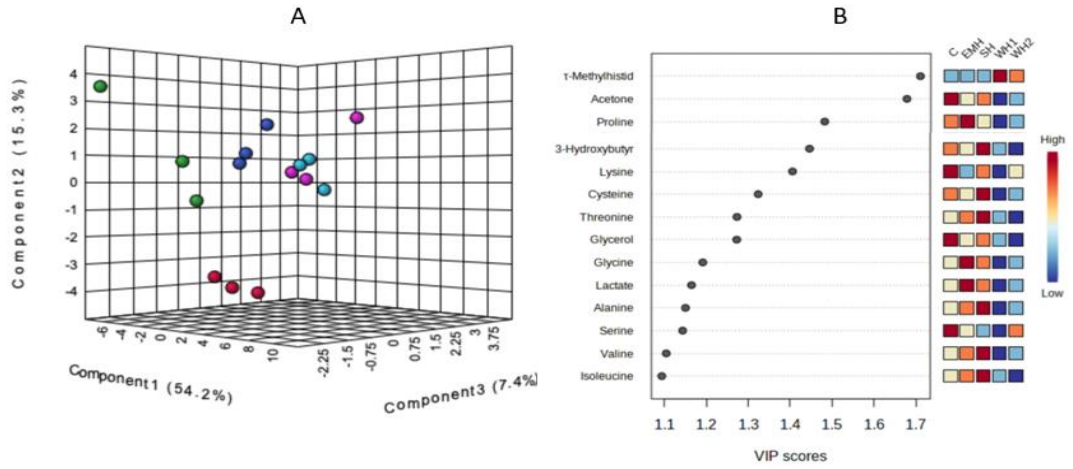
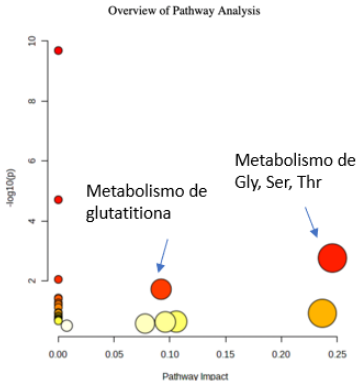


***Figura 17**. (A) Imagen tridimensional de los datos obtenidos por PLS-DA en los diversos grupos de estudio. (B) Metabolitos que permitieron diferenciar de acuerdo a su concentración a estos grupos.*

6.6. Vías metabólicas implicadas

Por medio de la plataforma MetaboAnalyst se identificaron las vías metabólicas en las que están implicados los metabolitos diferenciales previamente señalados. (Figura 18) Se logró identificar dos vías metabólicas significativas y con impacto las cuales fueron la vía del metabolismo de la glicina, serina y treonina, así como la vía del metabolismo del glutatión.



Pathway Name	Match Status	p	-log(p)	Holm p	FDR	Impact
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	8/48	2.0967E-10	9.6785	1.7612E-8	1.7612E-8	0.0
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	3/8	1.9458E-5	4.7109	0.0016151	8.1725E-4	0.0
Glycine, serine and threonine metabolism	3/33	0.0016988	2.7699	0.1393	0.047566	0.24577
Pantothenate and CoA biosynthesis	2/19	0.0087365	2.0587	0.70766	0.18347	0.0
Glutathione metabolism	2/28	0.018578	1.731	1.0	0.3121	0.09216
Valine, leucine and isoleucine degradation	2/40	0.036404	1.4388	1.0	0.45796	0.0
Synthesis and degradation of ketone bodies	1/5	0.038163	1.4184	1.0	0.45796	0.0
Thiamine metabolism	1/7	0.053051	1.2753	1.0	0.55704	0.0

