



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Cerca i identificació de nous biomarcadors de fibrosi hepàtica per mitjà de tècniques proteòmiques

Santiago Marfà Bruix

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**CERCA I IDENTIFICACIÓ DE NOUS BIOMARCADORS DE FIBROSI HEPÀTICA
PER MITJÀ DE TÈCNIQUES PROTEÒMIQUES**

Memòria presentada per

SANTIAGO MARFÀ BRUIX

Per optar al títol de Doctor
per la Universitat de Barcelona

Treball realitzat sota la supervisió del **Dr. Wladimiro Jiménez Povedano**

Servei de Bioquímica i Genètica Molecular

Departament de Biomedicina

Hospital Clínic/Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Tesi inscrita en el programa de Doctorat en Medicina

Departament de Biomedicina

Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Barcelona, Febrer de 2017

A tots els que m'han fet créixer en aquesta etapa

ABREVIACIONS

Per orde alfabètic:

Angiotensina II: Angiotensina II

ADN: àcid desoxiribonucleic

ARNm: àcid ribonucleic missatger

AH: àcid hialurònic

ALT: alanina aminotransferasa

APRI: índex de relació AST i recompte plaquetari (*AST to Platelet Ratio Index*)

ARFI: radiació acústica per impuls de força

AST: aspartat aminotransferasa

AUROC: àrea sota la corba ROC

CCl₃: triclorometil

CCl₄: tetraclorur de carboni

Cl₃COO: triclorometil-peroxil

CHC: carcinoma hepatocel·lular

CKIε: caseïna quinasa I èpsilon

CM10: bioxip que actua com a intercanviador catiònic feble

CV: coeficient de variació

EHNA: esteatosi hepàtica no alcohòlica

ELF: enhanced liver fibrosis

ELISA: assaig immunoenzimàtic (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

ESI: electroesprai

ET: elastografia de transició

ET-1: endotelina 1

FT-ICR: ressonància ciclòrica d'ions amb transformada de Fourier

GAP: proteïna activadora de GTPases

GGT: gamma glutamil transferasa

GPVH: gradient de pressió venós hepàtic

H50: bioxip amb superfície hidrofòbica

HA: hepatopatia alcohòlica

IL-1 β : interleucina-1 beta

IL-6: interleucina-6

IMAC30: bioxip amb superfície d'unió a metalls

INR: ràtio normalitzada internacional

IRM: imatge per ressonància magnètica

IT: trampa iònica

iTRAQ: marcatge isobàric per quantificació relativa i absoluta (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation*)

LC: cromatografia de líquids

LPS: lipopolisacàrid

LTQ-Orbitrap: Orbitrap de trampa d'ions lineal (*Linear Trap Quadrupole-Orbitrap*)

m/z: relació massa/càrrega

MALDI: desorció/ionització làser assistida per una matriu (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)

MAP: pressió arterial mitjana

MEC: matriu extracel·lular

MELD: model per la malaltia hepàtica en fase terminal (*Model For End-Stage Liver Disease*)

MMP: metal·loproteïna

MPT: modificació postraducciona

MS: espectrometria de masses

MS/MS: espectrometria de masses en tàndem

NP20: bioxip amb superfície hidrofílica

OMS: Organització Mundial de la Salut

PIIINP: propèptid aminoterminal del procol·lagen tipus III

PP: pressió portal

Q: quadrupol

Q10: bioxip que actua com a intercanviador aniònic fort

R: cadena lateral genèrica d'un aminoàcid

ROC: Característica Operativa del Receptor (*Receiver Operating Characteristic*)

SELDI: desorció/ionització làser amb superfície millorada (*Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization*)

SILAC: marcatge d'isòtops estables amb aminoàcids en cultiu cel·lular (*Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*)

TGF- β : factor de creixement transformant beta (*Transforming Growth Factor beta*)

TNF- α : factor de necrosi tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

TIC: corrent iònica total (*Total Ion Current*)

TIMP: inhibidor tissular de les metal·loproteïnases

TOF: temps de vol (*Time Of Flight*)

VHB: virus de l'hepatitis B

VHC: virus de l'hepatitis C

VIH: virus de la immunodeficiència humana

ÍNDEX

ÍNDEX DE FIGURES I TAULES xiii**INTRODUCCIÓ 1**

1. FETGE	3
1.1. Definició i aspectes generals.....	3
1.2. Estructura	4
1.3. Funcions	5
2. FIBROSI I CIRROSI HEPÀTICA	6
2.1. Definició i aspectes generals.....	6
2.2. Reversibilitat	9
2.3. Complicacions	9
2.4. Prevenció	11
2.5. Tractament.....	11
2.6. Cas particular: pacients amb VHC i sotmesos a un trasplantament hepàtic.....	12
3. ESTRATÈGIES D'AVAUACIÓ DE LA FIBROSI HEPÀTICA.....	13
3.1. Aspectes generals	13
3.2. Mètodes invasius	13
a) Biòpsia hepàtica	13
b) Gradient de pressió venós hepàtic	15
3.3. Mètodes no invasius	16
a) Biomarcador.....	16
b) Proves d'imatge	18
i. Elastografia de transició	18
ii. ARFI	19
iii. Imatge per ressonància magnètica.....	20
c) Marcadors serològics	20
i. Marcadors indirectes	20
ii. Marcadors directes	23
iii. Combinació de marcadors directes i indirectes.....	24
d) Combinació de proves d'imatge i marcadors serològics	25
e) Limitacions globals de les diferents estratègies no invasives.....	25
3.4. Models experimentals i estratègies per a la determinació de nous biomarcadors de fibrosi hepàtica	26
4. PROTEÏNES.....	27
4.1. Aspectes generals	27
4.2. Aminoàcid	27
4.3. Enllaç peptídic i terminologia	28
4.4. Nivells d'organització.....	29
5. PROTEÒMICA.....	31
5.1. Aspectes generals	31
5.2. Definició	31
5.3. Espectrometria de masses	33
a) Aspectes generals	33

b)	Unitats funcionals	35
i.	Font d'ionització	35
ii.	Analitzador de masses	37
–	Analitzador TOF	38
–	Analitzador Orbitrap	39
iii.	Detector	41
c)	Pretractament de la mostra	41
5.4.	Aproximacions proteòmiques.....	42
a)	Bottom-up.....	43
i.	LTQ-Orbitrap	44
b)	Top-down	45
i.	SELDI-TOF MS.....	46
OBJECTIUS		51
RESULTATS.....		55
1r article: <i>SIPA1L1 és un biomarcador precoç de fibrosi hepàtica en rates tractades amb CCl₄</i>		57
2n article: <i>La falta del fragment C-terminal de la cadena α del fibrinogen, de 5,9 kDa, precedeix la progressió de fibrosi en pacients amb malaltia hepàtica</i>		71
DISCUSSIÓ		95
CONCLUSIONS.....		107
ANNEX: altres publicacions.....		111
REFERÈNCIES.....		115

ÍNDEX DE FIGURES I TAULES

Figura 1. Visió anterior i posterior del fetge	3
Figura 2. Visió esquemàtica de l'estructura hepàtica: detall d'un lobulet hepàtic i del sinusoide	4
Figura 3. Evolució natural de la malaltia hepàtica crònica	8
Figura 4. Estratègies diagnòstiques per a la detecció de fibrosi hepàtica.....	13
Figura 5. Representació esquemàtica de la histologia hepàtica amb diversos canvis patològics	14
Figura 6. Elastografia de transició obtinguda d'un pacient amb VHC.....	18
Figura 7. ARFI obtinguda d'un pacient amb VHC.....	19
Figura 8. MRE obtinguda del fetge d'un pacient cirròtic amb VHC	20
Figura 9. Representació de la càrrega neta d'una proteïna en funció de la variació del pH.....	27
Figura 10. Classificació dels 21 aminoàcids presents en les proteïnes dels organismes eucariotes en base a la seva cadena lateral.....	28
Figura 11. Mecanisme simplificat de l'enllaç peptídic	29
Figura 12. Representació esquemàtica dels diferents nivells d'organització proteics	29
Figura 13. Representació esquemàtica de les diferents propietats que presenten les proteïnes (biològiques, químiques i físiques).....	31
Figura 14. Cicle de vida d'una papallona i l'evolució del proteoma i genoma.....	31
Figura 15. Diferències entre la bioquímica tradicional i la proteòmica	32
Figura 16. Representació simplificada d'un espectre proteòmic obtingut per espectrometria de masses, i dels diferents paràmetres que defineixen els pics.....	34
Figura 17. Fluxos de treball de diverses de les estratègies quantitatives amb marcatge o sense i basades en l'espectrometria de masses	35
Figura 18. Diferències entre els sistemes d'ionització ESI i MALDI/SELDI.....	36
Figura 19. Diagrama de l'espectrometria de masses en tàndem.....	37
Figura 20. Representació de l'analitzador TOF en mode lineal i en mode reflectró	39

Figura 21. Fotografia transversal de l'analitzador orbitrap	40
Figura 22. Representació gràfica de la distribució relativa de proteïnes plasmàtiques	41
Figura 23. Estratègies més comunes de pretractament de la mostra	42
Figura 24. Flux de treball genèric de l'estratègia <i>bottom-up</i> i <i>top-down</i> per a l'estudi proteòmic	43
Figura 25. Representació esquemàtica del LTQ-Orbitrap	44
Figura 26. Imatge d'un <i>array</i> i esquema del procés de preparació de la mostra i del seu anàlisi per mitjà del sistema SELDI-TOF-MS.....	47
Taula 1. Estadificació dels sistemes de classificació en la fibrosi hepàtica	15
Taula 2. Índexs formats per la combinació de marcadors indirectes	21
Taula 3. Índexs formats per la combinació de marcadors directes i indirectes.....	25

INTRODUCCIÓ

1. FETGE.

1.1. Definició i aspectes generals

El fetge és l'òrgan intern més gran del cos humà. Situat a la part superior dreta de la cavitat abdominal, just sota el diafragma i protegit per la caixa toràcica, constitueix al voltant del 2% del pes d'un adult humà (Gandhi, 2014). Una de les característiques particulars del fetge és la seva elevada irrigació. A diferència de qualsevol altre òrgan, aquest presenta dues fonts d'irrigació. Per una banda, obté sang oxigenada a través de l'artèria hepàtica (ramificació de l'aorta), la qual contribueix en un 20-25% del flux i proporciona al voltant del 50% de l'oxigen. Per altra banda, la vena porta –la qual prové de les venes dels òrgans de la cavitat abdominal com el pàncrees, intestins, estómac i melsa– contribueix en un 75-80% del flux total i aporta l'oxigen necessari restant, diferents nutrients resultants de l'absorció intestinal i diverses hormones que tenen efecte sobre el metabolisme hepàtic (McCuskey, 2012). La sang que abandona l'òrgan és canalitzada per la vena hepàtica que s'aboca a la vena cava inferior, la qual arriba finalment al costat dret del cor per ser bombejada cap als pulmons.

Un dels trets característics i únics d'aquest òrgan és la seva elevada capacitat de regeneració i restauració de la seva massa original en resposta a diversos insults. En comparació amb altres teixits capaços de regenerar-se, com la medul·la òssia o la pell, la regeneració hepàtica no depèn d'un grup de cèl·lules mare sinó que es produeix per la proliferació de totes les cèl·lules madures romanents (Michalopoulos, 2007; Sempel i Woodward, 2009). Aquest poder li permet metabolitzar tot tipus d'agents tòxics sense veure's afectat de forma permanent i així poder eliminar-los de l'organisme. Diversos models animals s'han usat per tal d'aclarir els mecanismes del procés regeneratiu (Choi et al., 2014; Pauta et al., 2013, 2016). Malgrat tot, encara es desconeix el mecanisme exacte pel qual les cèl·lules hepàtiques repoblen el teixit després del dany (Huch, 2015).

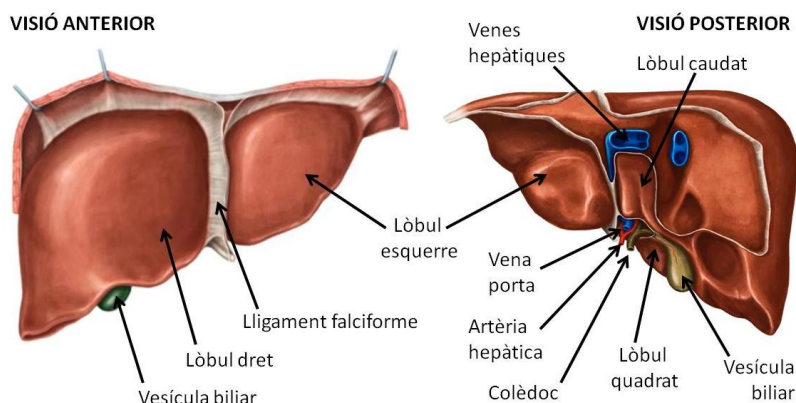


Figura 1. Visió anterior i posterior del fetge. Imatge obtinguda de la modificació i adaptació dels vídeos d'anatomia humana de Kenhub, 2016.

(<https://www.kenhub.com/en/videos/the-anterior-view-of-the-liver>;
<https://www.kenhub.com/en/videos/the-posterior-view-of-the-liver>).

1.2. Estructura

A nivell macroscòpic, el fetge està format per dos lòbuls hepàtics principals, l'esquerre i el dret, dividits per un lligament denominat falciforme. Alhora, el lòbul dret es subdivideix posterior i inferiorment en dos de més petits, anomenats lòbuls quadrat i caudat, respectivament (figura 1) (McCuskey, 2012).

A nivell microscòpic, aquest òrgan està constituït bàsicament per sis tipus cel·lulars, essent els hepatòcits, les cèl·lules hepàtiques estrellades, les cèl·lules de Kupffer i les cèl·lules sinusoidals els tipus cel·lulars més rellevants. En concret, els hepatòcits representen al voltant del 60% de la població cel·lular total i ocupen el 80% del volum del fetge (McCuskey, 2012; Miyai, 1991). Pel que fa a la seva arquitectura, el fetge està compost per milers de petites unitats hexagonals funcionals, conegudes com a lobulets hepàtics, les quals estan formades per làmines fenestrades d'hepatòcits que es disposen en forma radiada al voltant d'una vena central anomenada vena centrelobelar (figura 2). Cada lobulet hepàtic està separat dels altres mitjançant teixits connectius (septes interlobulars) i, en els seus vèrtexs, es troben les tríades portals, formades per ramificacions de la vena porta, l'artèria hepàtica i el conducte biliar (Gandhi, 2014). Fisiològicament, la sang circula des de la tríada portal i drena a la vena centrelobelar a través d'uns capil·lars fenestrats anomenats sinusoides. Aquests estan constituïts per les cèl·lules endotelials sinusoidals hepàtiques que conformen un endoteli discontinu i permeable (figura 2). Gràcies a aquesta paret sinusoidal fenestrada, la sang pot estar en contacte directe amb les membranes dels hepatòcits. L'estret espai existent (10-15 μm) entre

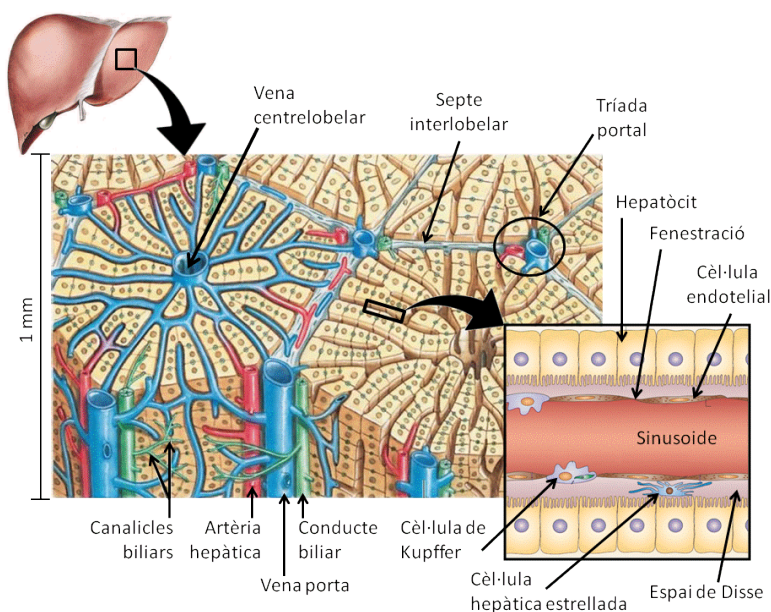


Figura 2. Visió esquemàtica de l'estructura hepàtica: detall d'un lobulett hepàtic i del sinusoid. Figura obtinguda de la combinació de diferents imatges adaptades procedents de Prudència et al., 2006 i de Pearson Education Inc., 2015 (pòster).

la paret sinusoidal i la membrana hepatocitària s'anomena espai de Disse i, a més a més de permetre l'intercanvi metabòlic entre el plasma sanguini i els hepatòcits, és on es troba un altre tipus cel·lular de gran importància: les cèl·lules hepàtiques estrellades o també anomenades cèl·lules d'Ito (Jansen et al., 2012; Roskams et al., 2007).

1.3. Funcions

Al fetge se li han atribuït més de 500 funcions metabòliques (Hasse, 2008), essent la síntesi, detoxificació i emmagatzematge les tres més rellevants. De fet, aquesta elevada activitat metabòlica permet el manteniment de l'homeòstasi i representa el 20-30% del consum d'oxigen total de l'organisme. En concret, el tipus cel·lular que exerceix la majoria d'aquestes funcions característiques de l'òrgan és l'hepatòcit. Si bé la descripció de les funcions detallades (de totes elles) es troba fora de l'objectiu d'aquesta tesi, és rellevant mencionar alguna de les més importants:

a) Metabolisme de les proteïnes:

El fetge és el principal lloc per a la síntesi d'una gran quantitat de proteïnes tant per a ús hepàtic com per a ús extrahepàtic. De fet, amb l'excepció de les immunoglobulines, les quals són sintetitzades per les cèl·lules plasmàtiques, les proteïnes secretades pels hepatòcits inclouen totes les proteïnes majoritàries del plasma com seria l'albumina, la transferrina o les lipoproteïnes. Alhora, també sintetitza les proteïnes de fase aguda, les quals juguen un paper cabdal en la defensa de l'organisme davant d'infeccions o d'insults severos (Hall i Guyton, 2011; McCuskey, 2012). Entre elles cal destacar el fibrinogen, la proteïna C reactiva i l'haptoglobina. També es produeixen alguns dels factors de coagulació com el factor II (protrombina), el factor VII, el factor IX i el factor X, així com la proteïna C i la proteïna S, les quals actuen per inactivar les formes actives del factor VIII i els complexos del factor V.

Un cop les cèl·lules arriben al seu màxim d'emmagatzematge de proteïnes, la resta d'aminoàcids són degradats a través del procés de desaminació, usant-se per obtenir energia o bé emmagatzemant-se en forma de greixos o, en determinats casos, com a glucogen (Hall i Guyton, 2011).

b) Homeòstasi de la glucosa:

La glucosa és la principal font d'energia pel cervell, múscle i ronyons, i és precisament el fetge l'òrgan que pot emmagatzemar i modular la disponibilitat dels nutrients ingerits d'acord amb els requisits dels òrgans perifèrics. Així doncs, la regulació de la concentració de glucosa en sang és un dels processos més cuidadosament monitoritzats i regulats pel cos. En resposta a les hormones provinents dels illots pancreàtics, els hepatòcits poden sintetitzar glucogen a partir de glucosa o metabolitzar-lo per tal de produir glucosa (glucogenòlisi) (Soriano, 2004). Alhora, aquest tipus cel·lular pot també sintetitzar glucosa a partir d'hidrats de carboni com la fructosa, o per mitjà d'aminoàcids (gluconeogènesi) (Hall i Guyton, 2011).

c) Metabolisme dels lípids:

El fetge també es troba involucrat en la síntesi *de novo* d'àcids grassos i triglicèrids, així com del colesterol, entre d'altres (Nguyen et al., 2008). Alhora, en resposta a nivells baixos de glucosa, també és capaç de sintetitzar cossos cetònics (cetogènesi) per a produir energia gràcies al catabolisme dels àcids grassos (Fukao et al., 2014). Finalment, i com molts altres tipus cel·lulars, les cèl·lules hepàtiques també poden oxidar àcids grassos com a font d'energia a través de la β -oxidació (Nguyen et al., 2008).

d) Metabolisme dels xenobiòtics:

El fetge s'encarrega, també, de metabolitzar tot tipus de compostos potencialment nocius per l'organisme. Aquest procés de detoxificació sovint es divideix en tres fases clarament diferenciades: la modificació de l'agent tòxic (introduint grups polars a la molècula), la seva conjugació a compostos polars i finalment, l'excreció (Grant, 1991; Salguero, 2007).

e) Síntesi de bilis:

La bilis és una substància contínuament sintetitzada pels hepatòcits a partir del colesterol que s'emmagatzema a la vesícula biliar durant els períodes interdigestius. Aquesta és alliberada al duodè després de la ingesta d'aliments i permet emulsionar els àcids grassos a l'intestí prim per tal de facilitar-ne l'absorció (Mukherjee i Gollan, 2011; Roskams et al., 2007).

f) Altres funcions a destacar:

- Emmagatzematge de vitamines i minerals.
- Manteniment de l'equilibri dels electròlits i de l'aigua.
- Ajuda a la regulació de la temperatura corporal.

2. FIBROSI I CIRROSI HEPÀTICA.

2.1. Definició i aspectes generals

La fibrosi hepàtica és un procés de cicatrització causat per un dany crònic o bé agut, en el qual es troben implicats múltiples mecanismes moleculars i cel·lulars que donen lloc a una activació de la remodelació i resolució tissular (Friedman, 2008a; Lee i Friedman, 2011). De fet, una de les principals característiques d'aquesta transformació és la producció i acumulació excessiva de proteïnes de matriu extracel·lular (MEC), formades majoritàriament per col·lagen tipus I i III, així com elastina i laminina entre d'altres, les quals comporten un increment progressiu de la rigidesa tissular (Bataller i Brenner, 2005; Kisseleva i Brenner, 2006). Aquesta acumulació es deu, no només a l'increment de la síntesi d'aquest tipus de proteïnes, sinó també a una reducció de la seva degradació. Quan el dany és agut, el procés tendeix a ser

reversible i passatger i les cèl·lules parenquimals (hepatòcits) es regeneren i reemplacen les cèl·lules necròtiques/apoptòtiques. Aquest procés s'associa amb una resposta inflamatòria i una deposició limitada de MEC. En canvi, quan la lesió hepàtica persisteix (insult crònic), la regeneració hepàtica falla i els hepatòcits són substituïts per teixit connectiu. S'ha estudiat que en estadis més avançats, el fetge conté al voltant de sis vegades més quantitat de proteïnes MEC que en un fetge sa, fet que modifica clarament l'arquitectura de l'òrgan i la seva funcionalitat (Bataller i Brenner, 2009). A més a més, la seva composició es veu alterada, passant d'una constituïda fonamentalment per col·lagen tipus IV, laminina i proteoglicans d'heparan sulfat, a una enriquida per col·lagen tipus I i III (Ellis i Mann, 2012; Friedman, 2008a). Aquest fet es produeix, en part, pel desequilibri produït entre les metal·loproteïnases (MMPs; reguladors de la degradació del col·lagen) i els seus inhibidors (TIMPs).

Les cèl·lules hepàtiques estrellades juguen també un paper principal en aquest procés. Davant d'un dany crònic, aquestes cèl·lules pateixen un procés d'activació que es caracteritza per una transdiferenciació a una cèl·lula proliferativa de característiques fenotípiques similars a un miofibroblast (Friedman, 2008b). Aquest canvi els hi confereix una gran activitat quimiotàctica i una elevada capacitat de resposta davant estímuls proinflamatoris. Totes aquestes propietats comporten finalment la secreció d'un ampli ventall de substàncies i components de matriu extracel·lular profibrogènics que contribueixen a agreujar el procés fibròtic (Friedman, 2008b, 2010; Parola i Pinzani, 2009).

Existeixen diferents causes que originen la fibrosi hepàtica, essent les infeccions cròniques del virus de l'hepatitis B (VHB) i C (VHC) una de les principals etiologies, juntament amb l'hepatopatia alcohòlica (HA), la colèstasi i cada vegada més l'esteatosi hepàtica no alcohòlica (EHNA) (Friedman, 2010; Lim i Kim, 2008; Schuppan i Kim, 2013). De fet, la distribució del material fibrós varia en funció de l'origen de la lesió hepàtica. En les hepatitis víriques cròniques per exemple, el teixit fibròtic es localitza inicialment al voltant dels espais porta, mentre que en l'hepatopatia alcohòlica es localitza en les zones pericentrals i perisinusoïdals (Pinzani, 1999). Malgrat aquests diferents orígens, totes elles presenten característiques patològiques i mecanismes fisiopatològics comuns (Vargas-Blasco, 2004). Si la causa subjacent no és tractada i eliminada, aquest procés pot comportar una acumulació de fibra que distorsiona l'arquitectura hepàtica formant marques fibròtiques i posteriorment nòduls de regeneració que, si continua persistint, pot acabar desembocant en cirrosi, insuficiència renal i carcinoma hepatocel·lular (figura 3) (Lee i Friedman, 2011; Schuppan i Afdhal, 2008).

La cirrosi hepàtica és doncs l'etapa final del procés fibròtic, la qual condueix a necroinflamació i fibrogènesi. Histològicament, les lesions fibròtiques al llarg del procés fibrogènic evolucionen des d'un dipòsit feble a la formació de nòduls de regeneració difusos

envoltats per densos septes fibrosos els quals comporten la reducció del parènquima hepàtic i, conseqüentment, la pèrdua de funcionalitat. Actualment, la cirrosi hepàtica és la catorzena causa més comú de mort a nivell mundial, provocant més d'un milió de morts anuals (Lozano et al., 2012). En particular, en els països desenvolupats, és un motiu cada vegada més gran de morbiditat i mortalitat, situant-se com la quarta causa més comuna de mort en adults a l'Europa central. A Espanya, i d'acord amb els patrons de mortalitat de 2012 (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2015), la malaltia hepàtica crònica i la cirrosi van provocar la mort de més de 4.500 persones a tot el territori (1,1% de les morts registrades en aquest any). Paral·lelament, la cirrosi hepàtica se situa com la principal indicació de trasplantament hepàtic en els països europeus, essent el VHC, la HA i l'EHNA les causes més comunes (Blachier et al., 2013).

La detecció precoç de la fibrosi hepàtica és, en molts casos, relativament complexa ja que la detecció i símptomes de descompensació hepàtica clínica acostumen a ocórrer anys després de l'aparició de la lesió (Hernandez-Gea i Friedman, 2011). De fet, amb l'excepció de la insuficiència hepàtica fulminant, el VHC després d'un trasplantament hepàtic i la coinfecció del virus de la immunodeficiència humana (VIH) i el VHC, la malaltia hepàtica evoluciona durant llargs períodes de temps sense ser detectada (Bataller i Brenner, 2005, 2009; Berenguer et al., 2003; Macías et al., 2009). Es creu que al voltant del 40% dels pacients amb malaltia hepàtica es mantenen asimptomàtics durant 10-15 anys abans que apareguin complicacions (Rockey i Friedman, 2012). Per aquest motiu, la prevalença de fibrosi i cirrosi hepàtica és difícil d'avaluar. Malgrat això, un estudi prospectiu francès realitzat a 7.463 individus francesos majors de 40 anys va estimar la prevalença de fibrosi avançada i cirrosi en un 2,8% i un 0,3%, respectivament (Poynard et al., 2010).