***Figura 18**. Vías metabólicas implicadas de acuerdo a los metabolitos diferenciales.*

CAPITULO VII

DISCUSIÓN

Diversos estudios han analizado parámetros hematológicos y bioquímicos entre pacientes con hepatopatía con y sin encefalopatía. Coskun *et al*. compararon grupos de paciente con hepatopatía con y sin EHM y lograron identificar que no había diferencias entre los grupos en los parámetros hematológicos de hemoglobina, leucocitos y plaquetas; igualmente estos mismos autores reportaron que no había diferencias en las concentraciones de AST, ALT y albúmina al comparar los mismos grupos. Por otra parte, Zhang *et al*. reportaron que no había diferencias en las concentraciones de albúmina y de bilirrubina total al comparar pacientes con encefalopatía hepática leve y pacientes con HSE. Por otra parte, Rey *et al*. analizaron la concentración de hemoglobina, conteo de leucocitos y conteo de plaquetas y reportaron que estos parámetros hematológicos no permitían diferenciar a los grupos de pacientes clasificados como Child-Pugh A y B de aquellos pacientes clasificados como Child-Pugh C; de la misma manera analizaron la concentración de creatinina y determinaron que no había diferencias entre los grupos mencionados. Jeong *et al*. compararon pacientes con hepatopatía con y sin EHM y reportaron no había diferencia entre los grupos en los niveles de plaquetas, albúmina y bilirrubina total. En el presente estudio con respecto a los marcadores hematológicos y bioquímicos, estos permitieron diferenciar al grupo control de los grupos con hepatopatía, sin embargo, llama la atención la perdida de significancia

estadística al momento de comparar los grupos de pacientes con hepatopatía con diferentes grados de encefalopatía, de ahí la importancia de encontrar otros marcadores bioquímicos empleando las tecnologías ómicas (Coskun, 2017) (Zhang, 2021) (Rey, 2021) (Jeong, 2017).

Se ha descrito diversos estudios donde se han identificado una serie de metabolitos que han permitido diferenciar a pacientes cirróticos con y sin EH. Estos estudios han empleado diversas plataformas analíticas para establecer un perfil metabolómico que permita diferenciar al paciente con hepatopatía de un sujeto sano, así como de los grados de EH. Empleando la plataforma de ^{1}HRMN diversos estudios han sido realizados con este objetivo. Jiménez *et al*. describieron en suero de pacientes con EHM por ^{1}HRMN un aumento de glucosa, lactato, metionina, N-óxido de trimetilamina y glicerol así como una reducción de colina, BCAA, alanina, glicina, acetoacetato, glicoproteínas alfa-ácidas y lípidos al comparase con pacientes sin EHM (Jiménez, 2010), a su vez Dabos *et al*. reportaron también en suero por ^{1}HRMN que pacientes con cirrosis presentaban alteraciones significativas del metabolismo de los cuerpos cetónicos, la síntesis de urea y la gluconeogénesis en comparación con sujetos sanos, reportándose concentraciones más altas de acetoacetato, β-hidroxibutarato, glutamato, lactato, piruvato, treonina, aspartato y concentraciones más bajas de glutamina, histidina y arginina asociadas a estas vías; al comparar los pacientes cirróticos con y sin EH, también observaron un mayor trastorno del metabolismo de los cuerpos cetónicos y de la producción alterada de glutamina reportando niveles bajos en los pacientes con EH de β-hidroxibutirato, glutamina, glicerol, mioinositol y niveles altos de acetoacetato,