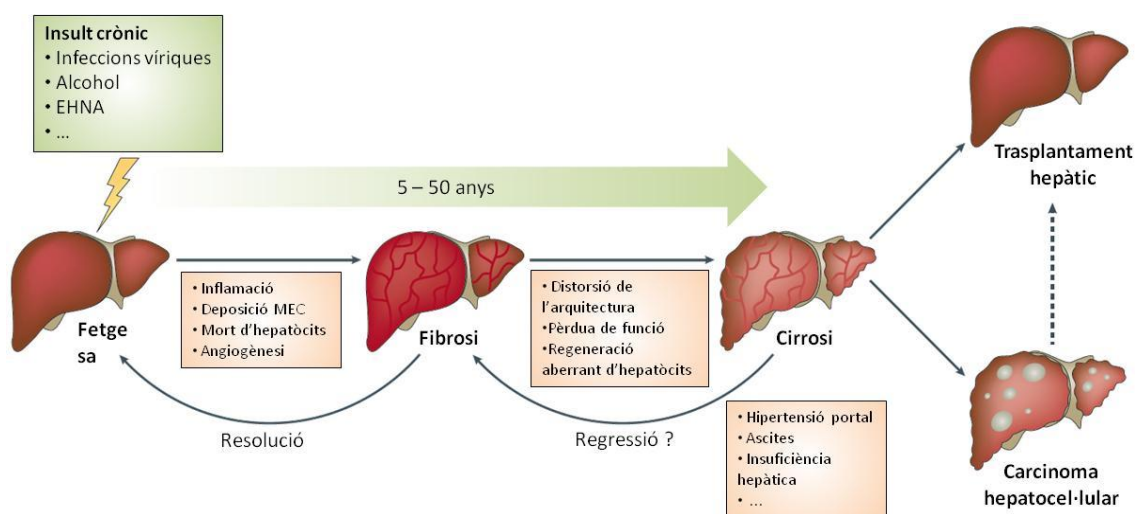


Figura 3. Evolució natural de la malaltia hepàtica crònica. Imatge adaptada de Pellicoro et al., 2014.

2.2. Reversibilitat

Tradicionalment es creia que el procés fibròtic era irreversible. Actualment però, clares evidències indiquen el seu caràcter dinàmic, bidireccional i potencialment reversible inclús en estadis fibròtics avançats (figura 3). De fet, el concepte de regressió o reversibilitat de la fibrosi hepàtica va aparèixer per primera vegada a finals de la dècada dels 70 (Pérez-Tamayo, 1979), on es va evidenciar la potencial reversió de fibrosi i cirrosi en models animals. Posteriorment, evidències clíniques han corroborat aquests resultats en diferents estadis de la malaltia i en una gran varietat d'etiologies, incloent hepatitis víriques (Dienstag et al., 2003; Hui et al., 2007; Kweon et al., 2001; Marcellin et al., 2013; Serpaggi et al., 2006), hepatitis autoimmune (Dufour et al., 1997), EHNA i HA (Kral et al., 2004; Wakim-Fleming i Mullen, 2005). Tanmateix, diversos articles posen en dubte si, davant d'una cirrosi establerta, pot haver realment un retrocés a un estat "pre-cirròtic" ja que no hi ha proves convinents que les anomalies vasculars intrahepàtiques reverteixin en el fetge cirròtic humà (Desmet i Roskams, 2003, 2004). Encara que és probable que el col·lagen sintetitzat sigui més susceptible a la degradació que el col·lagen més antic, només hi ha evidències en models animals que apunten a una potencial reversibilitat del procés en cirrosi avançada (Muñoz-Luque et al., 2008). Fins al moment per tant, l'única conclusió àmpliament acceptada i corroborada en humans és la reversió en estadis de fibrosi hepàtica inicials o moderats on hi ha una manca d'ECM entrellaçada i d'una angiogènesi marcada.

2.3. Complicacions

Com ja s'ha mencionat amb anterioritat, en la majoria dels casos, fins i tot en estadis més avançats, la fibrosi hepàtica tendeix a ser asimptomàtica. En aquest punt, els pacients es troben en una fase coneguda com a fibrosi compensada. Generalment, la simptomatologia clínica no apareix fins que el pacient passa a una fase de cirrosi descompensada, on el pronòstic ja és molt més reservat (Bataller i Brenner, 2005) i l'única teràpia efectiva és el trasplantament hepàtic. Abans d'arribar a aquesta situació, les complicacions més freqüents que succeeixen en la cirrosi hepàtica són la hipertensió portal, la formació d'ascites, la insuficiència renal, l'hemorràgia per varis esofàgiques, la sèpsia, l'encefalopatia hepàtica i fins i tot el carcinoma hepatocel·lular (CHC) (figura 3).

a) Hipertensió portal:

La hipertensió portal és la causa subjacent de la majoria de complicacions associades amb la cirrosi hepàtica i, subseqüentment, de la mortalitat associada. En concret, la hipertensió portal es defineix com un augment del gradient de pressió venós hepàtic (GPVH) per sobre dels

5 mm Hg. En aquest context, la formació –i potencial hemorràgia– de varius esofàgiques és una de les principals conseqüències clíniques d'aquest fenomen (Garcia-Tsao i Bosch, 2010). Paral·lelament, aquesta elevació de la pressió en el sistema venós portal també induïx la formació d'una extensa xarxa de venes, anomenades venes col·laterals portosistèmiques, les quals desvien el flux sanguini a la circulació sistèmica per tal d'esquivar el fetge (Johns i Evans, 1962).

b) Ascites:

L'ascites és una acumulació de líquid que es localitza a la cavitat peritoneal del pacient amb cirrosi hepàtica. Està composta principalment per aigua, sal, albúmina, globulines i una concentració baixa de cèl·lules mesotelials i leucòcits, la qual presenta propietats vasodilatadores, proinflamatòries i proangiogèniques (Morales-Ruiz et al., 2005). Al voltant del 50% dels pacients amb cirrosi compensada desenvolupen ascites en un període d'uns deu anys des de l'inici d'aquesta. De fet, l'aparició d'ascites és també una conseqüència indirecta de la hipertensió portal (Ginès et al., 2004) i, a més a més, és un clar indicador de mal pronòstic, car la taxa de mortalitat a un any és del 20% (D'Amico et al., 2006). De fet, l'aparició d'ascites també incrementa el risc de desenvolupar una sèpsia i fins i tot insuficiència renal, reduint doncs la qualitat i l'esperança de vida del pacient.

c) Carcinoma hepatocel·lular:

Al llarg del procés cirròtic es produeix una reducció en la proliferació d'hepatòcits així com un increment del teixit fibrós. Aquesta situació, la qual indica un esgotament de la capacitat de regeneració del fetge, pot conduir finalment al desenvolupament de nòduls cancerosos (Bataller i Brenner, 2005). De fet, la gran majoria de pacients amb CHC presenten un fetge cirròtic. Cada any, al voltant de 500.000 persones arreu del món són diagnosticades de CHC. Estudis recents apunten a que la taxa de mortalitat de cirrosi hepàtica associada a CHC està augmentant en alguns països desenvolupats (Fattovich et al., 2004). El CHC és actualment la principal causa de mort relacionada amb el fetge en pacients amb cirrosi compensada, essent la infecció pel VHC el factor que s'associa a una major incidència de CHC en aquests pacients (El-Serag, 2011; Fattovich et al., 2004). D'acord amb un estudi retrospectiu que va analitzar a quasi 400 pacients amb CHC, la taxa de mortalitat a 1 any es situa al 49%, reduint-se al 19% al cap de 3 anys (Greten et al., 2005). Si bé la resecció quirúrgica del tumor hepàtic acostuma a ser el tractament escollit en els pacients no cirròtics, no sempre es pot realitzar aquest procediment en pacients amb cirrosi. És per això que el trasplantament hepàtic acostuma a ésser la millor opció, presentant el menor risc de recurrència tumoral (El-Serag, 2011; Fuster et al., 2005).

2.4. Prevenció

La prevenció de la fibrosi i cirrosi hepàtica està fortament associada amb canvis en l'estil de vida. En particular, la resistència a la insulina, l'obesitat i la síndrome metabòlica són tres dels factors més importants a evitar per tal de reduir les possibilitats d'aparició o d'empitjorament de la fibrosi hepàtica. Alhora, el consum d'alcohol és un altre factor altament conegut que incrementa la probabilitat de desenvolupar fibrosi i cirrosi hepàtica. Fins i tot en aquells pacients fibròtics amb independència de l'etiologia causant de la malaltia, la ingesta d'alcohol pot comportar un increment del GPVH així com una major possibilitat d'hemorràgia de varius esofàgiques i fins i tot l'aparició de CHC (Forner et al., 2012; Luca et al., 1997; Westin et al., 2002). El fet de fumar tabac o cànnabis també s'ha vist que són factors que acceleren l'evolució de la fibrosi hepàtica en pacients amb diverses etiologies (Hézode et al., 2005; Zein, 2010). Finalment però, les begudes i aliments rics en antioxidants sembla que poden tenir un potencial rol protector i preventiu en el procés fibròtic. La vacunació contra determinats virus com l'hepatitis A i B són també accions rellevants per prevenir complicacions hepàtiques futures (Tsochatzis et al., 2012).

2.5. Tractament

Un cop diagnosticada la fibrosi hepàtica, el tractament està focalitzat en l'eradicació de l'agent causant de l'insult i pal·liar les complicacions associades. Pel que fa a les infeccions víriques cròniques, el tractament s'ha basat en una combinació d'un estimulador limfocitari com l'interferó gamma pegilat i un agent antiviral com la ribavirina. Malgrat això, aquesta fórmula presenta una baixa eficàcia i nombrosos efectes secundaris, els quals contribueixen al rebuig o aturada del tractament a causa del deteriorament excessiu del benestar dels pacients (Feld et al., 2015). Afortunadament, s'han produït grans avenços en aquest camp i recentment s'han aprovat nous antivirals d'acció directa lliures d'interferó on els efectes secundaris són mínims i les taxes de curació ronden el 100% en pacients amb cirrosi compensada i al voltant del 90% en pacients amb cirrosi descompensada (Charlton et al., 2015; Curry et al., 2015; Feld et al., 2015; Lawitz et al., 2015). Malgrat tot, un estudi recent sembla apuntar que en pacients amb VHC els quals prèviament havien estat tractats –i curats– per CHC, s'incrementaria la recurrència tumoral coincidint amb l'eradicació del virus (Reig et al., 2016).

L'ús de la derivació portosistèmica intrahepàtica transjugular és una tècnica emprada per tal de reduir els efectes deleteris associats a la hipertensió portal i a la síndrome hepatorenal. Malgrat això, presenta certs riscos associats al procediment que cal tenir en consideració (Chalasani et al., 2000). En pacients cirròtics i amb ascites, la paracentesi i la profilaxi

antibiòtica són també altres estratègies per tal de drenar el líquid de la cavitat abdominal i per prevenir peritonitis bacteriana espontània, respectivament. Alhora, també es recomana reduir la ingesta de sodi a la dieta així com el tractament amb diürètics en determinats estadis de la malaltia (Moore i Aithal, 2006). Si bé actualment la formació d'ascites és menys habitual gràcies a les millores de detecció precoç del procés fibròtic, l'única opció factible de millora pels pacients amb una cirrosi avançada és el trasplantament hepàtic. De fet, la cirrosi hepàtica és la indicació més comuna de trasplantament de fetge a Europa, amb més de 5.500 trasplantaments anuals (Blachier et al., 2013). Actualment, la taxa de supervivència a 1 any i a 5 anys després de la cirurgia se situa al voltant del 85% i del 75%, respectivament (Roberts et al., 2004).

2.6. Cas particular: pacients amb VHC i sotmesos a un trasplantament hepàtic

Una de les característiques comunes que presenten tots els pacients amb càrrega viral sostinguda és la reinfecció de l'empelt després del trasplantament hepàtic (Berenguer, 2002). Evidències histològiques demostren que ja a la segona setmana després del trasplantament apareix una recurrència del VHC en l'empelt i, a l'any de la cirurgia, al voltant del 50% dels pacients ja presenten notables evidències histològiques de recurrència del virus (Charlton et al., 2015; Féray et al., 1992). De fet, el curs clínic de la infecció pel VHC després del trasplantament hepàtic es caracteritza sovint per un procés fibròtic accelerat i progressiu que dona lloc a cirrosi al voltant del 30% dels pacients als 5 anys després de la cirurgia (Charlton et al., 2015). A més a més, diversos estudis que han realitzat un seguiment del procés fibrogènic mitjançant biòpsies hepàtiques, han confirmat que els pacients amb infecció pel VHC i sotmesos a un trasplantament hepàtic presenten una major progressió de fibrosi per any que els pacients immunocompetents que encara no havien estat sotmesos a aquest procediment (Yilmaz et al., 2007). Per tant, la ràpida progressió de la fibrosi és una característica inherent en els pacients amb VHC i trasplantats, tot i que els percentatges de desenvolupament de fibrosi i cirrosi difereixen considerablement en funció de l'estudi (entre el 11 i el 47% als 3 anys post cirurgia) (Berenguer i Schuppan, 2013). A més a més, diverses investigacions han demostrat que la presència d'hipertensió portal, un estadi de fibrosi $F \geq 2$ (sistema de classificació Ishak; veure apartat 3.2.a) o una gravetat de l'activitat necroinflamatòria a l'any després del trasplantament semblen ser indicadors per a la identificació de pacients amb una progressió més accelerada de fibrosi i que estan en risc de descompensació i pèrdua de l'empelt a causa de la recurrència del virus (Blasco et al., 2006; Carrión et al., 2010).

3. ESTRATÈGIES D'AVALUACIÓ DE LA FIBROSI HEPÀTICA.

3.1. Aspectes generals

Determinar la magnitud de la fibrosi hepàtica és primordial per tal de definir el seu pronòstic i progressió i poder delimitar les decisions terapèutiques a seguir. Al llarg de les últimes dècades, s'han invertit molts recursos en el descobriment i desenvolupament de noves estratègies que millorin la capacitat diagnòstica actual de la malaltia hepàtica. Aquests esforços venen justificats per l'elevat interès en diagnosticar precoçment als pacients amb fibrosi hepàtica i poder iniciar el més aviat possible les intervencions terapèutiques necessàries per evitar així possibles complicacions. Bàsicament, les diferents estratègies emprades per a aquesta finalitat es poden classificar en invasives i no invasives. Pel que fa al primer grup, els procediments més habituals inclouen la biòpsia hepàtica i el GPVH. Del segon conjunt en canvi, s'hi inclourien les proves d'imatge (ARFI i Fibroscan), la determinació de diferents paràmetres de dany hepàtic o de recanvi de la MEC que es troben presents en sang (marcadors serològics) o els perfils proteòmics obtinguts en diferents fluids biològics, entre d'altres (figura 4).

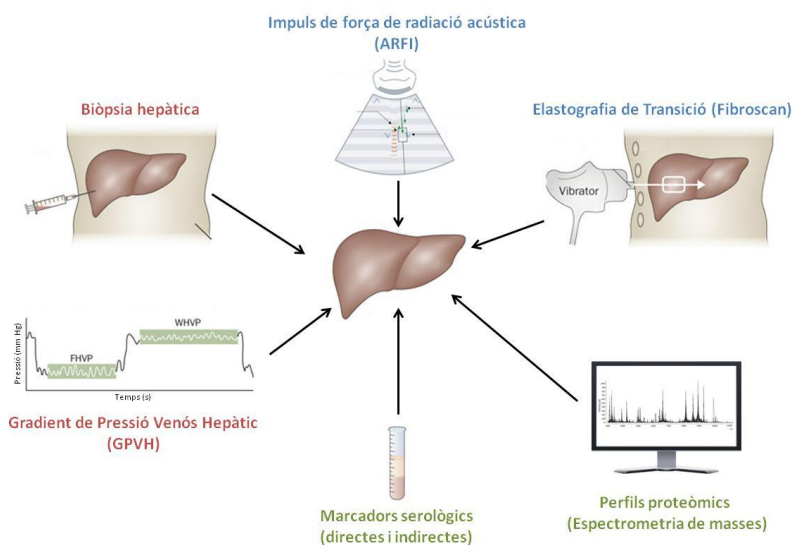


Figura 4. Estratègies diagnòstiques per a la detecció de fibrosi hepàtica. El text en vermell indica els procediments invasius; en blau es mostren les proves d'imatge i en verd les anàlisis sèriques (procediments no invasius). *Figura adaptada i modificada de Friedman et al., 2010.*

3.2. Mètodes invasius

a) Biòpsia hepàtica

La biòpsia hepàtica és actualment el mètode de referència per a determinar el grau de fibrosi en el fetge (Mani i Kleiner, 2009; Mehta et al., 2009). A l'hora de poder realitzar un diagnòstic aproximat del pacient fibròtic, durant la dècada dels 90 es van desenvolupar diferents sistemes de classificació a partir de les examinacions histològiques obtingues a través d'aquest procediment (figura 5). Entre ells, cal destacar el sistema METAVIR (METAVIR

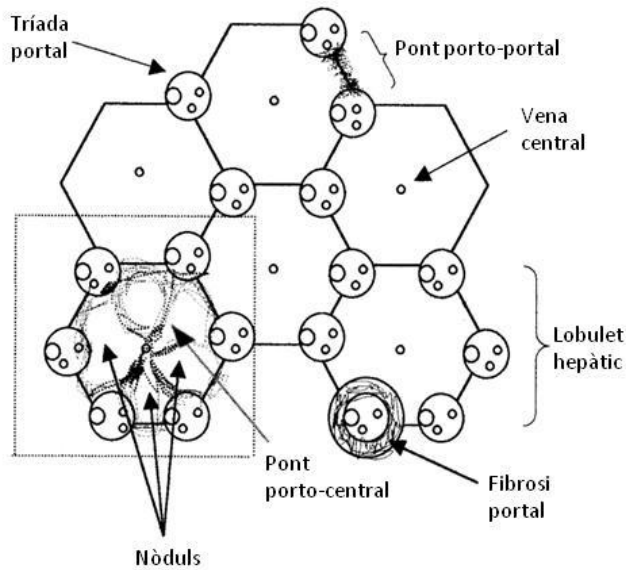


Figura 5. Representació esquemàtica de la histologia hepàtica amb diversos canvis patològics. Figura adaptada i modificada de Rahn, 2011.

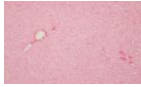


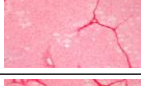
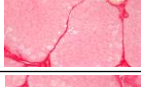
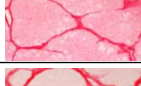

Cooperative Study Group, 1994), el Ishak (Ishak et al, 1995) i el Scheuer (Scheuer, 1991). Moltes d'aquestes aproximacions fan ús del concepte de graduació i d'estadificació. El primer terme (graduació) descriu la intensitat de l'activitat necro-inflamatòria mentre que el segon, l'estadificació, es focalitza en l'alteració arquitectònica de l'òrgan així com en la determinació de la quantitat de fibrosi. En el cas concret del sistema Ishak per exemple, la graduació s'avalua a través de la modificació d'un mètode semiquantitatiu descrit per Knodell et al. (Knodell et al., 1981), el qual permet determinar l'índex d'activitat histològica. El sistema de puntuació va de 0 a 18, essent 0 "no inflamació" i 18 el grau més elevat de necroinflamació. L'estadificació, en canvi, es basa en una puntuació sobre 6 en la qual s'avalua l'extensió de la fibra. Com anteriorment, el valor més baix indica absència de fibra mentre que un valor de 6 suggereix un estadi cirròtic. Pel que fa al sistema Scheuer, tant la puntuació de la graduació com la de l'estadificació comprèn cinc estadis progressius. En concret, i pel que fa a l'últim concepte, un estadi F=0 indica absència de fibrosi. Quan apareix un lleugera fibrosi portal es considera F1, mentre que si aquesta ja es troba per la zona periportal es classifica com a F2. Finalment, quan la fibrosi es localitza més enllà del tracte portal formant septes fibrosos es considera F3 i quan apareixen nòduls de regeneració ja es classifica com a F4, cirrosi (Scheuer, 1991; Theise, 2007). Finalment, el sistema METAVIR presenta una puntuació molt similar respecte al sistema anterior pel que fa a l'estadificació (valors de 0 a 4) i en canvi, un menor rang pel que fa a l'activitat inflamatòria (valors de 0 a 3).

Tant el sistema METAVIR com el de Scheuer, a l'usar només 4 estadis diferents per estadificar la fibrosi hepàtica, permeten una millor reproductibilitat i major concordança entre els patòlegs en comparació amb el sistema Ishak (Friedman, 2003). Ara bé, tot i les diferències existents entre alguns dels sistemes (taula 1), el propòsit final de tots ells és registrar aquelles característiques histològiques que semblen indicar major severitat i progressió del procés fibrogènic, així com poder realitzar un diagnòstic i confirmar l'etiologia en casos d'incertesa.

Malgrat les clares avantatges que presenta la biòpsia hepàtica, no està lliure d'inconvenients. Primerament, si bé es realitza en molts dels hospitals, aquest procediment l'ha d'executar exclusivament personal qualificat. Per altra banda, la mostra obtinguda només representa el 0,002% del total de l'òrgan i, a causa de la distribució heterogènia de la fibrosi, existeix un error de mostreig força elevat que pot acabar infravalorant el diagnòstic (Bedossa et al., 2003; Castera i Pinzani, 2010). Paral·lelament, la quantificació de la biòpsia presenta una alta variació inter-observador, assolint una variabilitat de fins el 25% en alguns casos (Bedossa et al., 2003). A més a més, no permet determinar els mecanismes patogènics subjacents (Friedman, 2003). Per acabar, un altre aspecte negatiu a destacar és la naturalesa invasiva de la biòpsia hepàtica, amb una clara morbiditat associada. En concret, entre un 20-40% dels pacients noten molèsties després del procediment i al voltant del 0,5% del pacients presenten complicacions majors com sangrat, infeccions, hemobília o fins i tot la mort (Cadranet et al., 2000; Lindor et al., 1996). Per aquests motius, la biòpsia hepàtica presenta una baixa tolerància i no acostuma a estar indicada com a procediment a emprar per a l'avaluació dinàmica del grau de fibrosi en funció del tractament (Castera, 2014; Grønbaek et al., 2002; Regev et al., 2002).

b) Gradient de pressió venós hepàtic

Si bé la biòpsia hepàtica es realitza normalment de forma percutània (A-Kader, 2012; van Beek i Funaki, 2013), també es pot obtenir de forma transjugular. Aquest últim procediment, a més a més d'adquirir mostres d'una qualitat similar a les obtingudes de forma percutània, permet obtenir informació pronòstica addicional a través de la mesura indirecta de la pressió portal (determinació del GPVH). Malgrat això, el procediment és més laboriós i normalment es necessita que el pacient estigui ingressat al voltant d'un o dos dies (Bosch et al., 2009), comportant potencials inconvenients i complicacions per aquest. Si només es necessita

Tall histològic (tinció Sirius-Red)	Descripció	ISHAK	METAVIR/SCHEUER
	Absència de fibrosi	0	F0
	Localització d'una lleugera fibrosi portal	1	F1
	Extensió de la fibrosi a la majoria de les àrees portals	2	F2
	Fibrosi en la majoria de les àrees portals i, ocasionalment, formant septes fibrosos	3	
	Fibrosi més enllà del tracte portal i formant ponts fibrosos (porto-portals)	4	F3
	Formació de ponts fibrosos porto-portals i porto-centrals i, ocasionalment, nòduls	5	
	Cirrosi, probable o confirmada, amb un elevat nombre de nòduls de regeneració	6	F4

Taula 1. Estadificació dels sistemes de classificació en la fibrosi hepàtica. La taula està construïda a partir de la informació recollida als articles de Mannan et al., 2014 i Theise, 2007.

mesurar el GPVH però, també es pot realitzar de forma lleugerament menys invasiva a través d'una incisió per la vena femoral o l'antecubital (Bosch et al., 2009). Quan el valor obtingut del GPVH és superior a 5 mm Hg, es considera que el pacient presenta hipertensió portal. Malgrat això, la hipertensió portal clínicament significativa apareix per sobre dels 10 mm Hg, on existeixen majors possibilitats de desenvolupar varius esofàgiques (Groszmann et al., 2005). De fet, els pacients amb un valor inferior als 10 mm Hg tenen només un 10% de probabilitats de descompensar-se durant els següents 4 anys, mentre que quan superen aquest punt de tall, presenten majors possibilitats de complicacions i la incidència de CHC s'incrementa en sis vegades (Ripoll et al., 2007, 2009).

Recentment, el GPVH ha demostrat ser més precís que la biòpsia hepàtica a l'hora d'identificar pacients amb recurrència severa del VHC després d'un transplantament hepàtic (Blasco et al., 2006). Tanmateix, ambdós procediments són invasius i per tant, existeixen forces contraindicacions. Tots aquests factors han comportat que, recentment, hagi crescut l'interès en el desenvolupament de mètodes alternatius no invasius per analitzar el grau de fibrosi hepàtica i realitzar el seu seguiment de forma més segura. De fet, el desenvolupament d'aquestes noves estratègies no invasives per estadificar i/o validar l'evolució de la malaltia han posat de manifest que, globalment, la biòpsia hepàtica és probablement un mètode de referència imperfecte (Castera i Pinzani, 2010).

3.3. Mètodes no invasius

a) Biomarcador

A causa de la necessitat urgent de definir noves estratègies no invasives, un dels camps més actius en la malaltia hepàtica durant l'última dècada ha estat la recerca de millors proves d'imatge (biomarcadors funcionals/anatòmics) així com marcadors sèrics no invasius relacionats amb el seu diagnòstic, pronòstic i seguiment (biomarcadors moleculars/solubles). El terme *biomarcador*, acrònim de *marcador biològic*, es refereix de forma genèrica a qualsevol indicació objectiva i mesurable sobre l'estat mèdic observat d'un pacient. Existeixen múltiples maneres més precises de definir aquest concepte i, afortunadament, totes elles se superposen considerablement. Tanmateix, al llarg de les últimes dues dècades s'ha intentat estandarditzar la seva definició i és per això que a l'any 1998 es va iniciar un consens entre diverses especialitats per tal de trobar-ne una conjunta (Biomarkers definitions working group, 2001). Concretament, es va definir el terme *biomarcador* com una "*característica mesurada i avaluada de forma objectiva com a indicador de processos biològics normals, processos patogènics o respostes farmacològiques a una intervenció terapèutica*". L'any 2001, el

programa internacional de seguretat química, dirigit per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) i en coordinació amb les Nacions Unides i l'Organització Internacional del Treball (WHO, 2001), també van definir aquest terme com "*qualsevol substància, estructura o procés que es pot mesurar en el cos o en els seus productes i que permet detectar una malaltia o el seu pronòstic*". Inclús una definició més àmplia havia estat exposada per la mateixa OMS uns anys abans (WHO, 1993) i engloba, no només la incidència i la detecció de la malaltia, sinó també els efectes dels tractaments, les intervencions i l'exposició del medi ambient. Concretament, afirma que un biomarcador pot ser "*gairebé qualsevol mesura que reflecteixi una interacció entre un sistema biològic i un perill potencial, que pot ser d'origen químic, físic o biològic. Aquesta, pot ser funcional i fisiològica, bioquímica a nivell cel·lular, o una interacció molecular*".

Si bé existeixen múltiples funcions dels biomarcadors, n'hi ha cinc de principals (Puntmann, 2009):

- Biomarcadors antecedents: identificació del risc a desenvolupar una malaltia.
- Biomarcadors de detecció: cribatge de la malaltia subclínica.
- Biomarcadors de diagnòstic: detecció de la malaltia quan ja existeixen manifestacions clíniques.
- Biomarcadors d'estadificació: determinació de la severitat de la malaltia.
- Biomarcadors de pronòstic: predicció del curs de la malaltia o de la resposta a una teràpia.

Pel que fa a les característiques ideals d'un marcador hepàtic, aquest hauria d'ésser específic del fetge, no variar amb les alteracions metabòliques ni amb l'excreció renal o biliar i ser fàcilment mesurable. Per altra banda, hauria de ser fiable i sensible a l'hora de discriminar els diferents estadis de fibrosi en qualsevol tipus de malaltia hepàtica crònica, presentar bona correlació amb el contingut de la MEC i ser útil per tal de monitoritzar la resposta al tractament antifibrogènic (Baranova et al., 2011). Si bé és cert que encara no n'hi ha un que compleixi amb totes i cadascuna d'aquestes condicions (Watkins, 2009), els avenços en el camp han permès la identificació de nous biomarcadors molt prometedors.

El procediment típic a seguir en la validació d'un biomarcador és comparar-lo amb el mètode de referència actual (Puntmann, 2009). No obstant, tenint present que la biòpsia hepàtica és un mètode de referència imperfecte, mai es podran obtenir àrees sota la corba ROC (AUROC) de 1 (Bedossa et al., 2003). Per tant, molts experts en fibrosi hepàtica consideren que els tests no invasius amb una AUROC que oscil·li entre 0,85 i 0,9 són tan bons com la biòpsia hepàtica per estadificar la malaltia (Bedossa i Carrat, 2009; Mehta et al., 2009). Malgrat tot, encara existeix una certa reticència a acceptar les estratègies no invasives de

diagnòstic de la fibrosi hepàtica com una alternativa viable i preferible a la biòpsia hepàtica (Martínez et al., 2011).

b) Proves d'imatge

Aquest tipus de tècniques són una aproximació molt atractiva per avaluar la fibrosi hepàtica. Segurament és conseqüència de la seva bona reproductibilitat, de la rapidesa en l'obtenció de resultats i de la capacitat de realitzar múltiples determinacions al llarg del temps sense complicacions ni riscos per al pacient (Carrión, 2009). A més a més, permeten detectar també canvis estructurals en l'òrgan. De fet, l'acumulació i deposició de MEC a causa de l'activació de les cèl·lules hepàtiques estrellades condueix a alteracions en la microestructura del fetge que es reflecteixen en un augment de la rigidesa hepàtica i a canvis en el flux sanguini (Baranova et al., 2011). Els recents avenços tecnològics han permès doncs avaluar aquests paràmetres amb tècniques com l'elastografia de transició (ET), la radiació acústica per impuls de força (ARFI) i la imatge per ressonància magnètica (IRM). Seguidament s'exposen les característiques principals de les tècniques més rellevants:

i. Elastografia de transició



Figura 6. Elastografia de transició obtinguda d'un pacient amb VHC. *Figura obtinguda de Martínez et al., 2011.*

L'elastografia de transició (o Fibroscan®) és segurament un dels mètodes d'imatge més emprats a Europa i ha estat recomanat per l'Associació Europea per a l'Estudi del Fetge per avaluar als pacients amb VHC (European Association for the Study of the Liver, 2011). Aquest es basa en la determinació de la rigidesa o l'elasticitat hepàtica mitjançant un pols mecànic de vibració i una ona d'ultrasons (figura 6) (Sandrin et al., 2003). Concretament,

l'emissió del pols mecànic produeix una vibració d'amplitud mitja i de freqüència baixa que es propaga a través del teixit (ona elàstica o mecànica) entre 25 mm i 65 mm per sota de la superfície cutània (Foucher et al., 2006). Seguidament, l'ona d'ultrasons que segueix l'ona mecànica mesura la velocitat de propagació de l'ona elàstica. Aquesta velocitat es correlaciona directament amb la rigidesa de l'òrgan segons l'equació del mòdul de Young $E=3\rho v^2$ (on "v" és la velocitat de propagació de l'ona elàstica i "ρ" la densitat del teixit) i permet determinar el paràmetre en qüestió, expressant el resultat final en kilopascals (kPa) (Sandrin et al., 2003). El

seu rang de detecció és ampli, situant-se entre els 2,5 i els 75 kPa. Si bé a menor velocitat de propagació existeix una menor rigidesa hepàtica, els valors d'elasticitat hepàtica en subjectes sans es situen en $5,81 \pm 1,54$ i $5,23 \pm 1,59$ en homes i dones, respectivament (Roulot et al., 2008). Malgrat que la mesura és indolora i no pren més d'uns 5-10 minuts, la seva precisió a l'hora d'avaluar graus moderats de fibrosi hepàtica no és tan fiable en comparació amb el diagnòstic de la fibrosi avançada i cirrosi (Friedrich-Rust et al., 2008). A més a més, s'ha demostrat que en pacients amb un espai intercostal estret o amb un índex de massa corporal elevat l'ús del Fibroscan® tampoc és efectiu (Castera et al., 2010a).

ii. ARFI

La radiació acústica per impuls de força (ARFI) és també un mètode diagnòstic que permet avaluar de forma indirecta la fibrosi hepàtica. Concretament, aquesta tècnica ha estat desenvolupada per Siemens® i es troba integrada en un equip d'ecografia convencional que, mitjançant l'ús d'una sonda i sense necessitat de compressió externa, avalua la rigidesa del teixit hepàtic per mitjà de la velocitat (m/s) a la que una ona elàstica generada per un

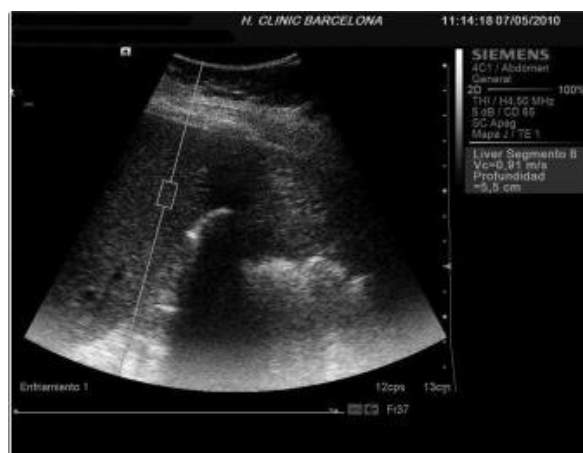


Figura 7. ARFI obtinguda d'un pacient amb VHC. Figura obtinguda de Martínez et al., 2011.

impuls acústic travessa la regió d'interès (figura 7) (Lu i Ling., 2016). Si bé aquest mètode quantitatiu proporciona una única mesura unidimensional de la rigidesa de l'òrgan (com el Fibroscan®), es poden obtenir varies imatges que permeten aconseguir generar una imatge en mode B de dues dimensions. La regió obtinguda acostuma a ser d'uns 10x5 mm de superfície (Jeong et al., 2014), i pot ésser analitzada en la imatge bidimensional en mode B fins a un màxim de 8 cm de profunditat des del pla de la pell (Fahey et al., 2005). Així doncs, aquesta modalitat diagnòstica aporta informació estructural a les propietats morfològiques que mostra l'ecografia i permet obtenir resultats quantitatius mesurables de manera objectiva. El seu rang de detecció però, no és tan ampli com el Fibroscan®, situant-se entre els 0,7 i els 4,6 m/s (Boursier et al., 2010). En individus sans, els valors es troben al voltant de la unitat (Crespo et al., 2012). Si bé el procediment és ràpid, indolor i fàcil de realitzar, la regió d'avaluació és petita i les mesures d'elasticitat no s'obtenen en temps real. A més a més, tampoc existeix cap criteri qualitatiu per acceptar o excloure una mesura (Frulio i Trillaud, 2013; Martínez et al., 2011).

iii. Imatge per ressonància magnètica

La imatge per ressonància magnètica és una altra de les estratègies emprades per tal d'avaluar la fibrosi hepàtica. De fet, diverses tècniques basades en aquest principi han estat estudiades, essent les imatges per difusió, les imatges de perfusió, l'espectroscòpia de ressonància magnètica i l'elastografia de ressonància magnètica unes de les més usades (Girometti et al., 2007; Lim et al., 2003; Manduca et al., 2001; Talwalkar et al., 2008; Yin et al., 2007). Aquesta última utilitza ones mecàniques per avaluar quantitativament en kPa el mòdul de cisallament o rigidesa del fetge (figura 8) (Muthupillai et al., 1995). L'anàlisi potencial de tot el parènquima hepàtic, juntament amb la independència de l'operador i la capacitat d'analitzar pacients obesos i/o amb ascites són algunes de les avantatges més clares (Huwart i van Beers, 2008). A més, aquest mètode pot ajudar a la quantificació del contingut de grassa hepàtica (Martínez et al., 2011). Malgrat això, el seu elevat cost i la llarga durada de la tècnica són dues de les limitacions més rellevants a destacar.

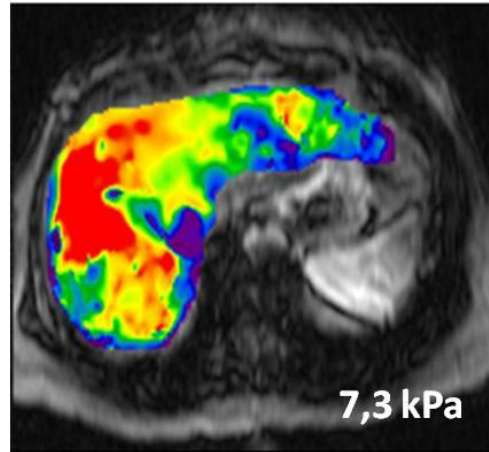


Figura 8. MRE obtinguda del fetge d'un pacient cirròtic amb VHC. Figura adaptada de Venkatesh et al., 2013.

c) Marcadors serològics

i. Marcadors indirectes

Els marcadors indirectes, o també anomenats de classe II, són la primera aproximació per estudiar la funció hepàtica i determinar el potencial grau de fibrosi en el fetge. En aquest grup s'engloben els elements alliberats en sang a causa de la inflamació i el dany hepàtic, les molècules sintetitzades o metabolitzades pel fetge i també els processos habitualment interromputs a causa de la disfunció hepàtica com la resistència a la insulina (Baranova et al., 2011). Així doncs, el formen els clàssics marcadors bioquímics obtinguts de l'anàlisi rutinària de funció hepàtica dels laboratoris clínics. Entre ells, s'inclouen les aminotransferases (ALT i AST), el recompte de plaquetes, la gamma glutamil transferasa (GGT), la bilirubina total, la fosfatasa alcalina, els temps de protrombina, i els tradicionals marcadors sèrics relacionats amb la inflamació com l'haptoglobina, l'apolipoproteïna-A1 i la α 2-macroglobulina, entre d'altres (Fernández-Varo, 2012). Per tal de millorar la capacitat diagnòstica d'aquests marcadors serològics, s'han desenvolupat una gran varietat d'índexs (taula 2) que s'obtenen de la combinació d'alguns dels marcadors indirectes exposats. Per definició, un índex està format per la combinació de diferents paràmetres –biomarcadors directes i/o indirectes, paràmetres

Índex	Estudi	Components individuals	Etiologia	Sensibilitat (%)	Especificitat (%)
Ràtio AST/ALT	Sheth et al., 1998	AST i ALT	VHC	53	100
PGA	Teare et al., 1993	Temps de protrombina, GGT i apolipoproteïna A1	Diversa	91	81
APRI	Wai et al., 2003	AST, recompte de plaquetes	VHC	89	75
FibroTest/ FibroSure	Imbert-Bismut et al., 2001	α2-macroglobulina, apolipoproteïna A1, haptoglobina, GGT, bilirubina total, edat i sexe	VHC	75	85
FibroIndex	Koda et al., 2007	Recompte de plaquetes, AST i GGT	VHC	30-40	97
Forns	Forns et al., 2002	Edat, recompte de plaquetes, GGT, colesterol	VHC	94	51
FIB-4	Sterling et al., 2006	Recompte de plaquetes, ALT, AST i edat	VHC + VIH	70	74
Simple test	Angulo et al., 2007	Edat, hiperglucèmia, índex de massa corporal, recompte de plaquetes, albúmina i AST/ALT	EHNA	77	71
			2 punts de tall	43	96

Taula 2. Índexs formats per la combinació de marcadors indirectes. Taula adaptada i ampliada de Baranova et al., 2011.

demogràfics com l'edat i el sexe— que, mitjançant diferents fórmules matemàtiques, permeten incrementar l'eficàcia diagnòstica envers els biomarcadors per separat. A continuació s'analitzen tres dels índexs més destacats que estan formats per diferents paràmetres indirectes:

- **APRI (AST-to-Platelet Ratio Index):** Aquest marcador utilitza dues variables bioquímiques de rutina com són la AST i el recompte de plaquetes (Wai et al., 2003). El valor de l'índex s'obté a través de la fórmula següent:

$$APRI = \frac{AST / LSN}{rec.plaquetes(10^9 / L)} \cdot 100$$

On LSN: límit superior de normalitat de la AST

Aquest índex ha estat validat com a marcador de fibrosi hepàtica significativa en pacients coinfectats amb el VHC i el VIH, i recentment s'ha utilitzat per determinar la fibrosi avançada en els pacients VIH-monoinfectats (DallaPiazza et al., 2010).

- **FibroTest/FibroSure®:** Descrit per Imbert-Bismut et al. l'any 2001, aquest índex presenta una fórmula patentada (BioPredictive, París, França) on es combinen cinc paràmetres bioquímics sèrics (α2-macroglobulina, apolipoproteïna A1, haptoglobina, GGT i bilirubina) juntament amb l'edat i el sexe del pacient. La puntuació obtinguda es correlaciona amb el grau de dany hepàtic en pacients fibròtics/cirròtics amb VHC.

Posteriorment també s'ha emprat en altres etiologies. Malgrat això, a causa de la variabilitat existent a l'hora de determinar els diferents components, l'avaluació del FibroTest/FibroSure® només es pot realitzar en laboratoris validats (Friedrich-Rust et al., 2010).

- Índex de Forns: Aquest model predictiu combina l'edat i 3 paràmetres bioquímics: recompte de plaquetes, GGT i el colesterol (Forns et al., 2002). Gràcies a aquest índex es pot predir la presència de fibrosi significativa o cirrosi en pacients amb VHC i, consegüentment, evitar la realització d'una biòpsia hepàtica en un terç d'aquest col·lectiu. La fórmula per obtenir el valor de l'índex és la següent:

$$Forns = 7,811 - 3,131 \times \ln(\text{rec.plaquetes}) + 0,781 \times \ln(GGT) + 3,467 \times \ln(\text{edat}) - 0,014 \times (\text{colesterol})$$

Un cop obtingut el valor numèric, si aquest és inferior a 4,21 es pot considerar que hi ha absència de fibrosi significativa. Valors majors a 6,9 indiquen presència de fibrosi significativa.

Tot i el desenvolupament dels diferents índexs mencionats, els estudis publicats fins ara indiquen que continuen presentant mancances a l'hora de classificar el grau de fibrosi (Castera, 2012) i només permeten confirmar la presència de fibrosi significativa en un terç dels pacients (Leroy et al., 2007). Això es deu, en part, a que la mesura del procés fibrogènic és indirecta.

Pel que fa a l'anàlisi de la cirrosi hepàtica, és rellevant mencionar l'existència de dos altres índexs que també usen diferents paràmetres indirectes per avaluar-la: el Child-Pugh i el MELD (*Model for End-stage Liver Disease*). Tot i això, ambdós estan focalitzats en la determinació del tractament requerit, la gravetat i el pronòstic de la cirrosi hepàtica exclusivament (Farnsworth et al., 2004, Kamath et al., 2001). L'índex Child-Pugh es basa en la determinació dels valors serològics d'albumina i bilirubina així com d'ascites, d'encefalopatia i del temps de protrombina (Pugh et al., 1973). A cada paràmetre se li assigna un valor entre 1 i 3, essent 3 el de major gravetat. En funció dels punts totals obtinguts, el pacient es pot classificar en tres grups diferents: classe A (millor pronòstic), B (pronòstic intermedi) o C (mal pronòstic). L'índex MELD en canvi, utilitza paràmetres més objectius com són els valors sèrics de la bilirubina, la creatinina i la ràtio normalitzada internacional (INR) (Malinchoc et al., 2000). La fórmula matemàtica de l'escala MELD és:

$$MELD = 9,57 \times \text{Log}_e(\text{creatinina mg/dL}) + 3,78 \times \text{Log}_e(\text{bilirubina total mg/dL}) + 11,2 \times \text{Log}_e(\text{INR}) + 0,643$$

El resultat és un nombre que es troba en un rang entre 6 i 40 aproximadament. De forma similar a l'observat en els altres índexs, un valor elevat indica un pitjor pronòstic (Wiesner et al., 2003).

ii. Marcadors directes

Per tal d'aportar informació complementària als marcadors indirectes, s'han estudiat també un altre tipus de marcadors, els anomenats marcadors directes o de classe I. Com s'ha vist amb anterioritat, durant el procés fibrogènic existeix un desequilibri entre la degradació i producció de les proteïnes de la MEC (Bataller i Brenner, 2009). Aquests marcadors doncs, al ser capaços de detectar de forma directa els desequilibris que es produeixen entre la degradació i la producció de la MEC, són clínicament rellevants tant per realitzar una estadificació de la fibrosi hepàtica com per monitoritzar l'activitat fibrinogènica i la degradació de les proteïnes de la MEC (Martínez et al., 2011). Es caracteritzen per ser fragments dels components que formen la MEC i productes del metabolisme del col·lagen, els quals són produïts per les cèl·lules hepàtiques estrellades durant el procés fibrogènic (Sebastiani, 2012). Un exemple d'aquest grup de marcadors són el col·lagen tipus I, la fibronectina, l'àcid hialurònic (AH), l'inhibidor tissular de la metaloproteïnasa tipus 1 (TIMP-1) o el propèptid aminoterminal del procol·lagen tipus III (PIIINP). Malauradament, la majoria dels estudis realitzats fins ara presenten certes limitacions, no només en el procés de validació, sinó també en la seva capacitat diagnòstica i pronòstica (Castera i Pinzani, 2010; Sebastiani, 2012). Així doncs, i per intentar millorar aquestes capacitats, s'han desenvolupat també diferents índexs que combinen diversos marcadors directes. Un dels més coneguts és el ELF (Enhanced Liver Fibrosis), el qual es va obtenir després d'un estudi multicèntric internacional en 1.021 pacients amb diferent etiologia hepàtica (Rosenberg et al., 2004). Inicialment, aquest índex tenia en consideració l'edat dels pacients, però al 2008 es va validar la puntuació de l'algoritme només tenint en compte els valors sèrics de 3 marcadors directes. La definició de cadascun d'ells s'exposa a continuació:

- AH: És un polímer lineal, distribuït per l'espai extracel·lular amb unitats repetides de disacàrids {[àcid D-glucoriònic (1-β-3) D-N-acetilglucosamina (1 β-4)]_n}, que és sintetitzat per les cèl·lules hepàtiques estrellades i degradat per les cèl·lules endotelials sinusoïdals (Gressner i Bachem, 1990; Laurent i Fraser, 1992). S'ha avaluat com a biomarcador de fibrosi hepàtica ja que presenta una bona correlació amb la gravetat de la malaltia. La seva principal utilitat diagnòstica és la capacitat d'excloure fibrosi avançada i cirrosi (Halfon et al., 2005; Suzuki et al., 2005).
- TIMP-1: És una proteïna que interacciona amb les MMPs tot inhibint la seva activitat i funcionament. Diversos estudis apunten que valors elevats tant de TIMP com de MMP es correlacionen amb el procés cirròtic (Boeker et al., 2002; Trocme et al., 2006).
- PIIINP: És el producte obtingut de l'escissió de l'extrem N-terminal del procol·lagen tipus III al seu pas a col·lagen III, el qual és sintetitzat durant la fibrogènesi hepàtica per

les cèl·lules hepàtiques estrellades (Guechot et al., 1996). S'ha vist que el PIIINP és un bon predictor de fibrosi en pacients amb diferents etiologies (Nøjgaard et al., 2003; Trocme et al., 2006).

Tot i l'elevada eficàcia d'aquest algoritme per detectar pacients amb fibrosi significativa i cirrosi (Crespo et al., 2012; Guha et al., 2008; Martínez et al., 2011), diversos estudis han apuntat que la seva capacitat diagnòstica en fibrosi hepàtica lleu o moderada és més reduïda (Crespo et al., 2012; Lichtinghagen et al., 2013). De fet, una de les limitacions d'aquests tipus de biomarcadors és que no són totalment específics del fetge i els seus nivells poden estar elevats en presència de processos inflamatoris o altres patologies. A més a més, es poden veure influenciats per una disfunció de les cèl·lules endotelials, una excreció biliar alterada o per una disfunció renal (Grigorescu, 2006).

iii. Combinació de marcadors directes i indirectes

Al llarg dels últims anys s'han dissenyat també diversos índexs que combinen ambdós tipus de marcadors serològics per tal de contrarestar les diferents limitacions que presenten cadascun d'ells i millorar així el rendiment diagnòstic global (taula 3). Dos dels més destacats es troben detallats a continuació:

- **FibroMeter:** Aquest índex combina diferents marcadors directes i indirectes com són el recompte de plaquetes, el temps de protrombina, la AST, la α 2-macroglobulina, el AH, la urea en sang i l'edat. La bona capacitat diagnòstica i la seva aplicabilitat ha estat validada en diverses malalties hepàtiques cròniques com les degudes al VHC i el VHB, la HA i l'EHNA. Una característica important del FibroMeter és que no només s'usa com a eina diagnòstica sinó que també permet determinar de forma indirecta el percentatge de fibrosi al fetge (Calès et al., 2005). Per tant, té dos objectius diagnòstics principals: estadificar la fibrosi hepàtica de forma no invasiva i quantificar-la (Calès et al., 2008).
- **Hepascore:** Aquest model usa l'edat, el sexe, la bilirrubina, la GGT i la α 2-macroglobulina com a variables predictives (Adams et al., 2005). Cinc anys després de la seva definició, es va realitzar un estudi multicèntric on es van incloure 512 pacients amb VHC i es va avaluar aquest índex de forma automatitzada (Guéchet et al., 2010). Els resultats obtinguts van ésser molt positius, obtenint una AUROC de 0,81 i de 0,88 per identificar fibrosi significativa i cirrosi, respectivament.

Índex	Estudi	Components individuals	Etiologia	Sensibilitat (%)	Especificitat (%)
FibroSpect II	Patel et al., 2004	α 2-macroglobulina, AH, TIMP-1.	VHC	77	73
SHASTA	Kelleher et al., 2005	AST, albúmina, AH.	VHC + VIH	88	72
FibroMeter	Calès et al., 2005	α 2-macroglobulina, recompte de plaquetes, temps de protrombina, AST, edat, urea, AH.	Diversa	81	84
Hepascore	Adams et al., 2005	Edad, sexe, bilirrubina, GGT, α 2-macroglobulina, AH.	VHC	63	89

Taula 3. Índexs formats per la combinació de marcadors directes i indirectes. Taula adaptada i modificada de Baranova et al., 2011.

d) Combinació de proves d'imatge i marcadors serològics

Recentment, s'han desenvolupat també diversos algorismes que combinen marcadors serològics amb proves d'imatge. Un d'ells és l'algorisme de Castera (Castera et al., 2010b), el qual permet detectar la presència de fibrosi significativa (>F2 emprant el sistema METAVIR) mitjançant la combinació del Fibroscan® i del FibroTest®. Quan ambdues estratègies coincideixen en el diagnòstic, no és necessària l'obtenció d'una biòpsia hepàtica. Per contra, quan són discordants o no s'obté resultat de l'elastografia de transició, el procediment invasiu es fa necessari. Gràcies a aquesta combinació de tècniques però, es pot reduir significativament la necessitat de realitzar una biòpsia hepàtica. Altres de les combinacions emprades són les descrites per Crespo et al. l'any 2012. Concretament, l'estudi afirma que la combinació de l'índex ELF amb tècniques d'imatge com l'ARFI o el Fibroscan® permeten millorar el rendiment diagnòstic i són capaces de detectar amb millor precisió la presència de fibrosi significativa i cirrosi en pacients amb VHC trasplantats. Aquest fet doncs, permet evitar també la necessitat de biopsiar el teixit hepàtic.

e) Limitacions globals de les diferents estratègies no invasives

Malauradament, si bé moltes d'aquestes estratègies han estat validades i fins i tot algunes s'usen en la pràctica clínica, el seu ús es limita majoritàriament a la detecció de fibrosi hepàtica moderada/avançada i cirrosi. Així doncs, la capacitat d'identificar de forma no invasiva a pacients en estadis fibròtics precoços i amb un procés fibrogènic actiu continua essent un repte a assolir (Baranova et al., 2011; Schiavon et al., 2014).

3.4. Models experimentals i estratègies per a la determinació de nous biomarcadors de fibrosi hepàtica

Una de les aproximacions experimentals emprades per tal d'identificar nous biomarcadors de fibrosi hepàtica inicial, és l'ús de models *in vivo*. Aquests s'han emprat des de fa dècades, no només per intentar determinar i validar potencials biomarcadors, sinó per aclarir els diferents mecanismes que intervenen en la fisiopatologia de la fibrosi o fins i tot per comprovar l'efecte antifibrogènic de noves teràpies (Iredale, 2007). Un dels més usats és el model d'inducció de fibrosi en rates mitjançant l'administració crònica de tetraclorur de carboni (CCl_4), el qual indueix una fibrosi progressiva que assoleix diferents graus d'intensitat en funció de les setmanes d'exposició (Segovia-Silvestre et al., 2011). Concretament, el dany es produeix a causa dels radicals lliures formats durant el seu metabolisme: el triclorometil ($\text{CCl}_3\cdot$) i el triclorometil-peroxil ($\text{Cl}_3\text{COO}\cdot$). Quan aquests radicals són metabolitzats pel citocrom p-450, generen estrès oxidatiu que comporta un dany hepàtic i, consegüentment, una regeneració hepàtica irregular (Jiménez et al., 1992). De fet, els resultats observats tant en el nostre laboratori com en d'altres han demostrat que aquests animals tenen un increment gradual de la deposició hepàtica de fibres de col·lagen, que alhora s'associa amb un trastorn progressiu en l'hemodinàmica sistèmica i esplàncnica, amb alteracions sèriques de les proves de funció hepàtica i renal i finalment en una retenció marcada de sodi i aigua que resulta en la formació d'ascites (Clària i Jiménez, 2005). Aquesta seqüència d'esdeveniments és molt similar a l'observada en la cirrosi humana i posa de manifest la importància d'emprar aquest model per comprendre millor els mecanismes patofisiològics implicats en aquests fenòmens.

Així doncs, la combinació d'aquest tipus de procediments amb tècniques d'avantguarda com l'espectrometria de masses representa una estratègia molt valuosa per tal d'intentar diagnosticar de forma precoç la fibrosi hepàtica. A més a més, l'anàlisi de perfils proteòmics pot contribuir en gran mesura a aquesta fita (Schiavon et al., 2014).