leucina e isoleucina implicados en estas vías. Este estudio logró mediante un análisis discriminante que los metabolitos tirosina, fenilalanina, metionina, piruvato y glicina diferencian al cirrótico del control sano, mientras que β-hidroxibutirato, glutamina, glicerol y glutamato diferencian al paciente con EH del cirrótico sin EH (Dabos, 2015). Por otro lado, McPhail *et al*. reportaron que pacientes cirróticos tenían niveles urinarios por ^{1}HRMN más altos de 1-metilnicotinamida y niveles más bajos de hipurato, acetato, fenilacetilglicina y ácido N-metilnicotínico al comparase con sujetos sanos, también describieron que cuando analizaron dentro de los cirróticos a los pacientes con EH evidente (≥WH2) estos también podrían discriminarse de aquellos sin EH, con niveles más altos de histidina, citrato y creatinina. Sin embargo, el perfil metabólico de ^{1}H-NMR urinario no discriminó a los pacientes con EH de aquellos sin EH cubierta (<WH2), ni discriminó a los sujetos sobre la base del resultado de PHES/EEG o la puntuación MELD (McPhail, 2017). Por otro lado, Iebba *et al*. describieron en heces analizadas también por ^{1}HRMN que en pacientes cirróticos los niveles fecales de metanol y treonina se asociaron positivamente con la presencia de EH y que los niveles de n-butirato se asociaron negativamente con la EH (Iebba, 2018). También han sido descritos perfiles metabolómicos en diversas matrices biológicas empleando otras herramientas analíticas en pacientes con hepatopatía con y sin EH. Bajaj *et al*. analizaron muestras de suero y de orina por CL/EM de pacientes que desarrollaron encefalopatía hepática evidente y lograron identificar 228 metabolitos en suero de los cuáles se reportaron los 20 metabolitos que permitieron discriminar de mejor manera el desenlace de EH contra hospitalización, trasplante hepático y muerte; los

20 metabolitos en suero fueron soforosa, leucina, oxoprolina, isoleucina, ácido esteárico, glicina, valina, ácido eicosenoico, ácido heptadecanoico, ácido 3-hidroxibutanoico, ácido palmítico, ácido linólico, ácido linoleico, xilitol, ácido oleico, ácido 2-hidroxibutanoico, glutamina, 1-desoxieritritol, ácido metilhexadecanoico, alfa tocoferol, mientras que para las muestras de orina los 20 metabolitos fueron xilitol, 5-metoxitriptamina, ácido cítrico, creatinina, ácido 2-hidroxi-2-metilbutanoico, ácido 2-hidroxivalérico, glutamina, ácido glicólico, dodecano, ácido azelaico, histidina, treitol 2, ácido glucurónic-UDP, N-metilalanina, glicina TMS1x, ácido 2,3-dihidroxibutanoico NIST, butano -2,3-diol NIST, ácido shikímico e inulotriosa 1 (Bajaj, 2019). A su vez Rubio *et al*., analizaron muestras de suero por CL/EM-EM de 11 pacientes con hepatopatía e identificaron que al comprarse pacientes con y sin EHM los pacientes con EHM tenían aumento en niveles de metionina, 3 esfingomielinas, 5 fosfatidilcolinas, octadecenoilcarnitina y disminución de 17 fosfatidilcolinas, 2 lisofosfatidilcolinas, espermina, ácido alfa-aminoadípico y valina (Rubio, 2021). Por otra parte, Weiss *et al*. por medio de CL acoplada a EM de alta resolución utilizando muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) reportaron en pacientes con EH un aumento de glutamina, ácido glutámico, ácido piroglutámico, fenilacetilglutamina, glutamilglutamina, carnitina, acilcarnitinas, ácido 2-hidroxivalérico, ácido 3-hidroxi-2-metilbutanoico, acetilcitidina, acetilleucina, acetilvalina, acetilalanina, acetilserina, ácido acetamidobutanoico, fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido indolacético, ácido 5-hidroxiindolacético, ácido hidroxifeniláctico, hidroxitriptófano, quinurenina, ácido aminomucónico, metionina, formilmetionina, sulfóxido de metionina, S-adenosilmetioninamina y gran aumento de ácidos biliares; igualmente identificaron una disminución de alanina, creatina y

taurina, sin identificarse cambios en los compuestos no acetilados de serina, leucina y GABA; sin detectarse citidina (Weiss, 2016).