4. PROTEÏNES.

4.1. Aspectes generals

Les proteïnes constitueixen al voltant del 75% del pes en sec de l'organisme, essent fins i tot major en determinats fluids biològics com el plasma sanguini (Lane et al., 2015). A més a més, són les responsables de la majoria de les funcions biològiques que es produeixen a l'organisme. Entre elles, cal destacar les relacionades amb el transport, l'activitat defensiva, l'estructural, l'enzimàtica, la reguladora, l'hormonal, l'homeostàtica i la de reserva (Alberts et al., 2007; Doonan, 2002; O'Connor i Adams, 2010).

4.2. Aminoàcids

Els aminoàcids són els components principals de les proteïnes. Aquests compostos orgànics es caracteritzen per contenir un grup carboxil (-COOH), un grup amino (-NH₂) i una cadena lateral (R), la qual és específica de cada aminoàcid. Aquesta característica intrínseca comporta que cada aminoàcid presenti propietats i comportaments diferencials envers la resta. De forma general però, quan el pH és baix, els aminoàcids es troben en la seva forma catiónica a causa de la protonació del grup amino. Contràriament, a valors de pH elevats, ambdós grups estan desprotonats i l'aminoàcid presenta una càrrega global negativa que prové del grup carboxil. En condicions fisiològiques en canvi (pH≈7,4), el grup amino es troba normalment protonat i el grup carboxil desprotonat, generant-se una molècula dipolar globalment neutra que es coneix com a zwitterió (figura 9) (Doonan, 2002). El valor de pH que genera aquesta conformació zwitteriònica es coneix com a punt isoelèctric (pI) de la proteïna.

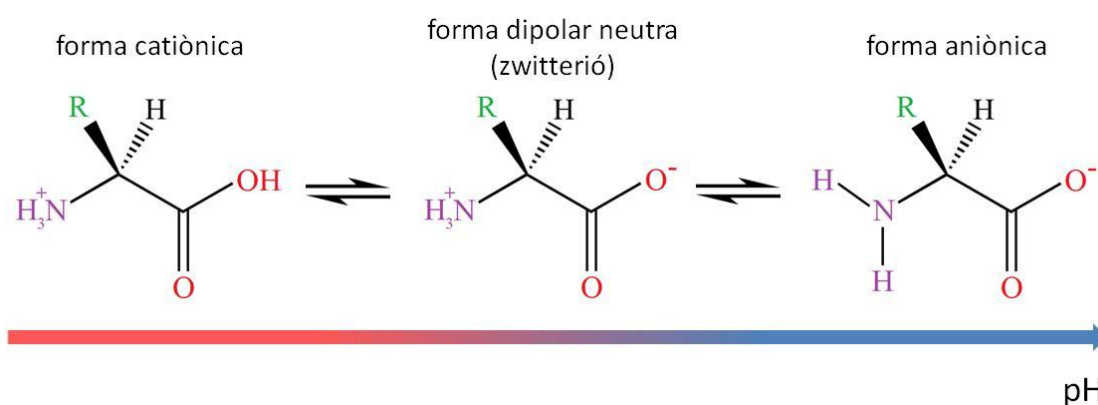


Figura 9. Representació de la càrrega neta d'una proteïna en funció de la variació del pH.

S'han identificat més de 500 aminoàcids (Wagner i Musso, 1983), encara que només 22 són els emprats per a la síntesi de proteïnes (Bischoff i Schlüter, 2012). Tradicionalment, es creia que únicament eren 20, però l'any 1986 es va descriure la selenocisteïna com el 21è

aminoàcid (Zinoni et al., 1986) i, l'any 2002, es va identificar la pirrolisina com el 22è (Srinivasan et al., 2002). Aquest últim però, només s'ha pogut detectar en arqueobacteris.

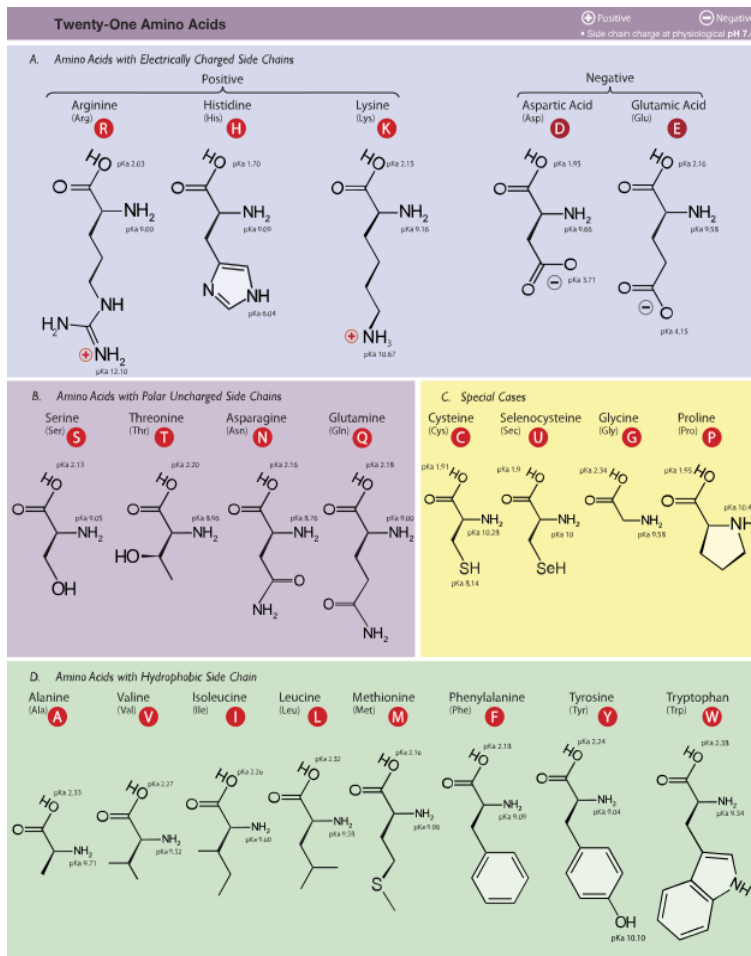


Figura 10. Classificació dels 21 aminoàcids presents en les proteïnes dels organismes eucariotes en base a la seva cadena lateral. Figura original de Dan Cojocari, Department of Medical Biophysics, University of Toronto, 2011. S'ha obtingut de:

https://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid#/media/File:Amino_Acids.svg

l'organisme, en determinades circumstàncies la quantitat obtinguda pot no ser suficient i es necessita obtenir-los també per la dieta (Fürst i Stehle, 2004; Reeds, 2000).

4.3. Enllaç peptídic i terminologia

Els aminoàcids estan units entre sí per enllaços amida –també coneguts com enllaços peptídics– (figura 11). En funció exclusivament del nombre d'aminoàcids que presenta la molècula, es pot diferenciar entre el concepte de “pèptid” i “proteïna”. Tot i això, com que no existeix cap diferència química entre ambdós termes, el nombre exacte d'aminoàcids per decidir quina terminologia emprar no està clarament definit. Les molècules amb un nombre inferior a 20 aminoàcids es denominen pèptids –o també polipèptids o oligopèptids– i les que

Existeixen diferents criteris de classificació dels aminoàcids, encara que habitualment s'agrupen en funció de les propietats de les seves cadenes laterals (figura 10). Tanmateix, també es poden separar en funció de la capacitat que té l'organisme de sintetitzar-los. Els aminoàcids que no poden ésser sintetitzats i que han d'obtenir-se a través de la dieta es coneixen com aminoàcids essencials. Per contra, els que es poden sintetitzar són els aminoàcids no essencials. Finalment, alguns aminoàcids específics es consideren essencials condicionals ja que, si bé poden ésser sintetitzats per

presenten un nombre major de 50 aminoàcids es consideren proteïnes. Ara bé, els compostos que es troben entre els 20 i els 50 aminoàcids poden denominar-se tant pèptids com proteïnes petites (Doonan, 2002).

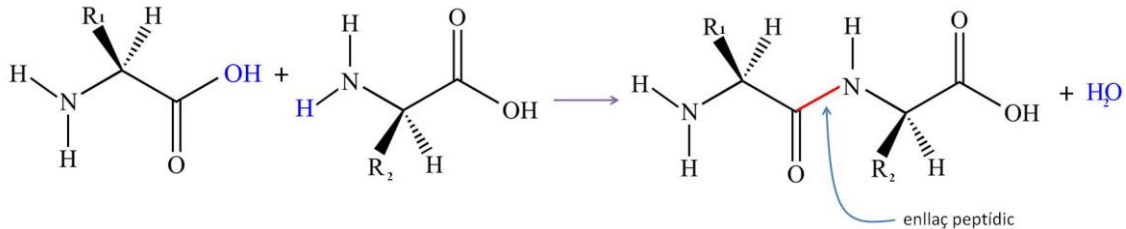


Figura 11. Mecanisme simplificat de l'enllaç peptídic. La unió covalent de dos aminoàcids a través del grup carboxil del primer i del grup amino del segon es forma per mitjà d'una reacció de condensació.

4.4. Nivells d'organització

El plegament i conformació espacial que presenta cada proteïna acostumen a ésser únics i específics (Alberts et al., 2007). La naturalesa de les cadenes laterals dels diferents aminoàcids són un dels factors més influents en el seu plegament. Els grups apolars intenten disposar-se a l'interior de la molècula mentre que les cadenes polars s'agrupen a l'exterior per tal d'interactuar amb l'entorn aquós. Tot i això, les proteïnes no són rígides i presenten mobilitat i canvis de conformació (Alberts et al., 2007). A l'hora de determinar l'estructura d'una proteïna, acostumen a diferenciar-se quatre nivells d'organització diferents (Alberts et al., 2007; Cox et al., 2015; Kent, 2009):

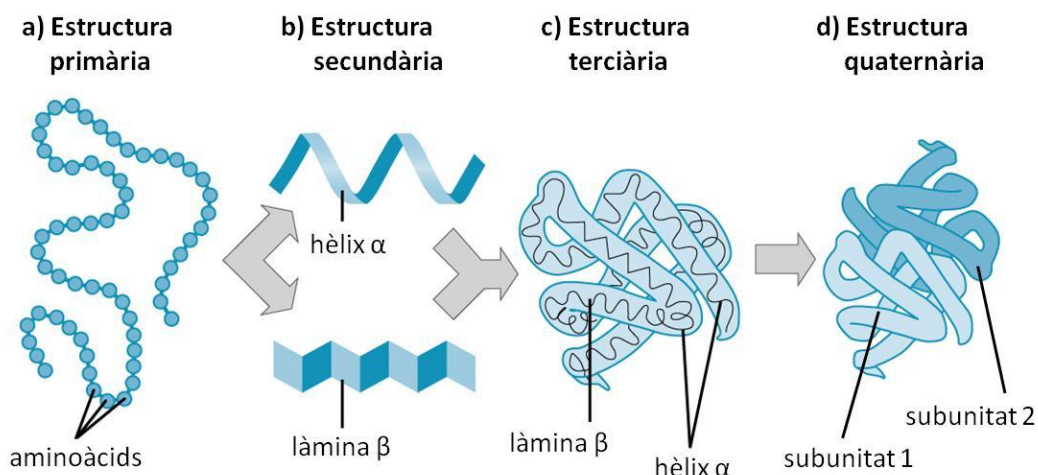


Figura 12. Representació esquemàtica dels diferents nivells d'organització proteics. Imatge modificada de OpenStax CNX: http://cnx.org/content/m44402/latest/figure_03_04_09.jpg

- El primer nivell d'organització és coneix com estructura primària i es pot definir com la seqüència d'aminoàcids que conforma la proteïna (figura 12a).

- L'estructura secundària es defineix com el model espacial que presenten les diferents regions de l'estructura primària (figura 12b). Els patrons regulars més freqüents que es formen per tal d'obtenir major estabilitat són l'hèlix α i la làmina β .
- L'estructura terciària és la forma en 3 dimensions de tota la seqüència peptídica; és a dir, la forma espacial que presenten les diferents estructures secundàries (figura 12c). Com anteriorment, es formen diferents interaccions per tal de donar major estabilitat a la molècula orgànica. Aquestes poden ésser per pont d'hidrogen, forces de Van der Waals, o fins i tot enllaços disulfur entre cisteïnes.
- Finalment, l'últim nivell d'organització és l'estructura quaternària i es produeix en aquells casos on hi ha interacció de diferents proteïnes per tal de formar un complex proteic. Per tant, es pot definir com la forma tridimensional que presenta el grup format per dues o més proteïnes (figura 12d).

5. PROTEÒMICA.

5.1. Aspectes generals

El caràcter dinàmic de les proteïnes comporta una constant modificació dels patrons proteics durant el curs dels diferents processos biològics. Entre les diverses alteracions, caldria destacar la seva abundància, les interaccions proteïna-proteïna, les modificacions postraduccional (MPTs), les ràtios de síntesi i degradació, etc. (Larance i Lamond, 2015). Per tant, entendre la relació existent entre l'estructura i la funció de les diferents proteïnes així com les diferents desregulacions, constitueixen alguns dels aspectes claus de la proteòmica (figura 13).

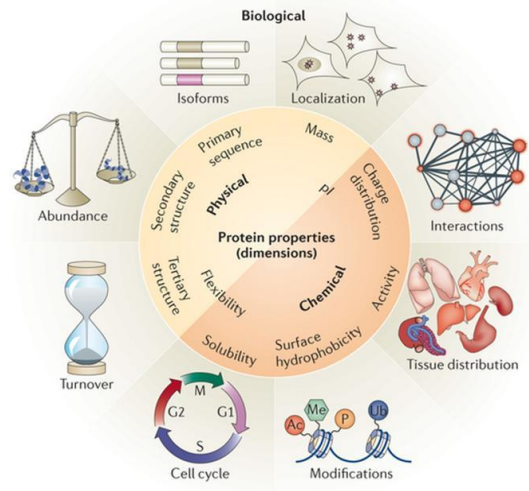


Figura 13. Representació esquemàtica de les diferents propietats que presenten les proteïnes (biològiques, químiques i físiques). Figura original de Larance i Lamond, 2015.

5.2. Definició

El terme *proteoma* fou encunyat per primera vegada l'any 1994 per Marc Wilkins mentre realitzava la seva tesi doctoral (Wilkins, 2009), encara que no va ser fins l'any següent que va emergir a la literatura científica (Wasinger et al., 1995). Des de llavors, han anat apareixent múltiples definicions encara que totes elles enfocades en la mateixa línia. Segons el propi creador, el concepte de *proteoma* es pot definir com el conjunt de totes les proteïnes codificades pel genoma d'un organisme (Wilkins et al., 1996). Aquest, a diferència del genoma, és més dinàmic (figura 14) i sovint més complex ja que, a causa de *splicings* alternatius, MPTs, etc., a partir d'un sol gen es poden sintetitzar més d'una proteïna (Lander et al., 2001; Modrek

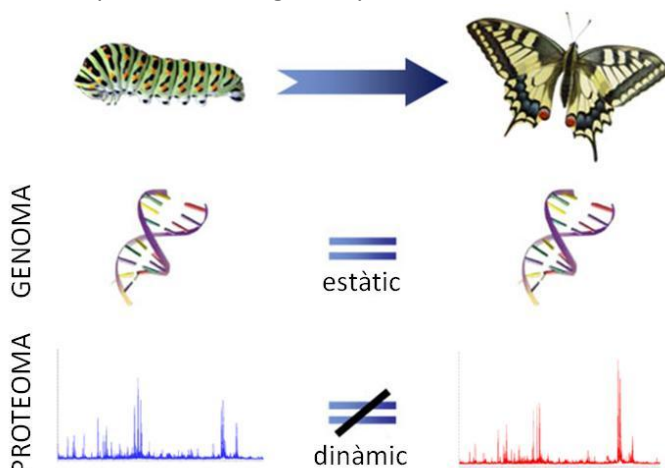


Figura 14. Cicle de vida d'una papallona i l'evolució del proteoma i genoma. Mentre que l'eruga i la papallona posseeixen el mateix genoma, el proteoma varia en funció de la situació biològica i les influències ambientals. Aquest exemple accentua el caràcter dinàmic i complex del proteoma i el paper vital que presenta a nivell biològic. Figura adaptada i modificada de: http://www.gla.ac.uk/media/media_2722_86_en.jpg

i Lee, 2002; Patel et al., 2009). El fet que tots aquests processos es trobin més accentuats en organismes eucariotes podria explicar l'aparent discrepància entre el nombre de gens i la complexitat dels diferents organismes (Graveley, 2001). No fou fins uns anys més tard que aparegué el terme *proteòmica* (Anderson i Anderson, 1998). Anàlogament a la genòmica, la proteòmica es defineix com l'estudi del proteoma, és a dir, l'anàlisi del conjunt de totes les proteïnes presents en un organisme, un teixit, un medi biològic o una cèl·lula en un moment determinat i sota unes condicions concretes (Anderson i Anderson, 1998). Amb la creació de la *Human Proteome Organization* l'any 2002 (Hanash i Celis, 2002) es va començar a estimular més intensament al desenvolupament d'aquesta àrea de coneixement. Els recursos invertits han estat de tal magnitud que en poc més de 10 anys s'han publicat una gran quantitat d'articles científics i s'han obtingut les primeres aproximacions del proteoma humà (Kim et al., 2014; Wilhelm et al., 2014).

La proteòmica permet subministrar una visió global de les interaccions existents entre les xarxes moleculars, així com determinar irregularitats en el nivell d'expressió proteic en diferents malalties; és a dir, pretén obtenir un enfocament complementari a la genòmica, una de les branques més estudiades dintre del camp de les "òmiques". Totes aquestes característiques, juntament amb el seu caràcter dinàmic, fan de la proteòmica una eina atractiva, no només pel diagnòstic i el pronòstic de la malaltia hepàtica, sinó també per la selecció i seguiment del tractament (Asselah et al., 2007). És precisament el seu dinamisme, que l'anàlisi de diferents proteïnes en múltiples fluids biològics ha estat una de les estratègies més emprades en la pràctica clínica per tal de diagnosticar diferents malalties. Tradicionalment, s'han focalitzat els recursos en la determinació d'una o poques proteïnes. Malgrat això, és sabut que les cèl·lules expressen una gran quantitat de proteïnes diferents i, a més a més, cadascuna d'elles pot patir MPTs, fosforilacions, metilacions, ubiquitinacions,

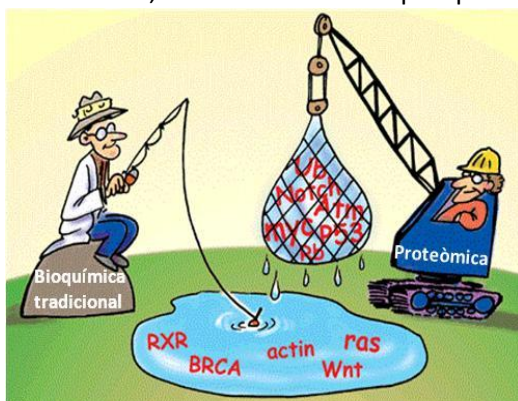


Figura 15. Diferències entre la bioquímica tradicional (anàlisi d'una o poques proteïnes) i la proteòmica (anàlisi global del proteoma). *Figura adaptada i modificada de Fields, 2001.*

proteòlisis, etc. en resposta a diferents estímuls externs i/o interns (Kim et al., 2011; Larance i Lamond, 2015). Així doncs, davant d'una malaltia, les alteracions proteòmiques tant a nivell cel·lular com extracel·lular són múltiples i és per aquest fet que s'ha anat acceptant la possibilitat de determinar també perfils proteics per tal de valorar un major nombre de proteïnes de manera conjunta i obtenir un major rendiment diagnòstic (figura 15) (Hanash, 2003; Marko-Varga et al., 2005).

5.3. Espectrometria de masses

a) Aspectes generals

Un dels mètodes clàssics per tal de separar, identificar i posteriorment quantificar les proteïnes entre individus sans i pacients amb algun tipus de patologia, ha estat el gel d'electroforesi de dues dimensions (Adam et al., 2001; Srinivas et al., 2001). No obstant, aquest tipus d'estratègia presenta certes limitacions. Primerament, existeix una clara dificultat a l'hora de separar proteïnes amb extrems en pes molecular (<10 kDa i >200 kDa) i en punts isoelèctrics (<4 i >10). A més a més, és necessària una gran quantitat de mostra per a l'anàlisi, és poc sensible a l'hora de detectar proteïnes poc abundants i no resol bé les proteïnes hidròfobes (Braun et al, 2007; Rabilloud, 2002). Per acabar, cal destacar també el lent i laboriós procediment, així com la seva poca reproductibilitat i el seu baix rendiment (Magdeldin et al., 2014). Tots aquests factors han comportat que, al llarg dels últims anys, s'hagin anat desenvolupant noves estratègies d'alt rendiment basades en l'espectrometria de masses, les quals han aparegut com a alternatives molt prometedores i s'han tornat indispensables per a l'anàlisi del proteoma (Altelaar et al., 2013). De fet, els avenços tecnològics en aquest camp han jugat un paper cabdal en el seu desenvolupament.

El primer espectròmetre de masses fou desenvolupat per F. W. Aston l'any 1919, el qual es va emprar per mesurar els pesos atòmics elementals i l'abundància natural d'alguns isòtops (Aston, 1919; Griffiths, 2008). Per definició, l'espectròmetre de masses és un instrument analític que permet separar els diferents components d'una mostra gràcies a la relació de la seva massa/càrrega (m/z). Per tal d'aconseguir-ho però, la mostra ha de ser prèviament vaporitzada i ionitzada (Niessen i Falck, 2015). Una de les fortaleces d'aquesta eina és la capacitat de determinar analits de masses molt dispersos i en mostres tant gasoses com líquides o sòlides. No és d'estranyar per tant, que l'espectrometria de masses (MS) s'hagi convertit en una eina fonamental en tot laboratori d'investigació biomèdica. El límit de detecció, la resolució de massa (capacitat de separar ions amb diferències molt petites de m/z), la seva precisió (dispersió dels valors de m/z per a una mateixa proteïna), l'exactitud (certesa en els valors obtinguts de m/z) i el rang de masses (interval de m/z susceptible d'anàlisi) són cinc dels aspectes més emprats per tal d'avaluar la capacitat d'aquests instruments (figura 16).

Existeixen diverses estratègies quantitatives basades en aquest tipus de tecnologia, cadascuna d'elles amb el seu flux de treball (figura 17). Moltes d'elles usen el marcatge de les mostres amb diferents isòtops estables (^2H , ^{13}C , ^{15}N o ^{18}O) per al procés de quantificació (figura

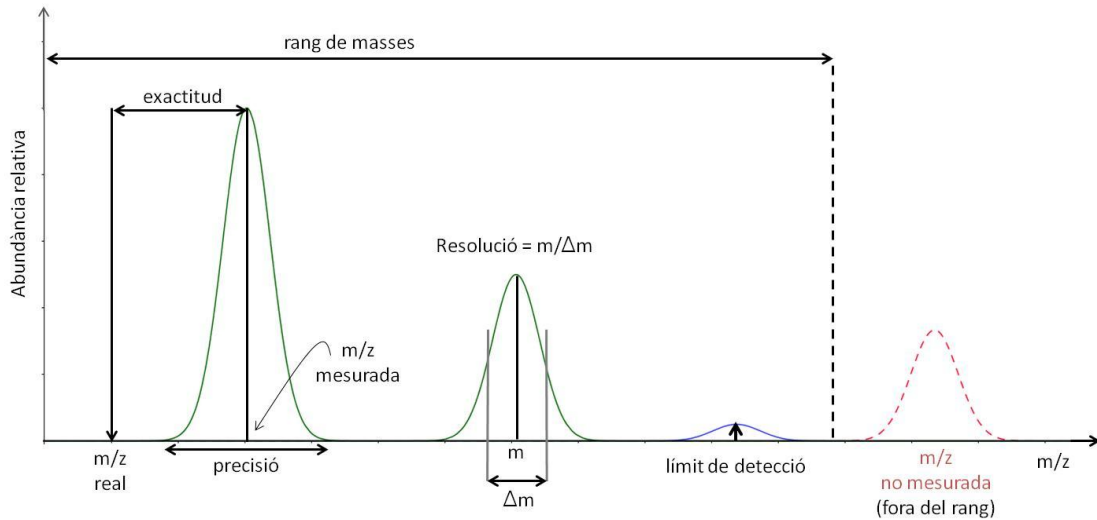


Figura 16. Representació simplificada d'un espectre proteòmic obtingut per espectrometria de masses, i dels diferents paràmetres que defineixen els pics.

17a). Aquest marcatge pot ésser introduït metabòlicament (SILAC) (Ong et al., 2002), a través de pèptids marcats amb isòtops estables (Kuhn et al., 2004) o mitjançant l'addició de pèptids sintètics que serveixin com estàndards interns o externs (Gerber et al., 2003), i permet analitzar diferents mostres de forma conjunta i ser diferenciades posteriorment en l'espectre de masses (Aebersold i Mann, 2003). Posteriorment, també s'ha emprat el marcatge isobàric com a estratègia de quantificació (iTRAQ) (Ross et al., 2004). Actualment però, el nombre màxim de mostres que es poden processar en paral·lel amb aquest tipus de tecnologia es veu limitat pel nombre de marcatges existents (Sandberg et al., 2014). A més a més, la preparació de la mostra és complexa i sovint es produeix un marcatge incomplet de les diferents molècules (Panchaud et al., 2008). Per tal d'eliminar les limitacions mencionades i facilitar la cerca de potencials biomarcadors, s'han anat desenvolupat noves estratègies d'identificació i quantificació proteica lliures de marcatge (*label-free*) (Sandin et al., 2015). Aquests nous mètodes quantitius permeten analitzar, estudiar i comparar un gran nombre de mostres per a un mateix experiment gràcies a l'absència de restriccions de marcatge (figura 17b) (Sandberg et al., 2014). Paral·lelament, s'ha observat que les aproximacions lliures de marcatge presenten un major rang dinàmic i una millor cobertura del proteoma en el procés d'identificació peptídica. Per contra, la seva reproductibilitat i la seva exactitud al quantificar són menors que els mètodes que empen marcatge (Li et al., 2012). És per això que algunes publicacions científiques consideren la combinació d'ambdues estratègies com un recurs interessant per ampliar la cobertura del proteoma gràcies a la seva complementaritat (Megger et al., 2013).

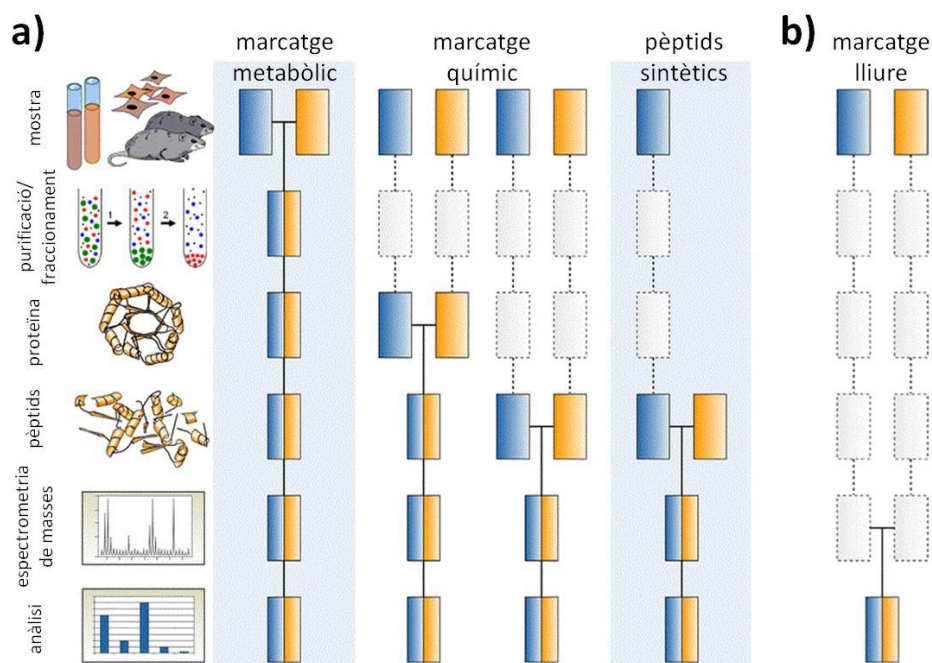


Figura 17. Fluxos de treball de diverses de les estratègies quantitatives amb marcatge (a) o sense (b) i basades en l'espectrometria de masses. Els rectangles blaus i taronges representen condicions experimentals diferents. Les línies horitzontals indiquen quan les mostres són combinades. Les línies discontinuades denoten els punts on es poden produir errors a causa de la variació experimental i, conseqüentment, a la quantificació final. *Figura adaptada i modificada de Bantscheff et al., 2007. Alhora, un dels dibuixos que apareix en aquesta figura és una modificació d'una imatge obtinguda de: <https://en.wikipedia.org/wiki/Fractionation>.*

b) Unitats funcionals

De forma genèrica, es poden diferenciar tres components clarament diferenciats: la font d'ionització, l'anàlitzador de masses i el detector.

i. Font d'ionització

El punt de partida en un anàlisi per espectrometria de masses és la formació d'ions gasosos. Així doncs, la font d'ionització és la part encarregada de volatilitzar i ionitzar els diferents analits que es troben a la mostra. Per tal d'examinar proteïnes, és necessari l'ús de fonts suaus (o toves) ja que permeten ionitzar-les sense causar excessiva fragmentació (Inutan i Trimpin, 2013). En conseqüència, l'espectre de masses resultant sovint consisteix exclusivament en el pic de la proteïna ionitzada. Les fonts d'ionització dures en canvi, impliquen una major energia i comporten la ruptura d'enllaços, els quals produeixen fragments proteïcs ionitzats menors que la de la proteïna original (Niessen i Falck, 2015). Alhora, les fonts d'ionització es poden dividir en dues altres categories: fonts de fase gasosa i fonts de desorció. En el primer cas, la mostra és volatilitzada i posteriorment ionitzada, mentre que en el segon, la mostra, en estat sòlid o líquid, és convertida directament a ions gasosos (Roboz, 2002).

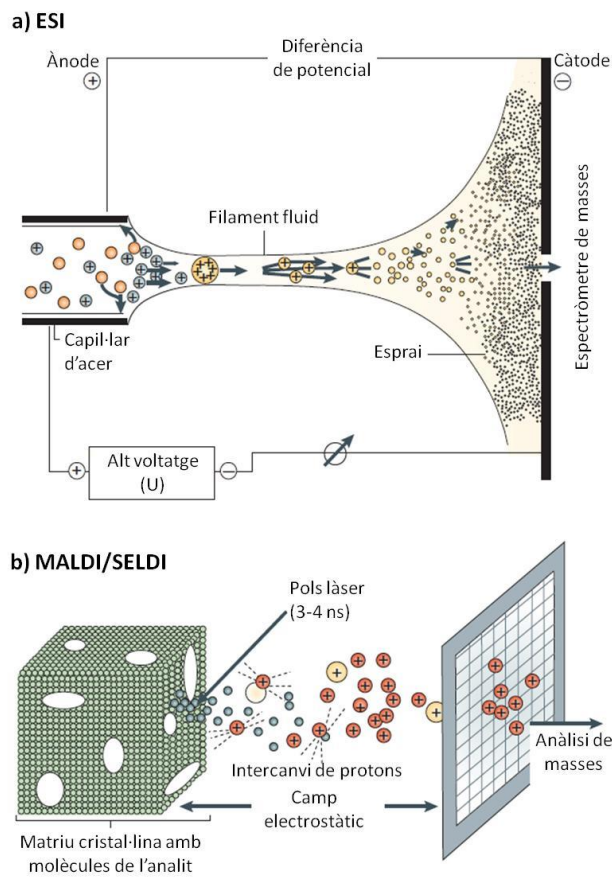


Figura 18. Diferències entre els sistemes d'ionització ESI (a) i MALDI/SELDI (b). *Figura adaptada de Sauer i Kliem, 2010.*

Les dues estratègies més comunes per analitzar pèptids o proteïnes mitjançant MS són la ionització per electroesprai (ESI) i el MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*). Una variant d'aquest últim és el SELDI (*Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization*), el qual també s'ha emprat en l'anàlisi de biomarcadors proteics (Kanmura et al., 2007; Schwegler et al., 2005; Trak-Smayra et al., 2009). Tots tres sistemes són fonts d'ionització suau i de desorció (Niessen i Falck, 2015). L'ESI acostuma a estar acoblat a tècniques de separació cromatogràfiques o electroforètiques i ionitza els analits que es troben en una solució orgànica (figura 18a). Els sistemes MALDI i SELDI en canvi, sublimen i

ionitzen les mostres que es troben en una matriu cristal·lina i seca per mitjà de polsos làser (figura 18b) (Sauer i Kliem, 2010). Les principals funcions d'aquesta matriu és actuar com a solvent de l'analít, absorbir l'energia provinent dels polsos làser i proporcionar els protons necessaris per ionitzar la mostra i poder ésser posteriorment analitzada (Zenobi i Knochenmuss, 1998). Perquè la matriu pugui desenvolupar totes les seves tasques, és necessari que les proteïnes siguin completament solubles en ella. S'ha demostrat que aquest tipus d'ionització és particularment efectiva per analitzar molècules biològiques grans com pèptids i proteïnes. En funció de la complexitat de la mostra es tendeix a usar un sistema d'ionització o un altre. El MALDI-MS i el SELDI-MS acostumen a ser emprats en l'anàlisi de mostres proteiques relativament simples, mentre que el sistema ESI (acoblat a un cromatògraf de líquids) s'usa en mostres peptídiques i més complexes (Aebersold i Mann, 2003). Malgrat això, existeixen diferents estratègies (veure apartat 5.3.c) per tal d'analitzar mostres complexes en sistemes d'ionització com el SELDI o el MALDI.

ii. Analitzador de masses

Mentre que els mètodes d'ionització determinen els tipus de mostres que podran ésser emprades per a l'anàlisi, la combinació de l'analitzador de masses i el detector determinen la qualitat i la fiabilitat de la determinació. L'analitzador de masses és doncs la part central de tot espectròmetre de masses. La seva funció consisteix en separar al buit els diferents ions en funció de la seva relació m/z i dirigir-los al detector (Aebersold i Mann, 2003). Existeixen múltiples analitzadors de masses diferents en funció dels principis físics emprats per tal de separar els diferents ions. Entre ells, és rellevant destacar el quadrupol (Q), el temps de vol (*Time of Flight*; TOF), la trampa iònica (*Ion Trap*; IT) i la ressonància ciclòtrica d'ions amb transformada de Fourier (*Fourier Transform ion cyclotron resonance*; FT-ICR). El rendiment de cadascun d'ells és dispar i es caracteritza per diversos paràmetres. A més a més, cal destacar que la compatibilitat dels analitzadors de masses amb les fonts d'ionització varia. Així doncs, el Q i el TOF acostumen a estar acoblats al MALDI, mentre que el sistema ESI s'acostuma a acoblar a la IT o al triple quadrupol (Aebersold i Mann, 2003). Paral·lelament, s'han dissenyat també instruments que presenten més d'un analitzador de masses (espectrometria de masses en tàndem o MS/MS). Si bé existeixen instruments comercialment disponibles amb tres i quatre analitzadors de masses, generalment acostumen a presentar-ne dos. Alhora, aquests no tenen perquè ser del mateix tipus –espectròmetre de masses híbrid– permetent potenciar les fortaleses de cadascun d'ells i minimitzar les seves limitacions (Glish i Burinsky, 2008). Bàsicament, els experiments realitzats mitjançant MS/MS consisteixen en fer col·lidir un determinat ió amb les molècules d'un gas inert (Ar, He) i, en el segon analitzador de masses, analitzar els fragments resultants en funció de la seva m/z (figura 19). Aquest tipus d'estratègia s'empra enormement per a la seqüenciació i quantificació de pèptids o la identificació de MPTs, entre d'altres (Kim et al., 2014; Gillette i Carr, 2013; Larsen et al., 2006; Wilhelm et al., 2014).

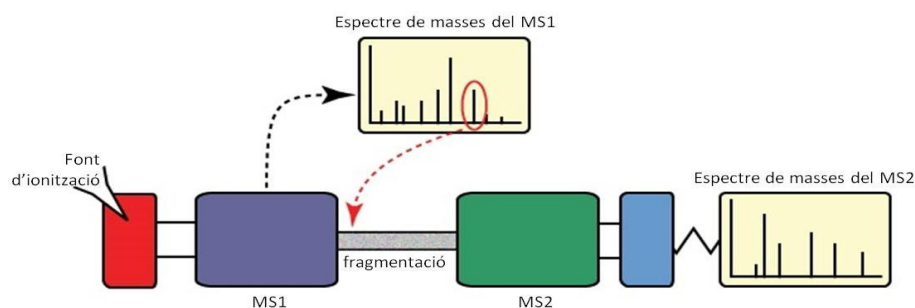


Figura 19. Diagrama de l'espectrometria de masses en tàndem. Un cop la mostra és ionitzada, s'analitza per espectrometria de masses en el primer analitzador (MS1). Dels ions obtinguts a l'espectre, s'escullen selectivament els rellevants i són fragmentats i analitzats en el segon analitzador de masses (MS2). *Figura traduïda de:* https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-mass-spectrometry/jcr_content/MainParsys/image_e43a.img.jpg/1458235771379.jpg

Dos dels analitzadors de massa més emprats són els següents:

- **Analitzador TOF:**

Es tracta d'un dels analitzadors de massa més simples. Un cop la mostra ha estat desorbida i ionitzada de la matriu cristal·lina, els diferents ions generats són accelerats cap al detector mitjançant un camp elèctric. Seguidament, els ions abandonen la zona d'acceleració i es separen en funció de la seva velocitat. Com que totes les molècules ionitzades han rebut la mateixa energia, i aquesta no varia després de l'acceleració a causa d'una manca de camp magnètic i elèctric en el tub de vol, l'energia de totes les partícules és la mateixa. Aquesta característica comporta que, en funció de la relació m/z de cada ió, la velocitat a la que circulen pel tub de vol (de longitud coneguda) sigui diferent (figura 20a) (Hoffmann i Stroobant, 2007). Així doncs, el principi bàsic del TOF consisteix en afirmar que la relació m/z de cada ió es pot determinar en funció de la velocitat a la que circulen pel tub de vol o, el que és el mateix, del temps que tarden en arribar al detector. Físicament:

L'energia d'una partícula carregada en un camp elèctric es pot definir com:

$$E_{pe} = qV \quad (1)$$

On " E_{pe} " és l'energia potencial elèctrica, " q " és la càrrega de l'ió i " V " el potencial.

Alhora, la càrrega de l'ió (q) equival al nombre de protons de l'ió (z) pel valor absolut de la càrrega de l'electró (e):

$$q = ze \quad (2)$$

En el moment que l'ió és accelerat al tub de vol, l'energia potencial és transformada en energia cinètica:

$$E_{pe} = E_c = \frac{1}{2}mv^2 \quad (3)$$

On " m " és la massa de l'ió i " v " la seva velocitat.

Si l'energia cinètica es igual per a tots els ions, es pot comprovar matemàticament com existeix una relació inversament proporcional entre la massa i la velocitat. Els ions que tardin més en arribar al detector (menor velocitat pel "tub de vol") indica que presenten una major massa i viceversa.

Una altra manera de veure la relació entre la m/z i el temps és igualant les equacions (1), (2) i (3). Sabent que $v=L/t$ (on " L " és la longitud del tub de vol i " t " el temps) es pot arribar a la conclusió que:

$$t = k\sqrt{\frac{m}{z}}$$

On " k " és una constant que equival a: $\frac{L}{\sqrt{2V}}$

La resolució dels analitzadors de massa TOF es pot millorar enormement incrementant la llargada del tub de vol (Sato et al., 2005). La principal limitació però, és l'espai que es necessitaria ocupar en el laboratori. Una alternativa per millorar la separació dels ions i alhora no incrementar en espai el tub de vol és l'ús del reflectró (Sato et al., 2005). Aquesta opció consisteix en la introducció de miralls electrostàtics que desvien la trajectòria dels ions i permeten incrementar el seu temps de vol abans d'arribar al detector (figura 20b). El desavantatge principal d'utilitzar la tecnologia de reflectró és una lleugera reducció de la

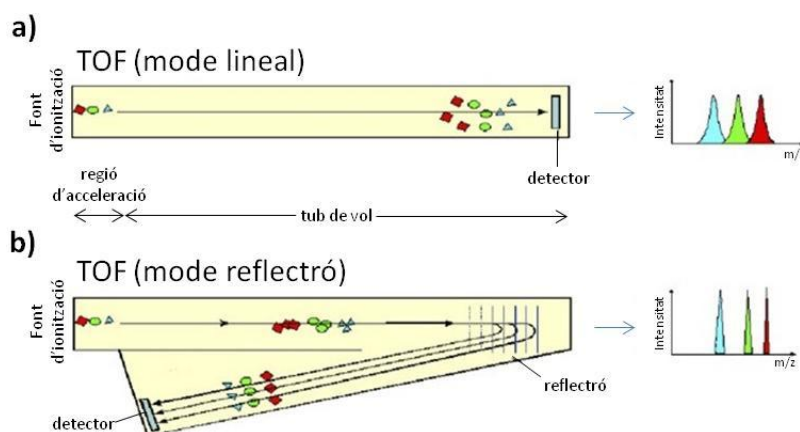


Figura 20. Representació de l'analitzador TOF en mode lineal (a) i en mode reflectró (b). Figura adaptada i modificada de Matharoo-Ball et al., 2008.

sensibilitat a causa de la pèrdua d'ions i a la dispersió del feix d'ions (Radionova et al., 2015). Aquest fenomen es troba accentuat pels ions d'alta massa. És per això que el mode reflectró pot apagar-se quan s'analitzen ions de relació m/z alta i a

molt baixes concentracions i usar el mode lineal. Una altra estratègia per tal d'incrementar la resolució és l'ús de l'extracció iònica retardada (Vanbellingen et al., 2015). Consisteix en dilatar temporalment l'extracció iònica mitjançant el pols làser i el voltatge d'acceleració. Aquest retard de temps comporta que els ions més ràpids es localitzin davant els ions més lents i reduir així la distorsió de la correlació espai/velocitat per col·lisions. El resultat és l'obtenció de pics més estrets, millor definits i amb una major exactitud de la ràtio m/z (Kovtoun i Cotter, 2000).

- Analitzador Orbitrap:

L'analitzador de masses orbitrap fou inventat per Makarov a finals de la dècada dels noranta basant-se en els coneixements aportats per K. H. Kingdon l'any 1923 (Kingdon, 1923; Makarov, 1999). Des de la seva sortida al mercat l'any 2005 (Makarov et al., 2006), l'orbitrap s'ha convertit en un dels analitzadors de masses més utilitzats per a l'anàlisi proteòmic gràcies a la seva gran exactitud de massa i elevada resolució (Scigelova i Makarov, 2006). Estructuralment està format per 3 parts clarament diferenciades: l'elèctrode central, l'elèctrode exterior i l'anell ceràmic (figura 21). Com el seu nom suggereix, és una trampa iònica encara que no de les tradicionals, ja que els ions són retinguts per mitjà d'un camp

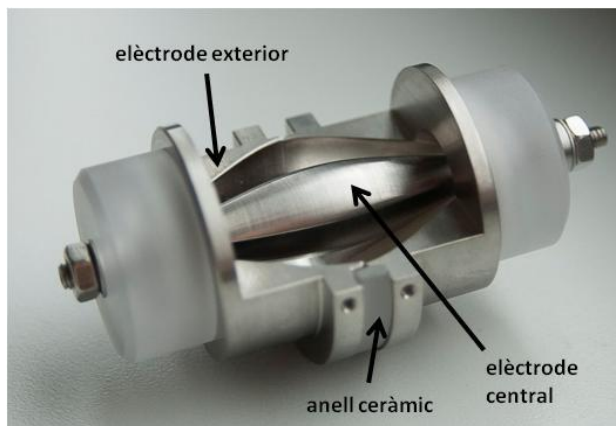


Figura 21. Fotografia transversal de l'analitzador orbitrap. Els ions entren dins l'analitzador i realitzen oscil·lacions harmòniques al voltant de l'elèctrode central. Aquest està recobert per un elèctrode exterior el qual està dividit per la meitat per un anell aïllant ceràmic. *Figura adaptada de: https://en.wikipedia.org/wiki/Ion_trap*

electrostàtic i no pas per radiofreqüències o per imans (Hardman i Makarov, 2003; Makarov, 2000). El principi de l'orbitrap consisteix en afirmar que la relació m/z dels ions es pot determinar a partir de les seves freqüències d'oscil·lació (Ham i MaHam, 2015). Quan s'aplica un voltatge entre els dos elèctrodes, el camp elèctric resultant és completament lineal al llarg de l'eix i es formen oscil·lacions perfectament harmòniques dels ions en aquesta direcció. Alhora, el component radial del camp atrau de forma molt intensa als ions cap a l'elèctrode central. Així doncs, l'atracció electrostàtica existent cap a l'elèctrode central és compensada per la força centrífuga que sorgeix de la velocitat tangencial inicial dels propis ions (Makarov, 2000). El moviment resultant d'aquests al voltant de l'elèctrode central es pot equiparar a l'òrbita d'un planeta al voltant de la seva estrella (Scigelova i Makarov, 2006). Gràcies a un procés matemàtic denominat transformada de Fourier, es converteixen les diferents freqüències a valors m/z i les seves amplituds a intensitats obtenint així l'espectre de masses final (Marshall i Verdun, 1990). Aquestes freqüències d'oscil·lació es poden relacionar amb la relació m/z de cada ió:

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

On " ω " és la freqüència angular de l'ió i " k " és una constant instrumental.

L'analitzador orbitrap es caracteritza per tenir un extraordinari poder de resolució (arribant a 1.000.000) així com una exactitud de massa de fins a 1 ppm (Bishop et al., 2013; Denisov et al., 2012). Malgrat això, aquestes propietats es veuen minvades a mesura que incrementa la relació m/z (Scigelova i Makarov, 2006). Un altre aspecte rellevant a destacar és que el poder resolutiu d'aquest analitzador es correlaciona proporcionalment amb el temps d'anàlisi. Per tant, en determinacions de mostres complexes aquests paràmetres és tornen crítics ja que s'ha d'arribar a un equilibri entre la minimització del temps d'anàlisi i la maximització de la resolució. En termes pràctics però, una resolució de 60.000 acostuma a

comportar un temps d'anàlisi suficientment reduït com per ésser compatible amb escales de temps de nano-LC (Scigelova i Makarov, 2006).

iii. Detector

Un cop les molècules ionitzades travessen l'analitzador de masses, impacten en el detector. Normalment els espectròmetres empren el detector de multiplicador d'electrons o el de placa de microcanals, que emeten una cascada d'electrons quan el ió colpeja la placa del detector (Finehout i Lee, 2004). Per tal de millorar la sensibilitat, aquesta cascada comporta l'amplificació de cada ió en $10^6/10^8$ (Koppelaar et al., 2005). A més a més, tot el procés es realitza en buit (10^{-6} a 10^{-8} torr) per eliminar les molècules de gas i possibles ions contaminants que no formen part de la mostra (Bakhtiar i Tse, 2000; Hoffmann i Stroobant, 2007).

c) Pretractament de la mostra

La identificació de biomarcadors altament sensibles és fonamental per tal de detectar l'inici, el pronòstic o la progressió de qualsevol malaltia. A més a més, la seva posterior validació és un dels aspectes claus en tot estudi proteòmic (Hernández et al., 2014). Les mostres biològiques emprades a l'hora d'abordar aquesta fita són diverses i presenten concentracions i composicions proteiques clarament dispars (Boschetti et al., 2012). Així doncs, i en funció del tipus de mostra biològica, abans d'iniciar l'anàlisi proteòmica pot ésser necessari el seu tractament previ per incrementar les possibilitat d'identificació de biomarcadors específics de la malaltia en qüestió. El sèrum i el plasma acostumen a ser les mostres biològiques més usades per a detectar biomarcadors de diagnòstic, ja que quasi la totalitat de les cèl·lules de l'organisme comuniquen amb el torrent sanguini i moltes d'elles alliberen part del seu contingut a la sang davant d'un dany o de mort cel·lular. Per tant, presenten una informació del proteoma molt completa des d'un punt de vista clínic (Anderson et al., 2004). Si bé l'obtenció de sèrum o plasma és senzilla i no invasiva, la seva anàlisi proteòmica és extremadament complexa (Veenstra et al., 2005). En concret, el sèrum conté al

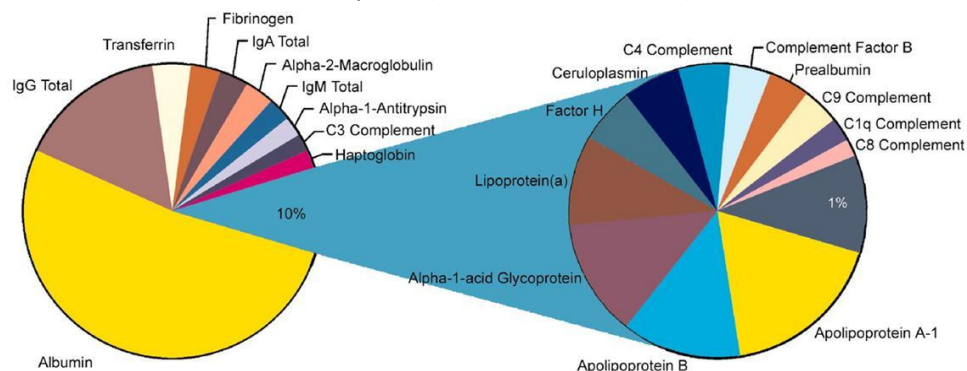


Figura 22. Representació gràfica de la distribució relativa de les proteïnes plasmàtiques. Figura original obtinguda de la imatge de portada de *Proteomics* (2003), 2(10); la qual està basada en l'article de Tirumalai et al., 2003.

voltant d'uns 60-80 mg de proteïna per cada mL, a més a més de lípids, electròlits, sals, metabòlits, etc. (Chan et al., 2004). Del total proteic, el 99% corresponen a 22 proteïnes, essent l'albumina la que té una major presència (figura 22) (Anderson i Anderson, 2002). Només el 1% restant de tot el contingut proteic en sèrum està format per proteïnes de baix pes molecular però de gran interès en la cerca de biomarcadors (Tirumalai et al., 2003). Aquesta situació demostra l'elevat rang dinàmic proteic existent en aquestes mostres biològiques (Hortin i Sviridov, 2010; Mitchell, 2010) i l'emascament que les proteïnes majoritàries efectuen cap a les menys abundants. Per intentar reduir tal complexitat, el proteoma de les diferents mostres biològiques pot ésser simplificat per diferents estratègies (figura 23). Malauradament, la probabilitat de descartar algunes de les proteïnes poc abundants del sèrum quan s'eliminen les proteïnes majoritàries és alta en qualsevol dels mètodes de separació (Adkins et al., 2002). Com s'ha mencionat anteriorment, l'albumina és la proteïna més abundant en sèrum i alhora una de les proteïnes de transport més importants. Per aquest motiu, l'eliminació d'aquesta proteïna del sèrum comporta també la pèrdua dels diferents compostos units a ella com són hormones, lípids, aminoàcids, etc. De tots ells, uns dels que presenta major interès són les citoquines (Granger et al., 2005). Alhora, existeix també la possibilitat d'eliminar algunes proteïnes inespecífiques en funció del mètode de depleció emprat.