Como se puede observar en los estudios metabolómicos previamente descritos por otros autores se han descrito diversos metabolitos de interés para identificar los grados de severidad de la EH, sin embargo, ninguno de ellos ha sido realizado en población mexicana. En el presente estudio se logró identificar diversos metabolitos. Respecto al lactato Jiménez *et al*. reportaron niveles elevados en EHM comparado contra pacientes con HSE, esto mismo fue observado en el presente estudio para este metabolito, además se identificó que hubo disminución conforme aumentaba la severidad de la encefalopatía (WH1 y WH2). Por otra parte, Dabos *et al*. describieron también un aumento de lactato en pacientes con o sin encefalopatía en comparación con controles sanos, esto mismo fue reportado en el presente estudio donde también los controles sanos presentaron niveles más bajos de este metabolito pero con respecto sólo al grupo con HSE. Este mismo autor reportó niveles altos de tirosina y fenilalanina en pacientes con hepatopatía en comparación con controles sanos, en el presente estudio se observó también que las señales respectivas de estos metabolitos se fueron incrementando conforme avanzaba el grado de severidad de la encefalopatía, sin embargo al cuantificar estos metabolitos y establecer el análisis quimiométrico ambos metabolitos no permitieron diferenciar a los controles sanos del resto de los grupos ni tampoco entre los grupos con y sin EH. Por otro lado, en el presente estudio un metabolito que es de llamar atención fue el formiato, el cual en los sujetos sanos así como en el grupo HSE la señal espectroscópica observada fue mucho menor que en los grupos con algún grado de

encefalopatía, por lo cual pudiera ser considerado un candidato ideal para discriminar entre sujetos sanos o HSE de pacientes con algún grado de EH ya establecida. Rubio *et al.* reportaron concentraciones bajas de valina en pacientes con EHM comparados contra pacientes con HSE, en el presente estudio se observo como la señal de este metabolito se fue disminuyendo conforme avanzaba el grado de severidad de encefalopatía, con una marcada disminución en pacientes con EH WH1 Y WH2, sin embargo los controles sanos presentaron niveles más bajos que los pacientes con HSE o EHM, esto contrasta con otros estudios que reportan niveles de valina disminuidos en pacientes con EHM y pacientes con algún grado de encefalopatía respecto a sujetos sanos (Dabos, 2015) (Jiménez, 2010).

Después de realizar la cuantificación relativa en base al índice metabolito/creatinina y aplicar el estudio quimiométrico PLS-DA preliminar en los grupos de estudio se pudo establecer 14 metabolitos candidatos a diferenciar entre los sujetos sanos vs pacientes con hepatopatía con y sin encefalopatía como la tau-metilhistidina que aumenta en los pacientes con WH1 y WH2 y se ve disminuida tanto en controles como en HSE y EHM. Otros metabolitos como la acetona, lisina, glicerol, y serina permiten diferenciar a los controles sanos de los grupos con y sin encefalopatía al estar más aumentados en el grupo control sano. Mientras que la treonina permitió diferenciar a los controles del grupo HSE al estar más disminuida.

En el presente estudio se observó también que metabolitos como la prolina, cisteína, treonina, alanina, 3-hidroxibutirato e isoleucina permitieron diferenciar al estar más aumentados a pacientes con EHM o HSE con respecto a los pacientes con WH1 y WH2 donde sus niveles fueron claramente menores. La isoleucina ya ha

sido reportada que permite diferenciar controles sanos de pacientes con encefalopatía al presentar valores disminuidos con respecto a estos últimos, sin embargo, no diferencia a sujetos sanos de los pacientes con HSE.

Por otro lado en el presente estudio, la glicina mostró un aumento en el grupo con EHM con respecto al control pero disminuyó en los grupos con WH1 y WH2, esto concuerda con los reportado por Dabos *et al*. quienes reportaron un aumento de glicina en pacientes con hepatopatía respecto a controles sanos y disminución también en los grupos con encefalopatía, sin embargo, nuestros hallazgos contrastan respecto a este metabolito con lo reportado por Jiménez *et al*. quienes describen niveles disminuidos de glicina en pacientes con EHM con respecto a pacientes HSE.

Finalmente, al evaluar los 14 metabolitos diferenciales a través de la plataforma de MetaboAnalyst se identificó que las vías metabólicas en las cuales estos están implicados principalmente en los sujetos evaluados en el presente estudio fueron la vía del metabolismo de la glicina, serina y treonina, así como la vía del metabolismo del glutatión.

CAPITULO VIII

CONCLUSIONES

Parámetros hematológicos permitieron diferenciar al grupo control de los demás grupos de estudio pero no permitieron diferenciar entre los grupos de HSE, EHM/WH1 y WH2.

Ciertos parámetros bioquímicos permitieron diferenciar al grupo control de los demás grupos de estudio sin embargo no permitieron diferenciar entre los grupos de HSE, EHM/WH1 y WH2.

El perfil metabolómico por ^{1}HRMN permitió identificar aproximadamente entre 41 a 43 metabolitos de interés como biomarcadores que diferencian entre los diversos sujetos evaluados en el presente estudio.

Al emplear la cuantificación relativa con el índice metabolito/creatinina aplicado a los espectros de los grupos de estudio se logró identificar 14 metabolitos de interés para diferenciar estos grupos los cuales fueron: τ-metilhistidina, acetona, prolina, 3-hidroxibutirato, lisina, cisteína, treonina, glicerol, glicina, lactato, alanina, serina, valina e isoleucina.

El estudio PLS-DA a través de su imagen tridimensional permitió diferenciar entre: control sano de los grupos con y sin encefalopatía; HSE de EHM y WH1-2 pero no permitió diferenciar entre WH1 y WH2.

Las vías metabólicas con significancia estadística e impacto asociadas a algunos de los 14 metabolitos diferenciales fueron la vía del metabolismo de la glicina, serina y treonina, así como la vía del metabolismo del glutatión.

CAPITULO IX

ANEXOS

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Departamento de Medicina Interna

Formato protocolo: "Caracterización del perfil metabolómico sérico de pacientes con diferentes grados de Encefalopatía Hepática"
Dra. en C. Paula Cordero, investigadora principal
Dr. Ricardo Andrés Gómez Quiroz, tesista

Nombre: _____
Edad: _____ Registro: _____ Teléfono: _____

Historia Clínica
Hepatopatía Crónica: si ____ no ____
Tiempo de evolución:
Diagnóstico etiológico: alcohol _____ viral _____ NASH _____ autoinmune _____ DILI _____ en abordaje _____ desconocida _____ otros_____ en caso de otros, ¿Cuál? _____

Ha tenido o consumido…
Consumo de alcohol: si ____ inactivo _____; cantidad de consumo (gr/sem): _____; si inactivo, cuando suspende: _____. Tabaquismo: _____ Marihuana: _____ Cocaína: _____ Anfetaminas: _____ Inhalantes: _____ Otras drogas: _____ Suplementos: _____

Parte 1. Formato clínico para captura de pacientes.

Antecedentes de:

STDA: ___; si: ____ no: ____ desconoce: ____ Colonoscopía previa: _____
Ascitis clínica: si: ____ no: ____ desconoce: ____
PBE: si: ____ primer episodio?: _____ no: ____ desconoce: ____
Encefalopatía hepática: si: ____ no: ____ desconoce: ____
Sd. Hepatorrenal: si: _____ no: _____ desconoce: _____
Sd. Hepatopulmonar: si: _____ no: _____ desconoce: _____

¿Utiliza algún medicamento?

_____

Lactulosa: _____ Rifaximina: _____ Propanolol: _____ Furosemida: _____
Espironolactona: _____ Ornitina: _____

Comorbilidades

DM2: _____ HAS: _____ IAM: _____ ICC: _____ ERC: _____ LRA: _____ EVC: _____
HIC: _____ CA hígado: _____ CA otras: _____ Depresión: _____ Autoinmune: _____

Motivo de consulta actual:

Hospital Universitario "Dr. José E. González" UANL
Departamento de Medicina Interna

Francisco I. Madero Pte. y Av. Gonzalitos s/n
Mitras Centro, C.P. 64460
Monterrey N.L.
(81)83-89-11-11

Parte 2. Formato clínico para captura de pacientes.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Departamento de Medicina Interna

Escala de West Haven:

Child-Pugh:

MELD:

GRADO	MANIFESTACIONES
MINIMA	Alteración en test psicométricos o neuropsicológicos
GRADO I	• Euforia • Atención disminuida • Alteración en el ritmo del sueño • Deterioro en la capacidad de sumar y restar
GRADO II	• **Asterixis o Flapping** • Letargia • Desorientación • Cambio en la personalidad • Dispraxia
GRADO III	• Somnolencia o semiestupor • Letargia • Desorientación grave • Comportamiento bizarro
GRADO IV	Coma

¿Presenta alguna de las siguientes características?