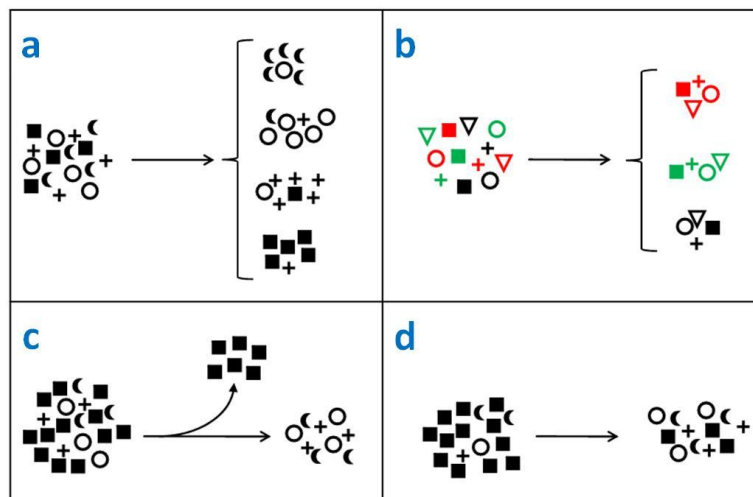


Figura 23. Estratègies més comunes de pretractament de la mostra. a) Separació de les proteïnes en funció del seu pI. b) Segregació de les proteïnes per grups d'acord amb la seva afinitat pels lligands usats en la columna. c) Eliminació de les proteïnes majoritàries per mitjà d'anticossos. d) Reducció del rang dinàmic proteic mitjançant llibreries peptídiques. *Figura original obtinguda de Boschetti et al., 2012.*

5.4. Aproximacions proteòmiques

Donades les múltiples opcions tècniques disponibles per a l'anàlisi del proteoma, han sorgit diverses estratègies generals per a la identificació i quantificació de proteïnes (figura 24):

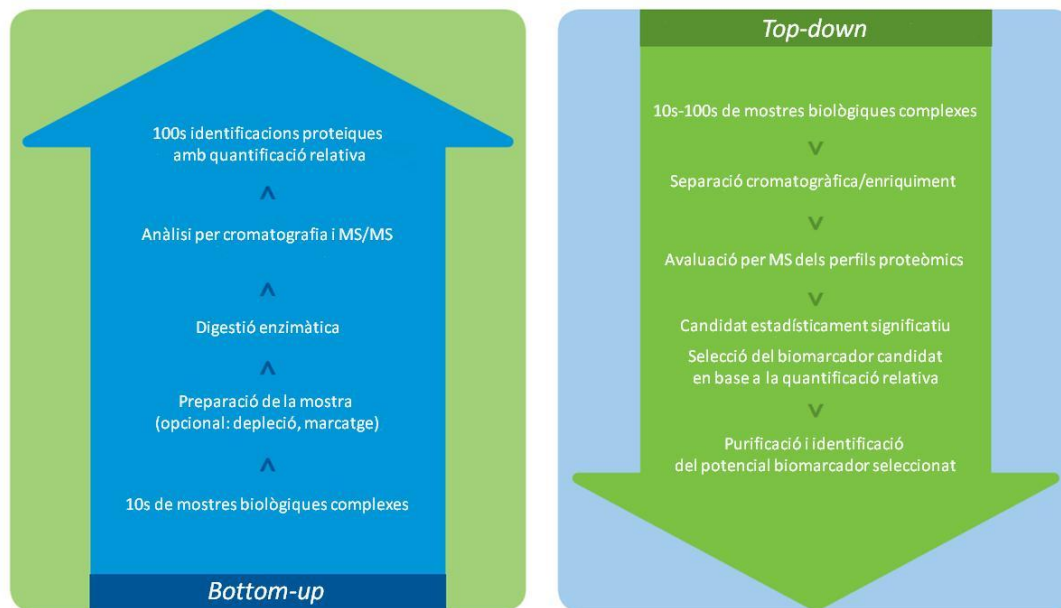


Figura 24. Flux de treball genèric de l'estratègia *bottom-up* i *top-down* per a l'estudi proteòmic. Figura traduïda de: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5908A.pdf

a) *Bottom-up*

Aquesta aproximació és la més popular per tal d'abordar i analitzar a gran escala les mostres més complexes. L'estratègia *bottom-up* és un enfocament on les proteïnes es digereixen proteolíticament en pèptids abans de l'anàlisi per espectrometria de masses mitjançant un enzim proteolític –usualment la tripsina–, el qual escindeix en llocs perfectament definits i crea una mescla peptídica complexa. Les mostres digerides són posteriorment separades i analitzades per cromatografia de líquids i espectrometria de masses en tàndem, respectivament. Així doncs, la instrumentació emprada per aquest tipus d'estratègia ha d'ésser potent i amb una alta resolució (Han et al., 2008). Les seqüències obtingudes i les masses determinades dels pèptids resultants s'usen per tal d'identificar les proteïnes corresponents (Gygi et al., 1999; Thompson et al., 2003). Si bé aquest tipus d'enfocament ha demostrat ser útil per a l'avaluació i la identificació d'una gran quantitat de proteïnes, no està lliure d'inconvenients. A causa de l'exhaustiu anàlisi de cada mostra, el rendiment de la tècnica és baix i s'acostuma a emprar un nombre petit de mostres. A més a més, es fa difícil l'anàlisi de les diferents MPTs de la proteïna (Yates et al., 2009). Per altra banda, cal tenir en consideració que una de les limitacions intrínseques d'aquest tipus d'estratègia és el baix percentatge de cobertura de caracterització que presenta la proteïna detectada. Això és degut a que tan sols una petita fracció dels fragments proteolítics és recuperada després de la digestió (Zhang i Ge, 2011). Conseqüentment, la identificació de proteïnes de baix pes molecular es converteix en quelcom complex.

i. LTQ-Orbitrap

L'anàlisi de mostres complexes formades per mescles peptídiques requereix d'instruments extremadament sensibles i amb una capacitat de detecció ràpida (Mann i Kelleher, 2008). En aquest context, l'espectrometria de masses és l'única eina capaç de complir amb els requeriments necessaris (Aebersold i Mann, 2003; Han et al., 2008). Dels diferents tipus existents que segueixen l'estratègia *bottom-up*, l'orbitrap s'ha imposat com una de les plataformes tecnològiques més interessants per abordar l'anàlisi i cerca de potencials biomarcadors en diverses malalties (Domon i Aebersold, 2006; Scigelova i Makarov, 2006). Des del seu llançament fa una dècada (Makarov et al., 2006), ha anat evolucionant i millorant les seves prestacions. Un dels més coneguts i emprats en el món de la proteòmica és el LTQ-Orbitrap (Kalli et al., 2013). Es tracta d'un espectròmetre de masses híbrid que conté dos analitzadors de massa (la trampa d'ions lineal i l'orbitrap) capaços de detectar, identificar i quantificar ions. En funció de les necessitats i requeriments de l'anàlisi, ambdós analitzadors poden funcionar de forma independent o en tàndem (Scigelova i Makarov, 2006). Tot i que és possible fragmentar els ions a l'orbitrap, és molt més pràctic i ràpid manipular-los en l'altre analitzador de masses i posteriorment transferir-los a l'orbitrap (Scigelova i Makarov, 2006).

Bàsicament, el LTQ-Orbitrap presenta 3 seccions clarament diferenciades (figura 25). Un cop els ions s'han separat per cromatografia i s'han ionitzat a la font d'ionització, la primera part consta d'una trampa d'ions lineal capaç de detectar espectres de massa MS i MS^n amb una elevada sensibilitat però amb una resolució i exactitud de massa baixes. Posteriorment, els ions són transferits a una trampa d'ions corba (*C-trap*) on s'acumulen i es reserven per a ésser finalment enviats a l'última part del sistema; l'orbitrap (Scigelova i Makarov, 2006). Un aspecte interessant de la *C-trap* és la seva capacitat de fragmentar els ions a través de la dissociació induïda per col·lisió (Olsen et al., 2007). Finalment, l'orbitrap rep els diferents ions de la *C-trap* per posteriorment detectar-los amb elevada resolució i precisió.

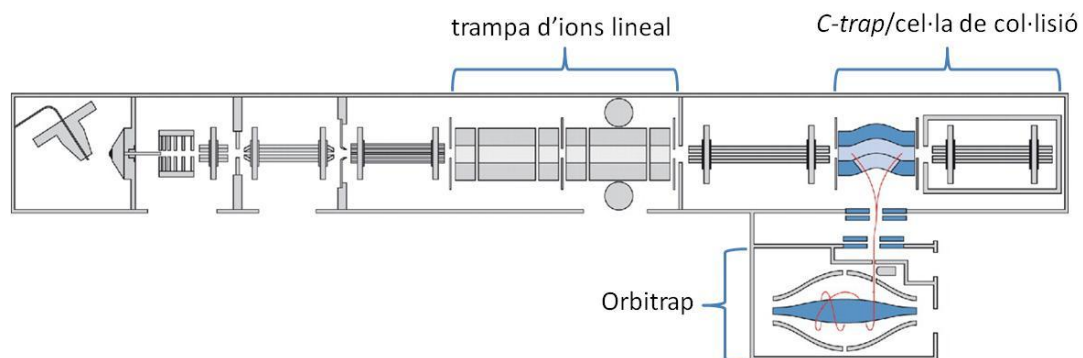


Figura 25. Representació esquemàtica del LTQ-Orbitrap. Es destaquen 3 de les parts més rellevants de l'instrument. *Imatge modificada de Olsen et al., 2009.*

Una de les clares avantatges que presenta aquesta plataforma és la seva adaptabilitat per acoblar-se a diferents equips de cromatografia (Peterson et al., 2010; Wang et al., 2014), els quals permeten simplificar enormement l'anàlisi i poder estudiar una gran varietat de mostres biològiques com són el plasma, sèrum, orina, lisi cel·lular o teixit, entre d'altres (Casado et al., 2014; Dunn et al., 2008; Herebian et al., 2010; Hsu et al., 2015; Kenny et al., 2010). A més a més de la seva elevada sensibilitat, resolució i precisió de massa, aquest tipus de plataforma permet identificar i quantificar pèptids amb certa rapidesa (Sun et al., 2013). Tanmateix, presenta algunes limitacions destacables. Primerament, el maneig de dades posterior a l'anàlisi acostuma a ésser laboriós, feixuc i lent (Walther et al., 2010). Alhora, és incapaç d'analitzar tots els pèptids observats a la mostra, fet que comporta una certa irreproductibilitat entre els experiments (Olsen et al., 2009). Per altra banda, té associats uns elevats coeficients de variació a causa dels diferents pretractaments de la mostra (extracció i digestió) així com la pròpia variància instrumental (Piehowski et al., 2013). No es pot obviar que es tracta d'instruments costosos i que es requereix de personal amb una dilatada formació i experiència per poder-los utilitzar correctament. Finalment, cal tenir en compte que, amb independència de les anàlisis, aquest tipus de tecnologia és molt delicada i difícil de mantenir (Karch et al., 2014). Tot i aquests inconvenients però, el LTQ-Orbitrap és un dels espectròmetres de massa més emprats en el camp de la proteòmica gràcies a les seves prestacions i a l'avantatge tecnològic que presenta envers molts dels seus competidors a l'hora d'analitzar mostres d'elevada complexitat (Eliuk i Makarov, 2015).

b) *Top-down*

L'aproximació *top-down* es basa en la separació de les proteïnes d'una mostra biològica sense fer ús de la digestió proteolítica. Gràcies a la detecció de forma directa de la massa molecular global de cadascuna de les diferents proteïnes, aquesta estratègia presenta certs avantatges respecte l'aproximació anterior. Primerament, permet obtenir una major cobertura de les proteïnes diana (Kelleher et al. 1999) i una millor caracterització de les potencials MPTs (Siuti i Kelleher, 2007; Tran et al., 2011; Zabrouskov et al., 2006). Un altre aspecte a destacar respecte el mètode *bottom-up* és la millor fiabilitat pel que fa a la quantificació proteica, ja que l'abundància proteica és mesurada directament i no a través del nombre de pèptids generats (Du et al., 2006; Pesavento et al., 2006). Per altra banda, aquesta estratègia permet l'anàlisi d'una gran quantitat de mostres en poc temps (anàlisi d'alt rendiment), fet que li permet abordar qüestions clíniques que requereixin d'un nombre elevat de mostres. Un clar exemple seria el de la cerca de potencials biomarcadors de malaltia tant en mostres humanes com de les obtingudes per models animals. Malgrat el mencionat, és especialment útil pel primer grup,

ja que és precisament en humans on s'ha de compensar la major variabilitat pacient-pacient i poder generar resultats amb suficient poder estadístic per avaluar amb precisió el valor predictiu dels potencials biomarcadors. No obstant, i com tota estratègia, no està lliure d'inconvenients. Primerament, la separació de proteïnes intactes presenta una elevada dificultat tècnica i sovint aquest tipus d'estratègies s'ha vist limitat a l'anàlisi de proteïnes en mostres de poca complexitat (Armirotti i Damonte, 2010). Una alternativa però, és la realització d'un preprocessament de la mostra per a simplificar-la (veure apartat 5.3.c). Per altra banda, si s'analitzen les proteïnes mitjançant cromatografia de líquids, l'anàlisi també es complica. A diferència dels pèptids, que són més solubles, les proteïnes són generalment insolubles i el seu major pes molecular comporta unions irreversibles amb la fase estacionària de la columna de fase reversa C_4 (Armirotti i Damonte, 2010). Finalment, els instruments emprats en aquest tipus d'estratègia sovint presenten una baixa sensibilitat (Pamreddy i Panyala, 2016) i el nombre d'eines informàtiques per gestionar i interpretar les dades obtingudes és limitat, essent en l'estratègia de *bottom-up* una de les seves principals fortaleeses (Armirotti i Damonte, 2010).

i. SELDI-TOF MS

La cerca de nous biomarcadors requereix d'una tecnologia que permeti un mecanisme de cribatge sensible, reproduïble i amb un elevat rendiment (*high-throughput*). Tenint present la gran variabilitat que existeix entre pacients, és rellevant complir amb aquestes característiques per tal d'avaluar un gran nombre de mostres i així incrementar la fiabilitat de l'anàlisi. Una de les estratègies que presenta els requisits necessaris per a ésser una bona estratègia de cerca de biomarcadors és la tecnologia SELDI-TOF MS. Introduïda l'any 1993 per Hutchens i Yip (Hutchens i Yip, 1993), es tracta d'una variació del MALDI-TOF MS que combina la cromatografia de retenció selectiva amb l'analitzador de masses TOF (Roboz, 2008). Precisament una de les seves característiques diferencials és l'ús de xips –o *arrays*– amb superfícies modificades que permeten la interacció selectiva amb un determinat tipus de proteïnes (figura 26a). Existeixen diversos tipus d'*arrays* amb diferents espècies químiques adherides a la seva superfície. En funció del tipus escollit, aquest interactuarà amb un grup específic de proteïnes i només aquestes quedaran retingudes per posteriorment ésser analitzades (figura 26b) (Vorderwülbecke et al., 2005). Alguns dels *arrays* més emprats són els següents (Devajaran i Ross, 2009):

- CM10: Incorpora àcids carboxílics derivatitzats a la seva superfície que actuen com un bescanviador de cations dèbil i interactuen amb residus amb càrrega positiva com ara els de lisina, histidina o arginina.

- Q10: La superfície es troba carregada positivament amb grups d'amoni quaternari per interactuar de forma electrostàtica amb residus que presenten càrrega negativa com els de l'àcid aspàrtic i el glutàmic.
- IMAC30: A la seva superfície hi ha adherits grups d'àcid nitriltriacètic els quals formen complexos octaèdrics estables amb ions metàl·lics polivalents (Ga^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}). Un cop la superfície s'ha activat amb el ió metàl·lic desitjat, el complex format interactua amb determinats aminoàcids com la histidina, la cisteïna, el triptòfan o amb aminoàcids fosforilats.
- H50: Conté grups de cadenes carbonades de longituds variables (C_6 - C_{12}) que li permeten interactuar amb residus hidrofòbics d'alanina, valina i leucina, entre d'altres.
- NP20: és dels *arrays* menys selectius. A la superfície es troben adherits molècules d'òxid de silici que li permeten interactuar majoritàriament amb aminoàcids que presentin residus hidrofílics o amb certa càrrega.

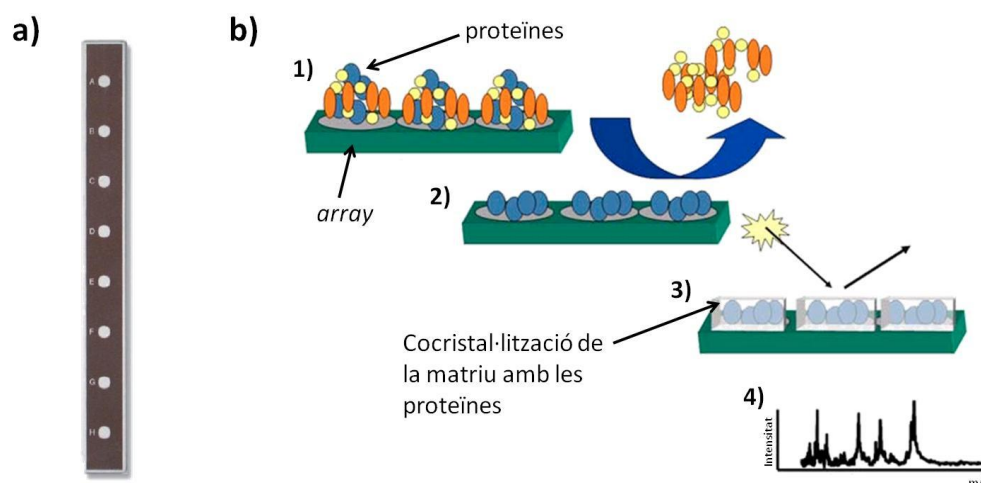


Figura 26. Imatge d'un *array* (a) i esquema del procés de preparació de la mostra i del seu anàlisi per mitjà del sistema SELDI-TOF MS (b). El passos a seguir són els següents: 1) La mostra s'aplica a l'array. 2) Seguidament, les proteïnes que interactuen amb la superfície queden retingudes (en blau) mentre que les inespecífiques són descartades (groc i taronja). 3) Finalment, s'aplica la matriu que cocristal·lització de la matriu amb les proteïnes. 4) Per mitjà d'un pols làser, les proteïnes es desorbeixen i es ionitzen per ésser finalment detectades per espectrometria de masses (4).

Figura adaptada i modificada de: <http://urology.jhu.edu/research/img1/proteomics13.jpg>

La imatge de l'array s'ha obtingut de: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsl/literature/Bulletin_5524.pdf

Encara que els mencionats són els més emprats, la superfície dels xips es pot modificar o funcionalitzar amb anticossos, altres proteïnes o fins i tot amb ADN (Devajaran i Ross, 2009). A més a més d'aquesta característica intrínseca de la tecnologia SELDI-TOF MS, existeixen altres trets singulars que la diferencien de la seva tècnica germana (Vorderwülbecke et al., 2005). Primerament, en el MALDI, la mostra és barrejada amb la matriu orgànica i només una petita quantitat d'aquesta mescla és posteriorment dipositada a la superfície del *array*. Per contra, en

el SELDI-TOF MS, la matriu és introduïda directament a la superfície de l'*array* on es troben les proteïnes unides i tota la mescla és seguidament analitzada. Com s'ha comentat a l'apartat 5.3.b.i., la matriu juga un paper clau en el procés de desorció i ionització. De fet, és la responsable d'absorbir l'energia provinent dels polsos làser i també s'encarrega de preservar la mostra un cop està cocrystal·litzada amb ella (Zenobi i Knochenmuss, 1998). Existeixen múltiples tipus de matrius en funció del rang de masses a determinar. Les tres més comunes són les següents (Buhimschi, 2012; Dijkstra et al., 2006):

- α -ciano-4-hidroxicinàmic: presenta una ionització eficient per proteïnes inferiors als 10-15 kDa.
- àcid sinapínic: permet una desorció i ionització eficient en proteïnes superiors als 9-10 kDa
- EAM-1: aquesta formulació, registrada per Bio-Rad, presenta una bona eficiència en proteïnes entre els 10 kDa i els 50 kDa.

Una de les clares avantatges de la tecnologia SELDI-TOF MS és la seva adaptabilitat per poder avaluar una gran varietat de mostres biològiques (Xiao et al., 2005). Mitjançant aquesta tecnologia s'han pogut analitzar fluids tan diversos com el plasma, sèrum, orina, saliva, fluid amniòtic i el líquid cefaloraquídi, així com extractes cel·lulars i teixits entre d'altres (Ardito et al., 2016; Gallo et al., 2016; Gonçalves et al., 2008; Kelly et al., 2012; Li et al., 2013; Liu et al., 2014; Marfà et al., 2016; Vinther-Jensen et al., 2015). En alguns d'aquests fluids, com és el cas del sèrum o el plasma, és recomanable emprar procediments de fraccionament per tal de reduir el rang dinàmic de la mostra i incrementar la sensibilitat de l'anàlisi (veure apartat 5.3.c) (Jiang et al., 2008; Luque-Garcia i Neubert, 2007). Alguns dels inconvenients associats a aquest procediment però, estan relacionats amb la reducció del seu rendiment per l'increment de la duració de l'anàlisi així com per la disminució de la reproductibilitat (De Bock et al., 2010). L'ús de robots automatitzats pot minimitzar tant la durada del protocol com millorar la seva reproductibilitat. Un altre avantatge important del SELDI-TOF MS és l'elevat rang de massa que avarca. Si bé és més sensible en l'anàlisi de proteïnes amb un pes inferior als 20 kDa, permet detectar nivells d'expressió proteica relativa des dels 2 kDa fins als 200 kDa (Ndao et al., 2010; Wood et al., 2010). A més a més, el SELDI-TOF MS es caracteritza pel seu elevat rendiment. Amb un petit volum de mostra (Hamilton i Langford, 2013), és capaç d'analitzar un gran nombre de mostres en un curt espai de temps. Finalment, les interferències per sals i detergents poden ésser eliminades mitjançant rentats i no afectar a les determinacions finals (Vorderwülbecke et al., 2005).

Una de les majors limitacions que presenta aquesta tecnologia és la baixa resolució i la poca precisió i exactitud de massa en comparació amb altres espectròmetres de massa (De

Bock et al., 2010). Ahora, les intensitats dels pics proteics presenten un coeficient de variació que pot sobrepassar el 30% (Diao et al., 2011). Un dels aspectes rellevants que pot afectar a la variabilitat dels espectres de massa obtinguts per SELDI-TOF MS és el que es coneix com a supressió de ions (De Bock et al., 2010). Durant el procés d'ionització mitjançant el pols làser, els analits competeixen pels protons que transfereixen les molècules de la matriu. Si un analit que es troba protonat xoca amb un de no protonat que té més basicitat, pot haver-hi una transferència del protó cap a ell. Aquest efecte comporta que només s'acabi detectant l'analit protonat més bàsic i no pas el que originàriament estava protonat. Per tant, aquesta competència pot comportar que determinats analits redueixin la intensitat final d'uns altres. Paral·lelament, proteïnes amb una baixa afinitat per la matriu però presents en gran quantitat poden presentar una intensitat de pic similar a aquelles amb alta afinitat per la matriu però amb baixa concentració. Així doncs, la intensitat dels pics no només depèn de la concentració individual de cada proteïna sinó d'altres aspectes com la seva estructura, interaccions, o factors ambientals com la humitat, temperatura, etc. (Cohen i Chait, 1996; Jock et al., 2004; West-Nørager et al., 2007). Per compensar aquesta variació sistemàtica i reduir al màxim el CV entre mostres o entre experiments realitzats en diferents dies, és necessari l'anàlisi de replicats, l'ús d'un elevat nombre de mostres, la determinació del temps de secat de la matriu orgànica i la normalització dels espectres de massa per mitjà del TIC (*Total Ion Current*) (Aivado et al., 2005; Diao et al., 2011; Hong et al., 2005; Rollin et al., 2007). Ahora, només les grans diferències proteïques entre grups s'han de tenir en consideració per poder-les estimar com a potencials biomarcadors.

Finalment, i tenint present que el SELDI-TOF MS no és capaç d'identificar proteïnes de forma directa, és inevitable l'ús d'espectròmetres de massa d'alta resolució i amb més exactitud de massa per realitzar aquesta anàlisi (Ndao et al., 2010). Previ a la identificació, és necessari un procés d'enriquiment i purificació de la proteïna per mitjà de procediments cromatogràfics i electroforesi en gel que acostuma a ser intens, laboriós i tediós (De Bock et al., 2010). Tot i això, la combinació del SELDI-TOF MS –per tal d'obtenir de forma ràpida els perfils proteòmics de diferents grups i detectar les potencials proteïnes diferencials entre ells– i el MALDI-TOF MS –per identificar les proteïnes en qüestió– s'ha descrit com una estratègia molt atractiva per a la correcta identificació i validació de potencials biomarcadors de malaltia (Novikova et al., 2006; Ndao et al., 2010).

OBJECTIUS

La fibrosi hepàtica es caracteritza per ser un procés dinàmic, en el qual es troben implicats múltiples mecanismes moleculars i cel·lulars que donen lloc a una activació crònica del remodelament i la reparació tissular (Bataller i Brenner, 2005). Com s'ha comentat amb anterioritat, existeixen diversos orígens causants d'aquest procés, encara que tots ells presenten característiques patològiques i mecanismes fisiopatològics comuns (Vargas-Blasco, 2004). En un inici es pensava que el procés fibròtic era irreversible, però actualment existeixen nombroses evidències que indiquen la seva potencial reversibilitat, fins i tot en fibrosi avançada i en estadis inicials de cirrosi (Benyon i Iredale, 2000; Marcellin et al., 2013). Tot i això, identificar l'aparició del procés fibròtic en els seus inicis pot permetre delimitar precoçment les decisions clíniques a seguir i minimitzar possibles complicacions futures en els pacients amb una malaltia hepàtica crònica. La biòpsia ha estat el mètode de referència per a determinar el grau de fibrosi hepàtica (Mani i Kleiner, 2009; Mehta et al., 2009). Malgrat això, aquest procediment presenta clars inconvenients que han empès a investigar noves estratègies alternatives. Una d'elles, ha estat la cerca de nous marcadors biològics no invasius relacionats amb el diagnòstic, pronòstic i seguiment de la malaltia. Malauradament, la majoria dels múltiples estudis realitzats fins al moment presenten certes limitacions, no només en el procés de validació, sinó també en la seva capacitat diagnòstica i pronòstica en els inicis del procés fibrogènic (Baranova et al., 2011; Castera i Pinzani, 2010; Sebastiani, 2012). Per tant, la detecció inicial de fibrosi continua essent un desafiament en el camp de la malaltia hepàtica. Un dels factors que dificulta aquesta cerca és la lenta progressió de la malaltia hepàtica així com la seva asintomatologia en els seus estadis inicials. L'ús de models *in vivo* o de mostres de pacients amb unes característiques clíniques particulars semblen ser dues estratègies interessants per fer front a aquest repte.

Considerant, com a **hipòtesi general** de l'actual tesi doctoral, que existeix un perfil proteòmic sèric diferencial entre els diversos estadis de la fibrosi hepàtica, **l'objectiu principal** de la present fou:

- Cercar nous biomarcadors de fibrosi hepàtica més específics i amb un major poder diagnòstic, mitjançant l'ús de tècniques proteòmiques.

Per abordar-lo, es van realitzar dos estudis independents i ben diferenciats, els objectius concrets dels quals foren:

Objectius específics del primer treball:

- Trobar, per mitjà d'eines bioinformàtiques, l'existència d'un patró proteic sèric diferencial entre els estadis de la fibrosi i cirrosi hepàtica en rates tractades amb CCl₄.

- Identificar biomarcadors de fibrosi i cirrosi hepàtica en el proteoma sèric de rates tractades amb CCl₄ i amb diferents graus de severitat de la malaltia.
- Validar els potencials biomarcadors no invasius per tècniques d'immunoassaig en un grup major d'animals.

Objectius específics del segon estudi:

- Detectar perfils proteòmics diferencials, mitjançant espectrometria de masses, entre els pacients fibròtics i els individus sans.
- Identificar biomarcadors circulants específics de fibrogènesi hepàtica inicial en pacients fibròtics.
- Validar el potencial biomarcador en un grup major de pacients amb un procés fibrogènic actiu.
- Determinar els possibles mecanismes implicats en la regulació del biomarcador identificat.

RESULTATS

1r article.

SIPA1L1 és un biomarcador precoç de fibrosi hepàtica en rates tractades amb CCl₄

Determinar el grau de fibrosi hepàtica ha estat i segueix sent una necessitat de primer ordre, no només per definir el pronòstic del pacient, sinó també per conèixer la seva progressió i poder delimitar les decisions clíniques a seguir. El mètode de referència per tal d'avaluar-lo ha estat, fins al moment, la biòpsia hepàtica (Mani i Kleiner, 2009; Mehta et al., 2009). No obstant, presenta clares limitacions gens menyspreables que han empès a la cerca d'altres estratègies menys invasives i amb menors complicacions per als pacients. Malauradament, la majoria d'aquestes alternatives es limiten a la detecció de fibrosi hepàtica moderada/avançada i cirrosi, i continua havent-hi incertesa en la detecció dels estadis inicials de la malaltia (Baranova et al., 2011). La dificultat rau, en part, a la lenta progressió del procés fibròtic i a la seva asintomatologia als seus inicis (Hannivoort et al., 2012). L'ús de models animals és una estratègia interessant per poder compensar les limitacions mencionades, car permeten l'obtenció de mostres perfectament definides i caracteritzades en els diferents punts de l'evolució de la malaltia hepàtica (Clària i Jiménez, 2005). Alhora, la seva combinació amb diferents estratègies proteòmiques representa una aproximació molt valuosa per tal d'identificar nous potencials biomarcadors de fibrosi i cirrosi hepàtica amb major poder diagnòstic.

En aquest primer estudi, es va fer ús del model *in vivo* d'inducció de fibrosi mitjançant l'administració crònica de CCl₄ (veure l'apartat de Material i Mètodes). Concretament, es va analitzar el proteoma sèric de 36 rates control i 94 rates amb diferents graus de fibrosi hepàtica per desvelar nous marcadors no invasius de la malaltia. Els resultats d'aquest treball s'exposen a continuació:

1. Examinació histològica

La resposta individual de les rates exposades a una administració crònica de CCl₄ varia entre animals. Per aquest motiu, va ser necessari biopsiar el teixit hepàtic i quantificar el percentatge de fibra. L'evolució de les lesions fibròtiques es va iniciar amb una lleu deposició situada bàsicament a la zona portal (fibrosi lleu) i va evolucionar cap a diversos septes fibrosos més gruixuts com a resultat d'una major exposició de l'animal al CCl₄ (fibrosi severa). Finalment, la majoria de les rates que van ser sotmeses a un major temps d'inhalació varen desenvolupar cirrosi. L'anàlisi histològic d'aquests animals va mostrar la formació de nòduls de

regeneració separats per septes fibrosos (Figura S1). Les rates no tractades amb CCl_4 (grup control) no van presentar alteracions histològiques i el percentatge de fibra fou negligible. Els paràmetres bioquímics de funció hepàtica i renal, així com els electròlits i les variables demogràfiques de totes les rates incloses en l'estudi es troben detallats a la Taula 1. Com era d'esperar, les rates fibròtiques i cirròtiques presentaven alteracions rellevants en els tests de funció renal, essent més pronunciades en els animals cirròtics.

2. Perfils proteòmics sèrics i anàlisi de les vies de senyalització de les rates control, fibròtiques i cirròtiques

Emprant les 45 proteïnes estadísticament més significatives obtingudes per espectrometria de masses en tàndem (Taula S1), es va realitzar un anàlisi de components principals (PCA) per determinar si existia un patró proteic característic entre els diferents estadis de la malaltia. No es van detectar diferències entre les rates amb fibrosi lleu i les que presentaven fibrosi severa. Tot i això, s'observaren tres grups clarament diferenciats i sense solapament que corresponien al grup control, al grup fibròtic i al grup cirròtic (Figura 1). Seguidament, es van realitzar dos anàlisis quantitius de les vies de senyalització alterades en funció de totes les proteïnes identificades i quantificades (Figura 2). Pel que fa a les rates fibròtiques, es van posar de manifest clares afectacions en la cascada de coagulació així com variacions en la senyalització de la resposta en fase aguda i en la regulació de la senyal de proliferació (Figura 2A). En cirrosi, totes les diferències observades en estadis fibròtics es trobaven més accentuades i fins i tot presentaven altres alteracions com les que involucren als receptors acoblats a proteïnes G, entre d'altres (Figura 2B). Finalment, es van detectar també mecanismes patogènics alterats relacionats amb la malaltia hepàtica en els estadis fibròtics (Figura 2C). És rellevant destacar que les rates cirròtiques presentaven, a més a més, disfuncions a nivell renal i cardíac (Figura 2D).

3. SIPA1L1 i hemopexina com a potencials biomarcadors de detecció de fibrosi i cirrosi, respectivament

Partint de les 10 proteïnes que presentaven diferències estadísticament més significatives en fibrosi o cirrosi (Taula 2), es va anar acotant aquest nombre en funció de diferents paràmetres de restricció: *fold-change* superior o igual a |2|, exclusió de les proteïnes majoritàries i/o les no conservades entres rates i humans. Després d'aquest procediment restrictiu, es van seleccionar dues proteïnes, SIPA1L1 i hemopexina, com a potencials biomarcadors de fibrosi i cirrosi, respectivament. Concretament, la concentració de SIPA1L1 estava reduïda en estadis fibròtics mentre que l'hemopexina es trobava incrementada en les

mostres sèriques de les rates cirròtiques. Els espectres MS/MS representatius d'ambdues proteïnes es mostren a la Figura 3.

4. Avaluació dels potencials biomarcadors en el grup de validació

Per confirmar els resultats obtinguts, les concentracions sèriques de SIPA1L1 i d'hempexina van ésser mesurades per tècniques d'immunoassaig (ELISA) en un grup major d'animals format per rates tractades amb CCl₄ i rates control. Com en el cas anterior, els animals fibròtics i cirròtics del grup de validació van mostrar un deteriorament progressiu de la funció hepàtica a mesura que el procés fibròtic avançava, associat també a una reducció de la pressió arterial mitjana (MAP) i a un increment de la pressió portal (PP) (Taula 3).

No es van detectar diferències en la concentració sèrica d'hempexina entre cap dels grups d'estudi (Figura 4A), fet que no va permetre validar aquesta proteïna com a potencial biomarcador de cirrosi hepàtica. No obstant, els nivells circulants de SIPA1L1 van ser clarament significatius entre el grup control i les rates tractades amb CCl₄. Així doncs, i confirmant els resultats obtinguts anteriorment per espectrometria de masses, les rates amb un procés fibròtic lleu van mostrar una reducció del 40% en la concentració sèrica de SIPA1L1 en comparació amb el grup control. Aquesta tendència es va mantenir també en les rates amb fibrosi severa i cirrosi (Figura 4B).

5. Precisió de SIPA1L1 i hemopexina per detectar els estadis inicials de fibrosi i cirrosi

Finalment, per determinar la precisió d'ambdós potencials biomarcadors es va fer ús de la corba ROC (*Receiver-operating characteristic curve*). Es van emprar exclusivament les rates fibròtiques (n=50) per a l'avaluació de SIPA1L1 i les cirròtiques (n=17) per a la d'hempexina (Figura 5A). L'àrea sota la corba ROC (AUROC) obtinguda després d'avaluar l'hempexina en les rates cirròtiques va demostrar una pobra eficàcia diagnòstica (AUROC: 0,702) i una manca de significació estadística. Contràriament, l'avaluació de la AUROC per SIPA1L1 va confirmar una excel·lent capacitat diagnòstica, presentant un valor de 0,865. Aquesta fou fins i tot major quan l'anàlisi es va realitzar exclusivament en les mostres sèriques de rates amb fibrosi lleu (AUROC: 0,904). En base al valor màxim de la ràtio de probabilitat (*likelihood ratio*), el qual minimitza el nombre de casos falsos positius i falsos negatius, es va escollir la concentració sèrica de 475,5 pg/ml com a valor de tall òptim per diferenciar els animals controls dels fibròtics. El valor predictiu positiu i negatiu obtingut fou de 97% i de 86%, respectivament. A més a més, es va aconseguir una sensibilitat del 74% i una especificitat del 95%.

RESEARCH ARTICLE

Sipa1l1 is an early biomarker of liver fibrosis in CCl₄-treated ratsSantiago Marfà^{1,*}, Manuel Morales-Ruiz^{1,2,*}, Denise Oró¹, Jordi Ribera¹, Guillermo Fernández-Varo^{1,2} and Wladimiro Jiménez^{1,2,‡}

ABSTRACT

At present, several procedures are used for staging liver fibrosis. However, these methods may involve clinical complications and/or present diagnostic uncertainty mainly in the early stages of the disease. Thus, this study was designed to unveil new non-invasive biomarkers of liver fibrosis in an *in vivo* model of fibrosis/cirrhosis induction by CCl₄ inhalation by using a label-free quantitative LC-MS/MS approach. We analyzed 94 serum samples from adult Wistar rats with different degrees of liver fibrosis and 36 control rats. Firstly, serum samples from 18 CCl₄-treated rats were clustered into three different groups according to the severity of hepatic and the serum proteome was characterized by label-free LC-MS/MS. Furthermore, three different pooled serum samples obtained from 16 control Wistar rats were also analyzed. Based on the proteomic data obtained, we performed a multivariate analysis which displayed three main cell signaling pathways altered in fibrosis. In cirrhosis, more biological imbalances were detected as well as multi-organ alterations. In addition, hemopexin and signal-induced proliferation-associated 1 like 1 (SIPA1L1) were selected as potential serum markers of liver fibrogenesis among all the analyzed proteins. The results were validated by ELISA in an independent group of 76 fibrotic/cirrhotic rats and 20 controls which confirmed SIPA1L1 as a potential non-invasive biomarker of liver fibrosis. In particular, SIPA1L1 showed a clear diminution in serum samples from fibrotic/cirrhotic rats and a great accuracy at identifying early fibrotic stages. In conclusion, the proteomic analysis of serum samples from CCl₄-treated rats has enabled the identification of SIPA1L1 as a non-invasive marker of early liver fibrosis.

KEY WORDS: Liver fibrosis, Biomarker, Proteomics, SIPA1L1, E6TP1

INTRODUCTION

The identification of non-invasive markers of fibroproliferative processes has been subject of considerable investigation during the last decade (Fernández-Varo and Jimenez, 2011; Martínez et al., 2011a). The huge burden of these pathologies and the availability of next-generation antifibrotic drugs allowing early therapeutic interventions have been major drivers in achieving this goal. Despite these efforts, however, the challenge remains elusive. The

natural history of most liver diseases is probably among the major reasons accounting for this. Liver diseases are usually an insidious process that may evolve for long periods of time and may develop without evident clinical manifestations during the first years of evolution after the onset of injury (Hernandez-Gea and Friedman, 2011; Hannivoort et al., 2012). Under this scenario, the search for fibroproliferative processes has become endless. In the current investigation we attempted to circumvent this difficulty by unveiling circulating biomarkers of liver fibrosis in rats with carbon tetrachloride (CCl₄)-induced fibrosis. In this experimental model the time to detect histological signals of hepatic healing is considerably shortened and it also allows the collection of tissue samples, blood and clinical data at different points of disease evolution (Clària and Jiménez, 2005). This experimental approach was combined with a label-free liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) workflow in a large set of serum samples obtained from fibrotic rats and healthy animals. Label-free quantitative LC-MS/MS is a powerful method for identifying and quantifying proteins in complex samples (Altelaar et al., 2013; Sandin et al., 2015). This pilot study was initially performed for biomarker candidate selection and was followed up with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) validation of two biomarkers in a larger sample cohort. Following this discovery protocol, we were able to uncover signal-induced proliferation-associated 1 like 1 (SIPA1L1) as a new non-previously described early biomarker of liver fibrosis in CCl₄-treated rats, thus providing scientific rational to design clinical studies assessing the diagnostic and/or prognostic utility of SIPA1L1 in patients with liver fibrosis.

RESULTS

On histological examination, fibrotic lesions evolved from a weak deposition basically in the portal area (mild fibrosis) to several thicker septa which resulted from more prolonged exposure to CCl₄ (severe fibrosis). Finally, most of the animals exposed to CCl₄ for longer periods of time developed cirrhosis, and the histological analysis displayed the formation of regenerative nodules of liver parenchyma separated by fibrotic septa (Fig. S1). Control CCl₄ non-treated rats displayed no appreciable alterations in liver histology and an almost negligible amount of fibrous tissue. Table 1 shows serum electrolytes and the biochemical tests of liver function in control and CCl₄-treated rats included in the training group. As expected, fibrotic and cirrhotic rats included in this group had important and progressive alterations in liver-function tests, being more pronounced in cirrhotic animals.

Proteomic signature of CCl₄-treated rats and signaling pathway analysis

To determine if there is a clustering of observations suggesting an underlying multivariate pattern of proteins, a principal component analysis (PCA) was performed. The 45 most discriminatory proteins, as reflected by the highest statistical significance when

¹Biochemistry and Molecular Genetics Service, Hospital Clinic, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain. ²Departament de Biomedicina, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain.

*These authors contributed equally to this work

‡Author for correspondence (wjimenez@clinic.ub.es)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Table 1. Baseline characteristics of all the rats included in the training set

	Control (n=16)	Fibrosis		
		Mild/moderate <6% (n=6)	Severe 6-11% (n=6)	Cirrhosis >11% (n=6)
Body weight (g)	437±11	375±17	363±11*	360±15*
K ⁺ (mM)	5.8±0.1	5.8±0.2	5.6±0.3	5.6±0.2
Na ⁺ (mM)	143±0.3	144±0.4	143±0.5	142±0.9
Creatinine (mg/dl)	0.51±0.01	0.52±0.00	0.48±0.03	0.41±0.01**
Alanine aminotransferase (U/l)	51±1	78±13	111±19	151±20***
Aspartate aminotransferase (U/l)	94±15	271±113	576±162**	1129±202***
Gamma-glutamyltransferase (U/l)	0.83±0.29	0.17±0.10	2.57±1.95	12.27±2.32**
Albumin (g/l)	35.5±0.4	35.5±0.6	34.5±1.0	30.0±0.9**
Total proteins (g/l)	62.3±1.7	59.5±4.5	58.4±2.0	41.2±1.2***
Total bilirubin (mg/dl)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.1	2.3±0.4***

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 in comparison to control group (Kruskal–Wallis test with Dunn post hoc test). Results are given as mean±s.e.m.

compared to control samples, were included in the analysis (Table S1). No differences were observed among fibrotic rats regardless of the presentation of mild/moderate or severe fibrosis. However the scatter plot visually conveys the separation of fibrotic, cirrhotic and control rats with no overlapping among samples (Fig. 1). Afterwards, two quantitative signaling pathway analyses were performed based on all the proteins identified and quantified (Fig. 2). Clear alterations in the coagulation cascade (coagulation system and intrinsic prothrombin activation pathway) as well as variations in the acute phase response signaling were found. The regulation of proliferative signaling was also affected in the fibrotic group (Fig. 2A). As expected, the cirrhosis signaling pathway analysis showed more anomalies. Apart from those observed in fibrosis, other alterations such as the G-protein coupled receptor signaling pathway or the cAMP-mediated signaling were also statistically significant, among others (Fig. 2B). Finally, several pathological mechanisms were detected in both the fibrotic (Fig. 2C) and cirrhotic groups (Fig. 2D), mainly related to the liver disease. Of note was that pathways related to cardiac damage or renal dysfunction were also affected in the group of cirrhotic rats thus reinforcing the confidence of the performed analysis.

Hemopexin and SIPA1L1 as potential serum biomarkers for fibrosis and cirrhosis detection

The ten different protein peaks showing the most statistically significant expression in samples from CCl₄-treated rats as compared to controls were selected. Among these, four were specifically detected in samples from fibrotic animals whereas six were exclusively found in cirrhotic rats (Table 2). Only proteins showing at least a twofold change in expression were further considered for subsequent analysis. Moreover, high-abundant serum proteins and proteins not very conserved between rats and humans were also excluded. According to this data processing strategy, only SIPA1L1 and hemopexin were selected. In particular, SIPA1L1 was down expressed in fibrosis whereas hemopexin was

increased in cirrhosis. Representative MS/MS spectra from the SIPA1L1 and hemopexin peptides are shown in Fig. 3.

Biomarker assessment in the validation group

To confirm that SIPA1L1 and hemopexin were potential biomarkers for the detection of liver fibrosis and cirrhosis respectively, both candidates were measured by ELISA in a large validation group of CCl₄-treated rats with different degrees of liver fibrosis. Table 3 shows systemic and portal hemodynamics, serum electrolytes and standard parameters of liver function in all animals included in the validation protocol. Paralleling the results found in the training protocols, CCl₄-treated rats showed a progressive deterioration of hepatic enzymes and liver function as fibrosis evolved, which was also associated with a gradual decrease in mean arterial pressure (MAP) and increased portal pressure (PP).

As shown in Fig. 4A, no differences were detected in the circulating levels of hemopexin between control and CCl₄-treated rats, including cirrhotic animals. These results, therefore, failed to confirm hemopexin as a non-invasive biomarker of liver fibrosis/cirrhosis in rats. In contrast, CCl₄-treated rats with mild fibrosis showed a significant reduction in the serum concentration of SIPA1L1 as compared to controls. These results were coincident to those found in the label free quantitative LC-MS/MS analysis. Furthermore, this diminution was also observed in rats with severe fibrosis and cirrhosis (Fig. 4B).

Accuracy of SIPA1L1 and hemopexin to detect early stages of hepatic fibrosis and cirrhosis, respectively

The results for the accuracy of SIPA1L1 and hemopexin in fibrotic and cirrhotic rats are presented as receiver-operating characteristic (ROC) curves in Fig. 5A. Animals belonging to the fibrotic groups (n=50) were considered in the analysis for SIPA1L1, whereas only cirrhotic rats were considered at assessing hemopexin (n=17). The ROC of SIPA1L1 showed an excellent diagnostic accuracy to

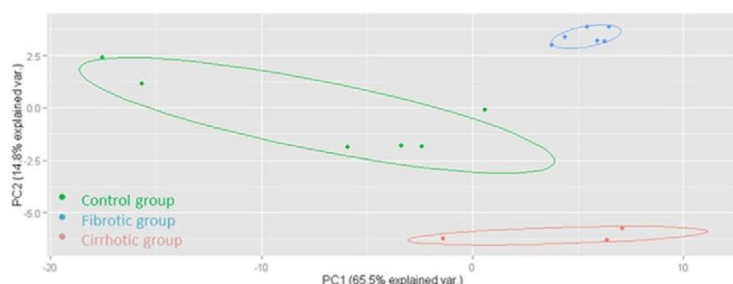


Fig. 1. Multivariate data analysis of serum samples from CCl₄-treated rats and the control group. PCA of the serum proteomic data obtained from CCl₄-treated and control rats. Only the first two principal components were plotted. The score plot displayed a clear separation between the control, fibrotic and cirrhotic groups, despite no differences being observed between mild/moderate fibrosis and severe fibrosis.

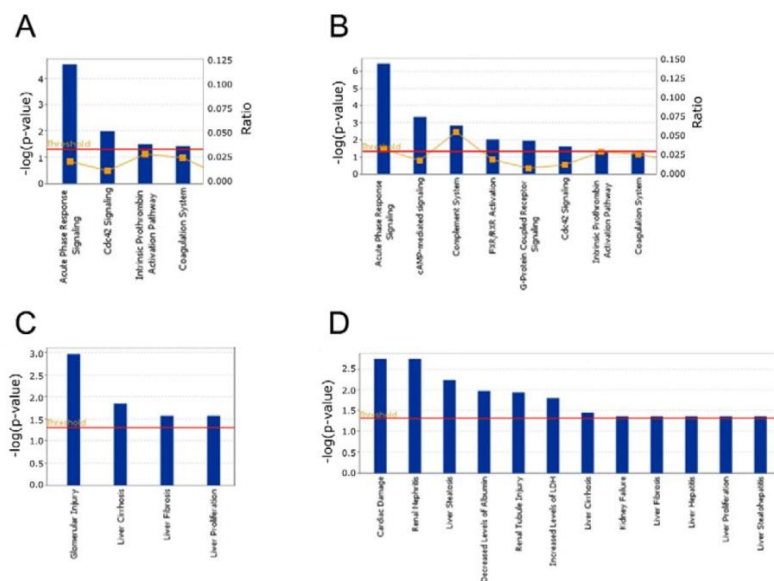


Fig. 2. Signaling pathway analysis. The comparisons of the cell signaling pathways (A,B) and the pathological mechanisms (C,D) occurring in fibrotic (A,C) and cirrhotic rats (B,D) were modeled using the Ingenuity Pathways Knowledge Base (IPA). The proteomic results obtained in control, fibrotic and cirrhotic rats were compared with global molecular networks using the Fisher's Exact Test. The resulting *P*-values were adjusted for multiple comparisons using the Benjamini and Hochberg's method to control the false discovery rate. After multitest adjustment, differences were considered to be significant at $P < 0.05$. The red line across the cell signaling graphs delimits the point where $P = 0.05$. In addition, the significance of the association was measured on the basis of the ratio of the number of targets from the data set that map to the pathway divided by the total number of targets that are included in the canonical pathway (yellow line and right axis, top panels). Only proteomic changes larger than twofold were included in the pathway analysis.

discriminate rats with fibrosis from control animals [area under the ROC (AUROC): 0.865, $P < 0.0001$]. In contrast, the ROC of hemopexin to discriminate cirrhotic from control rats displayed a considerably lower diagnostic efficacy (AUROC: 0.702), which lacked statistical significance. In addition, a serum concentration of SIPAL1L1 of 475.5 pg/ml was selected as the optimal cutoff value to differentiate normal from fibrotic animals. This estimation was based on the maximum value of the likelihood ratio, which minimizes the number of false positive and false negative cases. Above this cutoff, 86% of rats did not show significant fibrosis. Below this cutoff, 97% of rats had fibrosis. In addition, we correctly classified 74% of the animals with fibrosis. Finally, the specificity was also determined and reached the 95% (Fig. 5B).

DISCUSSION

Early detection of fibrosis progression is an essential step for preventing future clinical complications in patients with chronic liver disease. At present, liver biopsy is still the gold standard procedure to assess hepatic fibrosis (Fernandez-Varo and Jimenez, 2011; Castera and Pinzani, 2010), but the risk of clinical complications and sampling errors are some of the most remarkable limitations (Martinez et al., 2011a; Cadranet et al.,

2000; West and Card, 2010). In this context, new non-invasive biomarkers have recently appeared as potential alternatives to liver biopsy. However, early detection of hepatic fibrosis remains an open challenge, as the diagnostic capacity of many circulating markers and algorithms are not as accurate in the early and mild stages of liver fibrosis in comparison to advanced fibrosis (Lichtinghagen et al., 2013; Martinez et al., 2011b). In most cases the slow progression of the disease emerges as one of the main obstacles for discovering specific biomarkers of early fibrosis.

In the present study this difficulty was circumvented using a strategy for identifying biomarkers of liver fibrosis in an experimental model of rats with CCl_4 -induced fibrosis and cirrhosis that closely reproduces the histological, hemodynamic, biochemical and renal disturbances that patients with liver disease develop. Actually, previous investigations from our laboratory and others have demonstrated that these animals have a gradually increased hepatic deposition of collagen fibers which is associated with a progressive derangement in systemic and splanchnic hemodynamics, altered serum concentrations of liver and renal function tests and marked sodium and water retention that results in ascites formation (Clària and Jiménez, 2005). This sequence of events is very similar to that observed in human cirrhosis and lays the foundation to use this model to better understand the pathophysiological mechanisms involved in these phenomena, as well as to evaluate the therapeutic utility of new drugs to ultimately be used in patients with liver disease (Fernández-Varo et al., 2016; Oró et al., 2016). The results found in the training and validation groups further confirm this contention. In fact, collagen deposition in the CCl_4 -treated rats ranged between 1.9% and 26.3% according to the time submitted to the fibrosis induction protocol. We also observed a progressively decreased MAP and increased PP. Moreover, low serum concentrations of albumin and marked activation of hepatic enzymes were also noted. Finally, ascites was detected in some of the animals with higher hepatic collagen content. All these data confirm the suitability of the experimental model to uncover new biomarkers of liver fibrosis.

Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) has been the most widely used proteomic method for comparing protein expression profiles between normal and pathological conditions (Srinivas et al., 2001; Adam et al., 2001). However, the 2-DE approach has several disadvantages, including the difficulty in separating proteins with

Table 2. Log fold-change of the potential biomarkers of liver fibrosis and cirrhosis

Symbol	Protein name	Log fold change
Biomarkers of fibrosis		
APCS	amyloid P component	-1.3
AZGP1	alpha-2-glycoprotein 1	4.8
FN1	fibronectin 1	-2.4
SIPA1L1	signal-induced proliferation-associated 1 like 1	-6.4
Biomarkers of cirrhosis		
AHSG	alpha-2-HS-glycoprotein	1.6
ALB	albumin	-4.1
C4B	complement component 4B (chido blood group)	-2.3
HPX	hemopexin	2.0
PIGR	polymeric immunoglobulin receptor	6.9
SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	-1.3

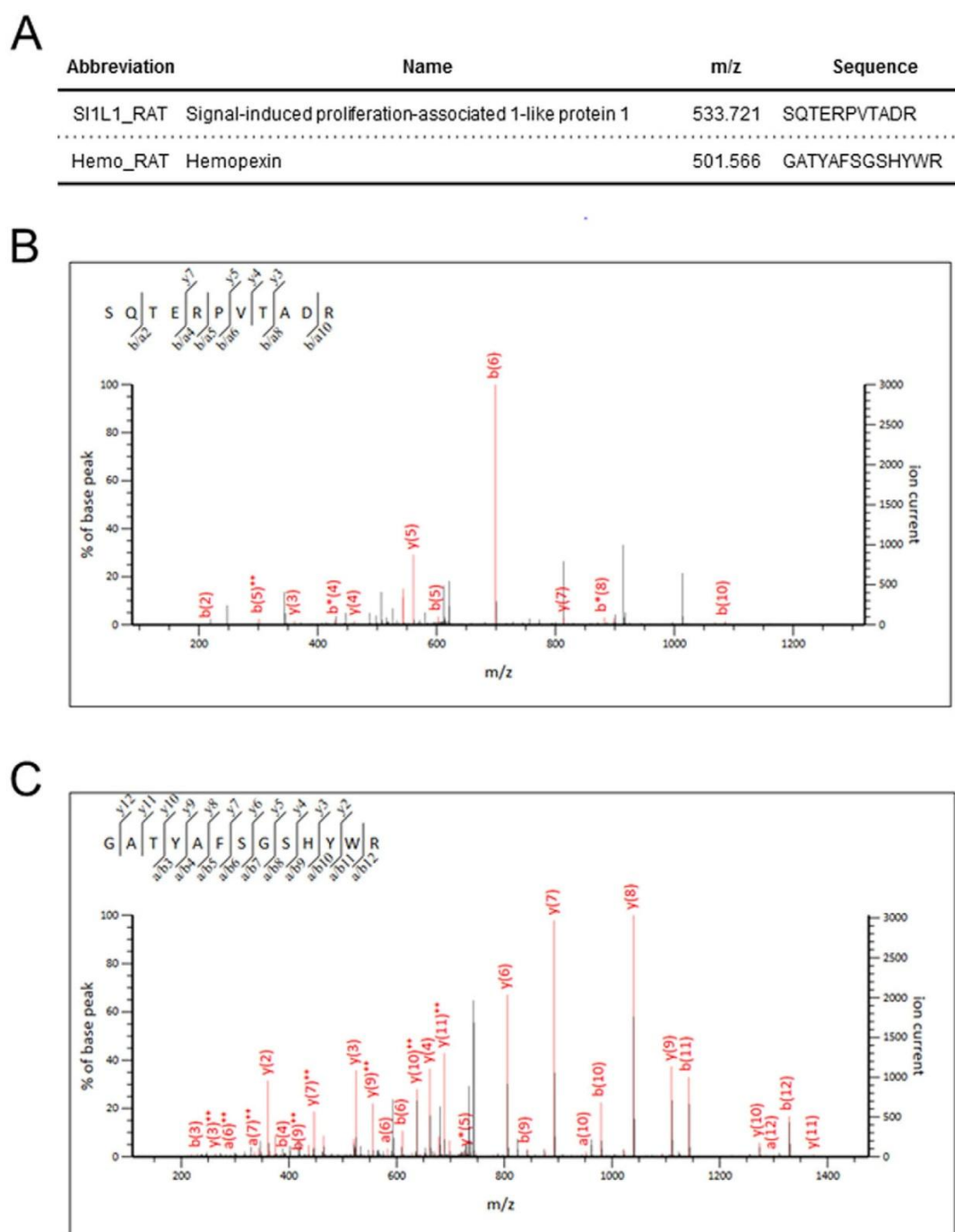


Fig. 3. MS/MS analysis of the SIPA1L1 and hemopexin peptides identified. (A) Amino acid sequencing of SIPA1L1 and hemopexin. (B,C) Representative MS/MS spectra of the peptides identified from SIPA1L1 (B) and hemopexin (C).

extremes in molecular weight (<10 kDa or >200 kDa) and in isoelectric points (<4 or >10) as well as complications for resolving hydrophobic proteins or even detecting low abundance proteins (Rabilloud, 2002; Braun et al., 2007). To overcome these drawbacks, label-free LC-MS/MS has become indispensable in the proteome analysis of several diseases (Altelaar et al., 2013) including kidney chronic allograft dysfunction and hematological malignancies (Quintana et al., 2009; Casado et al., 2013). Furthermore, this technique has emerged as a promising alternative for biomarker discovery (Sandin et al., 2015). Compared to the protein-labeling approaches, label-free

quantitative methods allow individual analysis of each sample, enabling the study of a large number of specimens for each experiment due to the absence of labeling restrictions. Data analysis, encompassing protein identification and quantification provides a general overview of all the proteomic data obtained from the MS assessment. In the current investigation multivariate PCA was adopted to explore and visualize a protein biomarker fingerprint associated with hepatic fibrosis. Following the identification of the 45 peaks showing higher statistical difference between fibrotic and control samples in the definition/training groups, the PCA was able to distinguish a different protein signature for fibrotic, cirrhotic and

Table 3. Baseline characteristics of all the rats included in the validation group

	Control (n=20)	Fibrosis		
		Mild/moderate <6% (n=25)	Severe 6-11% (n=25)	Cirrhosis >11% (n=26)
Body weight (g)	463±15	410±8*	440±12	428±12
HR (bpm)	398±9	387±7	388±9	355±6***
PP (mmHg)	5.8±0.1	7.9±0.5**	9.2±0.6***	12.3±0.5***
MAP (mmHg)	123±1	119±2	109±3**	87±3***
SPP (mmHg)	117±1	111±2	100±3***	75±3***
K ⁺ (mM)	5.5±0.1	5.2±0.2	4.4±0.1***	4.6±0.3***
Na ⁺ (mM)	143±1	141±1	143±1	141±1
Creatinine (mg/dl)	0.55±0.01	0.60±0.04	0.59±0.04	0.47±0.03
Alanine aminotransferase (U/l)	42±2	394±62***	365±71***	336±63***
Aspartate aminotransferase (U/l)	88±4	240±27**	403±86***	573±65***
Gamma-glutamyltransferase (U/l)	0.24±0.15	1.17±0.43	2.60±0.77**	5.64±0.91***
Albumin (g/l)	36.7±0.6	30.0±0.8***	29.7±0.8***	26.9±0.7***
Total proteins (g/l)	63.9±1.5	52.3±1.9***	52.7±1.2**	47.1±1.2***
Total bilirubin (mg/dl)	0.0±0.0	0.1±0.1	0.3±0.1***	1.7±0.2***

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ in comparison to control group; (one-way ANOVA with Newman–Keuls post hoc test or Kruskal–Wallis test with Dunn post hoc test when appropriate). Results are given as mean±s.e.m.

control samples. Interestingly enough, this proteomic analysis did not establish clear differences between rats with mild/moderate or severe fibrosis. A subsequent analysis performed by clustering all the proteomic data into the different cell signaling pathways pointed out three major altered signaling pathways in the fibrotic animals, i.e. the acute phase response, the coagulation cascade and mechanisms involved in cell proliferation. As anticipated, the amount of deregulated signaling pathways in cirrhotic animals was higher and affected other organs than the liver, such as kidney and heart. These findings are in concordance with the most characteristic pathological features already described in patients with different degrees of alteration in hepatic architecture (Mercer and Chambers, 2013; Betrosian et al., 2007; Møller and Henriksen, 2002), thus further validating the usefulness of CCl₄-treated rats in biomarker discovery for liver disease.