Sepsis: ____ STDA: ____ STDB: ____ PBE: _____ Ascitis: ____ Hiponatremia: ___ Hipercalcemia: ____ Otros trastornos electrolíticos: ___TCE leve: ____ TCE severo: ____ Hematoma intracraneal: ___ Meningitis definitiva: ____ Meningitis probable: ____ Uremia(según BUN): ____ EVC: ___

Laboratorios:

Hb ___ Leu __ Neu __ Otros, línea blanca _____ Plt ___ Glu ___ Cr ___ BUN ___ Na ___ Cl ___ K ___ Ca ___ Mg ___ P ___ AU ___

PH ___ CO2 ___ PO2 ___ Lactato ___ HCO3 ___

AST __ ALT ___ ALP ___ BT ___ BI ___ BD ___ TP ___ INR ___ TTP ___

Niveles de amonio _____ Albúmina___

Parte 3. Formato clínico para captura de pacientes.

CAPITULO X

BIBLIOGRAFÍA

1. American Association for the Study of Liver Diseases ⇑, European Association for the Study of the Liver. “Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease: 2014 Practice Guideline by the European Association for the Study of the Liver and the American Association for the Study of Liver Diseases.” Journal of Hepatology, vol. 61, no. 3, 2014, pp. 642–659., doi:10.1016/j.jhep.2014.05.042.
2. Bajaj JS, Fan S., Thacker L. *et al*. Serum and urinary metabolomics and outcomes in cirrhosis. PLoS One. 2019 Sep 27;14(9): e0223061. doi: 10.1371/journal.pone.0223061.
3. Barallobre-Barreiro, Javier, *et al*. “La Proteómica y La Metabolómica: Los Mecanismos De La Enfermedad Cardiovascular y El Descubrimiento De Biomarcadores.” Revista Española De Cardiología, vol. 66, no. 8, 2013, pp. 657–661., doi:10.1016/j.recesp.2013.04.010.
4. Cambiaghi, Alice, *et al*. “Analysis of Metabolomic Data: Tools, Current Strategies and Future Challenges for Omics Data Integration.” Briefings in Bioinformatics, 2016, doi:10.1093/bib/bbw031.
5. Córdoba, Juan. “New Assessment of Hepatic Encephalopathy.” Journal of Hepatology, vol. 54, no. 5, 2011, pp. 1030–1040.,

doi:10.1016/j.jhep.2010.11.015.

6. Coskun B., Ozen M., *et al*. Normalization of the psychometric hepatic encephalopathy score for diagnosis of minimal hepatic encephalopathy in Turkey. Niger J Clin Pract. 2017 Apr;20(4):421-426. doi: 10.4103/1119-3077.204375.
7. Dabos, Konstantinos John. “1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy-Based Metabonomic Study in Patients with Cirrhosis and Hepatic Encephalopathy.” World Journal of Hepatology, vol. 7, no. 12, 2015, p. 1701., doi:10.4254/wjh.v7.i12.1701.
8. Fages, A., Duarte-Salles, T., Stepien, M. *et al.* Metabolomic profiles of hepatocellular carcinoma in a European prospective cohort. *BMC Med* **13**, 242 (2015). https://doi.org/10.1186/s12916-015-0462-9.
9. Gowda, Ga Nagana, *et al*. “Metabolomics-Based Methods for Early Disease Diagnostics.” Expert Review of Molecular Diagnostics, vol. 8, no. 5, 2008, pp. 617–633., doi:10.1586/14737159.8.5.617.
10. Iebba V., Guerrieri F., Di Gregorio V. *et al*. Combining amplicon sequencing and metabolomics in cirrhotic patients highlights distinctive microbiota features involved in bacterial translocation, systemic inflammation and hepatic encephalopathy. Sci Rep. 2018 May 29;8(1):8210. doi: 10.1038/s41598-018-26509-y.
11. Jeong J.Y., Jun D.W., Bai D. *et al*. Validation of a Paper and Pencil Test Battery for the Diagnosis of Minimal Hepatic Encephalopathy in Korea. J Korean Med Sci. 2017 Sep;32(9):1484-1490. doi: 10.3346/jkms.2017.32.9.1484.

12. Jiménez Beatriz, *et al*. “Serum Metabolic Signature of Minimal Hepatic Encephalopathy by1H-Nuclear Magnetic Resonance.” Journal of Proteome Research, vol. 9, no. 10, 2010, pp. 5180–5187., doi:10.1021/pr100486e.
13. McPhail, M., Montagnese S., Villanova M. *et al*. Urinary metabolic profiling by 1H NMR spectroscopy in patients with cirrhosis may discriminate overt but not covert hepatic encephalopathy. Metab Brain Dis. 2017 Apr;32(2):331-341. doi: 10.1007/s11011-016-9904-0.
14. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, *et al*. (2011) The Human Serum Metabolome. PLoS ONE 6(2): e16957. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016957.
15. Rey I., Effendi-Ys R. Association Between Serum IL-6, IL-10, IL-12, and IL-23 Levels and Severity of Liver Cirrhosis. Med Arch. 2021 Jun;75(3):199-203. doi: 10.5455/medarh.2021.75.199-203.
16. Riekeberg, Eli, and Robert Powers. “New Frontiers in Metabolomics: from Measurement to Insight.” F1000Research, vol. 6, 2017, p. 1148., doi:10.12688/f1000research.11495.1.
17. Romero Gomez M, Cordoba J, Jover R, *et al*. Normality tables in the Spanish population for psychometric tests used in the diagnosis of minimal hepatic encephalopathy. Med Clin 2006; 127: 246–9.
18. Rubio, T., Felipo, V., Tarazona, S. *et al*. Multi-omic analysis unveils biological pathways in peripheral immune system associated to minimal hepatic encephalopathy appearance in cirrhotic patients. Sci Rep 11, 1907 (2021). https://doi.org/10.1038/s41598-020-80941-7.

19. Weiss N., Saint Hilaire PB, Colsch B. *et al*. Cerebrospinal fluid metabolomics highlights dysregulation of energy metabolism in overt hepatic encephalopathy. J Hepatol. 2016 Dec;65(6):1120-1130. doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.046.
20. Wijdicks, Eelco F.M. “Hepatic Encephalopathy.” New England Journal of Medicine, vol. 375, no. 17, 2016, pp. 1660–1670. doi:10.1056/nejmra1600561.
21. Zhang G., Li Y., Zhang X., Huang L. *et al*. Identifying Mild Hepatic Encephalopathy Based on Multi-Layer Modular Algorithm and Machine Learning. Front Neurosci. 2021 Jan 11;14:627062. doi: 10.3389/fnins.2020.627062. eCollection 2020.
22. Zul, E.A., García A.I., Lucio, J.R., Waksman, N., Saucedo, A.L.(2022). La RMN en el estudio del metaboloma humano: Definiciones y aspectos prácticos. En Salas Coronado, R. (Ed). *Una Aproximación a la Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.* (140-159) Universidad Tecnológica de la Mixteca. doi: 10.48043/UTM_UARMN01.

CAPITULO XI

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Ricardo Andrés Gómez Quiroz

Candidato para el grado de

Especialista en Medicina Interna

Tema: CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL METABOLÓMICO SÉRICO DE PACIENTES CON DIFERENTES GRADOS DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

BIOGRAFÍA:

Datos personales: Nacido en Chihuahua, Chihuahua el 4 de marzo de 1987: hijo de Andrés Gómez Yepez y María Cristina Quiroz González.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Médico Cirujano y Partero en el 2019.

Experiencia profesional: Residente de Medicina Interna del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León, desde el año 2019.