Label free LC-MS/MS proteomic analysis resulted in the identification of two non-invasive independent circulating proteins, SIPA1L1 and hemopexin, biomarkers of fibrosis and cirrhosis, respectively. Three isoforms of SIPA1L1 of approximately 200 kDa have been described (Gao et al., 1999). At present, SIPA1L1 is known to be a GTPase-activating protein (GAP) as it possesses a region of homology with GAP domains (Gao et al., 1999). On the other hand, SIPA1L1 has also been described as a potential tumor suppressor (Gao et al., 1999) since it is located on a region in chromosome 14 which has been reported to exhibit a loss of heterozygosity in malignant meningiomas (Menon et al., 1997). Thus, it seems that its inactivation contributes to malignant transformations. In the current investigation, we observed a significant diminution of SIPA1L1 serum levels in mild/moderate fibrosis and this reduction was maintained over the fibrotic and

cirrhotic groups. Furthermore, SIPA1L1 amino acid sequence is highly conserved between humans and rats. In particular, and according to the GeneCards database, the similarity reaches the 95.34% of coincidence. Therefore, it is feasible to think that the results obtained from the *in vivo* model could be translated to human liver fibrosis, since proteins with very similar amino acid composition and sequence often implies similar functions (Alberts et al., 2007; Lodish et al., 2000). Hemopexin is a 60 kDa glycoprotein which has been shown to be mainly expressed in the hepatic parenchymal cells (Thorbecke et al., 1973). It belongs to the acute-phase protein family, whose synthesis is induced by several cytokines in response to an inflammatory event (Baumann and Gaudie, 1994). In addition, hemopexin is the circulating protein with the highest affinity for heme, and it is considered to be the major responsible for its transport (Tolosano et al., 1999). This feature has led to the belief that hemopexin prevents the body from heme-catalyzed oxidation as well as heme-bound iron loss, thus protecting against inflammation and liver fibrosis (Tolosano et al., 1999). Our results in the training group showed a significantly increased serum concentration of hemopexin in cirrhotic rats as compared to control animals.

The results obtained in the validation group confirmed SIPA1L1 as a biomarker but failed to demonstrate that hemopexin is an appropriate indicator of cirrhosis in rats. In fact, assessment of the serum concentration of hemopexin by ELISA in the different groups of CCl₄-treated rats, including cirrhotic animals, did not show significantly different values as compared to control animals. Accordingly, the diagnostic accuracy of this parameter, as assessed by the ROC curve, failed to show statistical significance. By contrast SIPA1L1 does demonstrate excellent diagnostic accuracy for

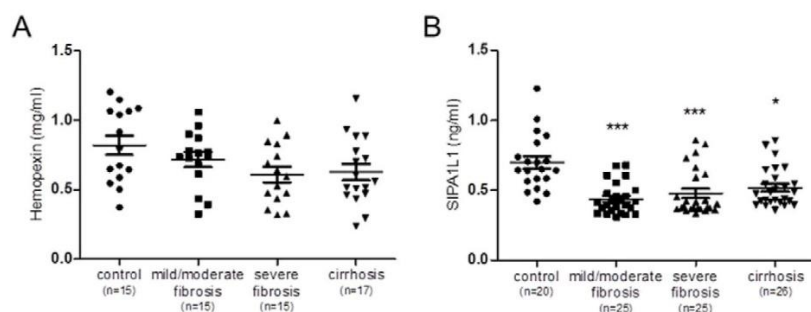


Fig. 4. Serum concentration of hemopexin and SIPA1L1 in CCl₄-treated rats. (A) Serum hemopexin values obtained from control (n=15), mild/moderate (n=15), severe fibrotic (n=15) and cirrhotic rats (n=17). One-way ANOVA with Newman–Keuls post hoc test was used to evaluate dissimilarities between groups. No differences were found between groups. (B) SIPA1L1 serum levels in control rats (n=20), mild/moderate (n=25) and severe fibrotic rats (n=25) and cirrhotic (n=26). Differences between groups were evaluated by the Kruskal–Wallis test with the Dunn post hoc test. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ in comparison to the control group.

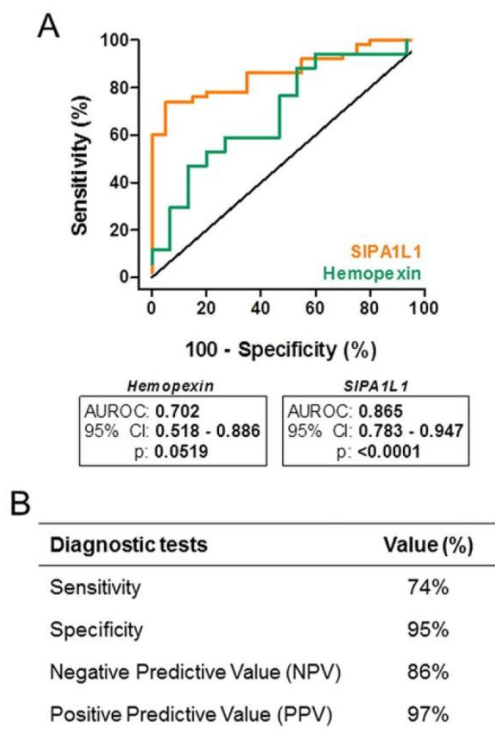


Fig. 5. Diagnostic accuracy of hemopexin and SIPA1L1 and diagnostic tests of SIPA1L1. (A) Diagnostic accuracy of hemopexin and SIPA1L1 to differentiate cirrhosis and fibrosis, respectively. When using the hemopexin serum concentration, the AUROC was 0.702 but not statistically significant ($P>0.05$). The AUROC obtained from SIPA1L1 serum concentration was 0.865 and statistically significant ($P<0.0001$). (B) Several diagnostic tests (Sensitivity, Specificity, NPV and PPV) were performed in SIPA1L1 after determining 475.5 pg/ml as the optimal cutoff.

fibrosis, being more remarkable when evaluating samples from rats with mild/moderate fibrosis (data not shown). In fact, the serum concentrations of SIPA1L1 in this group of animals showed an approximately 40% reduction in comparison to healthy animals. Therefore, a reduction of SIPA1L1 serum concentration could detect the early fibrotic subjects who are prone to develop more severe complications and allow prompt therapeutic interventions.

Despite no studies having described the potential role that this protein may have in liver fibrosis, a previous investigation (Tsai et al., 2007) demonstrated that Wnt signaling affects the phosphorylation and stability of SIPA1L1. In particular, Wnt signaling activates casein kinase I epsilon (CKIε) (Swiatek et al., 2004), which induces SIPA1L1 phosphorylation and its degradation as well as the accumulation of β-catenin (Gao et al., 2002). Since the Wnt signaling pathway is activated during liver fibrosis in hepatic stellate cells (Miao et al., 2013) it is tentative to speculate that SIPA1L1 diminution is a consequence of the activation of the fibrogenic process. In this regard, several investigations have shown that sustained Wnt/β-catenin pathway activation is linked to the pathogenesis of different fibrotic disorders including liver fibrosis (Cheng et al., 2008, 2010; He et al., 2009; Jiang et al., 2006; Li et al., 2011; Myung et al., 2007). Therefore, these results are consistent with the hypothesis that SIPA1L1 downregulation is a surrogate marker of early fibrogenesis activation in liver disease. However, the detailed mechanism by which this phenomenon could happen still needs to be elucidated.

The current investigation took advantage of the *in vivo* model of fibrosis induction by CCl₄ inhalation in Wistar rats to identify

potential new biomarkers related to liver fibrosis progression. Using a label-free LC-MS/MS proteomic approach, we performed bioinformatics analyses to explore and visualize a protein biomarker fingerprint associated with hepatic fibrosis. Subsequently, we selected the 10 proteins with the greater discriminatory power between fibrosis or cirrhosis and the control group. Among them, hemopexin and SIPA1L1 were picked for further validation. Despite hemopexin failing to demonstrate its value as an indicator of cirrhosis, SIPA1L1 showed a clear serum diminution and a great accuracy at identifying early fibrotic stages in the validation group. This study, therefore, strengthens the importance of combining reliable experimental models with holistic proteomic approaches to uncover new biomarkers of fibrosis in liver disease.

MATERIALS AND METHODS

Animal studies

The study was performed in 94 male adult Wistar fibrotic/cirrhotic rats and 36 control Wistar rats (Charles-River, Saint Aubin les Elseuf, France). The design of the study was two folded: firstly, using quantitative label-free LC-MS/MS we assessed a possible correlation between fibrosis stage and serum proteomic expression in a training group of 18 rats with different degrees of fibrosis. Sixteen rats were used as the control group. At the end of the study, the animals were sacrificed by isoflurane overdose and serum samples from each rat were obtained and kept at -80°C until further analysis. Afterwards, to validate the usefulness of the biomarkers identified in the training protocol, two different quantitative enzyme immunoassays (ELISA) were performed in a validation set of 76 CCl₄-treated rats and 20 healthy animals. Standard liver and renal function tests were also analyzed in all animals.

Induction of fibrosis and cirrhosis in rats

Fibrosis was induced by repetitive CCl₄ inhalation as described previously (Clària and Jiménez, 2005). Briefly, rats were fed *ad libitum* with standard chow and water containing 0.3 g/l of phenobarbital as drinking fluid. Animals were exposed to a CCl₄ vapor atmosphere twice a week, starting at 30 s per exposure. The duration of the inhalation was increased by 30 s after the first three sessions and by 1 min after every other three sessions until it reached a plateau of 5 min. To obtain variable degrees of hepatic fibrosis, CCl₄-treated rats were investigated between the 9th and the 40th week after starting the fibrosis-induction protocol. Control rats were studied after similar periods of phenobarbital administration alone.

Hemodynamic studies

Systemic and portal hemodynamics was assessed in 76 CCl₄-treated rats and 20 control rats as described elsewhere (Reichenbach et al., 2012). In short, animals were anesthetized with Inactin (50 mg/kg body weight; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and a catheter was implanted in the right femoral artery. Hemodynamic parameters were allowed to stabilization for 30 min, and the mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) values were registered for two periods of 30 min. Each value shown in Table 3 represents the average of these two measurements. Subsequently, an abdominal incision was performed, and another catheter was placed in the portal vein through the ileocolic vein and fixed to the mesentery with cyanoacrylate glue. After verifying free blood reflux, portal pressure (PP) was registered. Splanchnic perfusion pressure (SPP) was estimated as MAP-PP. At the end of the study, animals were sacrificed and serum and liver tissue samples were obtained and kept as described in the ‘Animal studies’ section.

Quantification of fibrosis

Four-micron-thick sections of paraffin-embedded liver were stained in 0.1% Sirius Red F3B (Sigma-Aldrich) in saturated picric acid (Sigma-Aldrich). The relative fibrosis area, expressed as a percentage of the total liver area, was evaluated by analyzing a minimum of 30 fields of Sirius Red-stained liver sections per animal. Each field was acquired at 10× magnification (Eclipse E600; Nikon, Kawasaki, Kanagawa, Japan), and the images

obtained were analyzed using ImageJ software (version 1.47; NIH). According to the percentage of fibrosis area the histological lesion was classified as mild/moderate fibrosis (<6%), severe fibrosis (6-11%) or cirrhosis (>11%).

Label-free LC-MS/MS proteomics and bioinformatic analysis of the results

Pooled samples from rats with mild ($n=6$) or severe fibrosis ($n=6$) and cirrhosis ($n=6$) were fractionated using Seppro IgY7 LC10 columns (Genway Biotech Inc., USA) in order to remove the seven most abundant serum proteins (albumin, IgG, fibrinogen, alpha-1-antitrypsin, haptoglobin, transferrin and IgM). In addition, three pools of samples from 5, 5 and 6 control rats were also prepared and fractionated as described. After fractionation, 20 μg of total protein from each pool were digested. The organic solvent of the sample was evaporated in a Savant SpeedVac concentrator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the pellet was redissolved in 20 μl 8 M urea/0.4 M ammonium bicarbonate. Proteins were reduced after incubation with 2 μl of 45 mM dithiothreitol (DTT) and alkylated after incubation with 2 μl of 100 mM iodoacetamide. Then, the samples were digested with 2 μg of Lys C 0.1 mg/ml for 4 h and 2 mg of trypsin 0.1 mg/ml for 12 h. Digested proteins were evaporated and the peptides were dissolved in 5 μl 70% formic acid+25 μl 0.1% trifluoroacetic. Five microliters of each experimental sample at the same peptide concentration were injected on a LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) through a nanoAcquity ultra performance liquid chromatography (UPLC) (Waters Corporation, Mildford, MA, USA) system equipped with a Water Symmetry C18 column (180 $\mu\text{m}\times 20$ mm). Trapping was done at 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ in the presence of 0.1% formic acid for 1 min. Peptide separation was performed with a linear gradient over 90 min at a flow rate of 300 nL/min. Mass spectra were acquired using a maximum injection time of 900 ms followed by three data dependant MS/MS acquisitions in the ion trap (with a precursor ions threshold of >3000). The total cycle time for both MS and MS/MS acquisition was 2.4 s. Peaks targeted for MS/MS fragmentation by collision-induced dissociation (CID) were first isolated with a 2 Da window followed by normalized collision energy of 35%. Samples of each experimental condition were injected in triplicate. The data were processed using the Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics, LLC), R (<http://www.r-project.org>), Mascot (Matrix Science) and IPA programs (Ingenuity Systems). Briefly, the original files with the results obtained from the LTQ Orbitrap were imported into Progenesis, and the spectra of the different experimental conditions were aligned to minimize variability in chromatographic retention times. No adjustments were necessary in the m/z dimension due to the high mass accuracy of the spectrometer (<3 ppm). Features within retention time ranges of 0-25 min and 110-120 min were filtered out, as were features with a charge $\geq +8$. The .mgf files generated in Progenesis were analyzed using the Mascot algorithm based on SwissProt rat data. The following parameters were set for the Mascot algorithm: trypsin enzyme, carbamidomethyl and oxidation for variable modifications, monoisotopic for mass values, unrestricted protein mass, ± 20 ppm for peptide mass tolerance, ± 0.6 Da for fragment mass tolerance, +7 for charge, 3 for max missed cleavages and ESI-TRAP for instrument type. We considered a protein identified when Mascot listed it as significant and more than two unique peptides matched the same protein. Search hits were assigned to corresponding features using Progenesis LCMS software. The data obtained were normalized by the method of robust quantile normalization and statistical differences were assessed using linear models and the moderate t -test (LIMMA package, Bioconductor) (Ritchie et al., 2015). Subsequently, diseases, biological functions and canonical pathways were studied using the Ingenuity Pathways Knowledge Base (Ingenuity System Inc, USA). The proteomic results were compared with global molecular networks using the Fisher's Exact Test. The resulting P -values were adjusted for multiple comparisons using the Benjamini and Hochberg's method to control the false discovery rate. After multitest adjustment, differences were considered to be significant at a P -value less than 0.05. For the canonical pathway analysis, the significance of the association was additionally measured considering the ratio of the number of significant targets that map to the pathway divided by the total number of targets that are included in the canonical pathway. Multivariate data analysis

was performed using R. Finally, the GeneCards database (<http://www.genecards.org/>) was used to check homologies between the rat and human genes encoding for the proteins which were statistically significant among all the different groups.

Biomarkers assessment in the validation group

The proteomic analysis resulted in the identification of two circulating proteins, hemopexin and SIPA1L1 as the most promising biomarkers of liver fibrosis in CCl_4 -treated rats. Next, the circulating levels of SIPA1L1 were measured by ELISA in an additional group of 76 CCl_4 -treated rats (25 rats with mild fibrosis, 25 rats with severe fibrosis and 26 rats with cirrhosis). Hemopexin was also determined by ELISA in 47 of them (15 rats with mild fibrosis, 15 rats with severe fibrosis and 17 rats with cirrhosis). 20 control rats were included in the SIPA1L1 validation protocol, 15 of which were also used in the hemopexin study. Hemopexin was measured according to the manufacturer's protocol (USCN Life Science Inc, Wuhan, China) whereas SIPA1L1 reagents were obtained from EIAab (Wuhan, China), and minor modifications of the manufacturer's instructions were made. Briefly, wells were incubated with either 100 μl of serum, standard dilution series or standard diluent (blank) for 2 h at 37°C. After liquid removal, 100 μl of biotin-conjugated polyclonal antibody were then added at a dilution of 1:100 and allowed to bind for 1 h at 37°C. Subsequently, well plates were washed three times, and avidin conjugated to horseradish peroxidase (1:100 dilution) was incubated for 1 h at 37°C. The aspiration and wash processes were repeated five times and 90 μl of substrate solution was added to each well and allowed to bind for 20 min at 37°C, followed by the addition of 50 μl of 1 M H_2SO_4 . Well plates were immediately read at 450 nm. The optical density value obtained from the sample diluent was subtracted from each standard determination. Subsequently, the standard curve was generated. All were measured in duplicate. In addition, the SIPA1L1 ELISA kit assay was evaluated and obtained satisfactory results in the dilution linearity test (range between 81.2% and 118.4%) as well as in the recovery test (range between 89.3% and 109.8%). Furthermore, the intra-assay (well to well) and inter-assay (plate to plate) coefficient of variation (CV) were also determined, being of 6.09% and 7.51%, respectively.

Measurements and statistical analysis

Standard parameters of renal and liver function were measured using the BS-200E Chemistry Analyzer (Mindray Medical International Ltd, Shenzhen, China). The diagnostic accuracy of the different methods was analyzed by constructing receiver-operating characteristic (ROC) curves and calculating the area under the ROC curve (AUROC). GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) was used for the analysis of the results, the development of the ROC curve and the selection of the optimal SIPA1L1 cutoff value. Statistical analysis were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) with Newman-Keuls post hoc test or Kruskal-Wallis test with the Dunn post hoc test when appropriate, based on the results obtained from the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Results are expressed as mean \pm s.e.m. and P -values less than 0.05 were considered significant.

Ethical approval

The study was approved and performed according to the criteria of the investigation and ethics committee of the University of Barcelona [Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA)]. The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations.

Acknowledgements

The authors are indebted to Silvia Carvajal and Altamira Arce-Cerezo, PhD, for their collaboration in the collection of the serum and hepatic tissue samples used in this investigation. In addition, the authors also thank Dr Erol Gulcicek, Dr Terence Wu, Dr Kathy Stone, Dr TuKiet Lam and Jean Kanyo from the WM Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory at Yale University for their expert technical assistance in mass spectrometry.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

RESEARCH ARTICLE

Biology Open (2016) 0, 1-8 doi:10.1242/bio.018887

Author contributions

Conceived and designed the experiments: M.M.-R., W.J. Induction of fibrosis and cirrhosis in rats: S.M., D.O., J.R., G.F.-V. Sample recruitment: S.M., D.O., J.R., G.F.-V. Performed the hemodynamic studies: D.O., G.F.-V. Performed the experiments and data analysis: S.M., M.M.-R. Contributed to the writing of the manuscript: S.M., M.M.-R., W.J. Revising the article critically: D.O., J.R., G.F.-V. Final approval of the version to be published: S.M., M.M.-R., D.O., J.R., G.F.-V., W.J.

Funding

This work has been supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III [BA11/00016 to M.M.-R.], the Ministerio de Economía y Competitividad [SAF 2012-35979 to W.J., SAF 2013-41840-R to M.M.-R. and BES-2010-035452 to S.M.] and from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca [SGR 2009/1496]. This work has also been co-financed by the European Union through the European Regional Development Fund (ERDF), "A way of making Europe". Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD) is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://bio.biologists.org/lookup/doi/10.1242/bio.018887.supplemental>

References

- Adam, B.-L., Vlahou, A., Semmes, O. J. and Wright, G. L., Jr. (2001). Proteomic approaches to biomarker discovery in prostate and bladder cancers. *Proteomics* **1**, 1264-1270.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell*, 5th edn. New York: Garland Science.
- Altelaar, A. F. M., Munoz, J. and Heck, A. J. R. (2013). Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 35-48.
- Baumann, H. and Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunol. Today* **15**, 74-80.
- Betrosian, A. P., Agarwal, B. and Douzinas, E. E. (2007). Acute renal dysfunction in liver diseases. *World J. Gastroenterol.* **13**, 5552-5559.
- Braun, R. J., Kinkl, N., Beer, M. and Ueffing, M. (2007). Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1033-1045.
- Cadranel, J.-F., Rufat, P. and Degos, F. (2000). Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFL). *Hepatology* **32**, 477-481.
- Casado, P., Alcolea, M. P., Iorio, F., Rodríguez-Prados, J.-C., Vanhaesebroeck, B., Saez-Rodríguez, J., Joel, S. and Cutillas, P. R. (2013). Phosphoproteomics data classify hematological cancer cell lines according to tumor type and sensitivity to kinase inhibitors. *Genome Biol.* **14**, R37.
- Castera, L. and Pinzani, M. (2010). Biopsy and non-invasive methods for the diagnosis of liver fibrosis: does it take two to tango? *Gut* **59**, 861-866.
- Cheng, J. H., She, H., Han, Y.-P., Wang, J., Xiong, S., Asahina, K. and Tsukamoto, H. (2008). Wnt antagonism inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **294**, G39-G49.
- Cheng, S.-L., Shao, J.-S., Halstead, L. R., Distelhorst, K., Sierra, O. and Towler, D. A. (2010). Activation of vascular smooth muscle parathyroid hormone receptor inhibits Wnt/beta-catenin signaling and aortic fibrosis in diabetic arteriosclerosis. *Circ. Res.* **107**, 271-282.
- Clària, J. and Jiménez, W. (2005). Experimental models of cirrhosis and ascites. In *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment*, 2nd edn. (ed. P. Ginés, V. Arroyo, J. Rodés and R. W. Schrier), pp. 215-226. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Hernandez-Varo, G. and Jimenez, W. (2011). Non invasive markers of liver fibrosis. *Eur. Gastr. Hepatol. Rev.* **7**, 93-96.
- Fernández-Varo, G., Oró, D., Cable, E. E., Reichenbach, V., Carvajal, S., de la Presa, B. G., Wiśniewski, K., Ginés, P., Harris, G. and Jiménez, W. (2016). Vasopressin 1a receptor agonism increases sodium excretion and reduces portal hypertension and ascites in cirrhotic rats. *Hepatology* **63**, 207-216.
- Gao, Q., Srinivasan, S., Boyer, S. N., Wazer, D. E. and Band, V. (1999). The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 733-744.
- Gao, Z.-H., Seeling, J. M., Hill, V., Yochum, A. and Virshup, D. M. (2002). Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1182-1187.
- Hannivoort, R. A., Hernandez-Gea, V. and Friedman, S. L. (2012). Genomics and proteomics in liver fibrosis and cirrhosis. *Fibrogen. Tissue Repair* **5**, 1.
- He, W., Dai, C., Li, Y., Zeng, G., Monga, S. P. and Liu, Y. (2009). Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 765-776.
- Hernandez-Gea, V. and Friedman, S. L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 425-456.
- Jiang, F., Parsons, C. J. and Stefanovic, B. (2006). Gene expression profile of quiescent and activated rat hepatic stellate cells implicates Wnt signaling pathway in activation. *J. Hepatol.* **45**, 401-409.
- Li, W., Zhu, C., Chen, X., Li, Y., Gao, R. and Wu, Q. (2011). Pokeweed antiviral protein down-regulates Wnt/beta-catenin signalling to attenuate liver fibrogenesis in vitro and in vivo. *Dig. Liver Dis.* **43**, 559-566.
- Lichtinghagen, R., Pietsch, D., Bantel, H., Manns, M. P., Brand, K. and Bahr, M. J. (2013). The Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score: normal values, influence factors and proposed cut-off values. *J. Hepatol.* **59**, 236-242.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*, 4th edn. New York, NY: W. H. Freeman.
- Martinez, S. M., Crespo, G., Navasa, M. and Forns, X. (2011a). Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology* **53**, 325-335.
- Martínez, S. M., Fernández-Varo, G., González, P., Sampson, E., Bruguera, M., Navasa, M., Jiménez, W., Sánchez-Tapias, J. M. and Forns, X. (2011b). Assessment of liver fibrosis before and after antiviral therapy by different serum marker panels in patients with chronic hepatitis C. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **33**, 138-148.
- Menon, A. G., Rutter, J. L., von Sattel, J. P., Synder, H., Murdoch, C., Blumenfeld, A., Martuza, R. L., von Deimling, A., Gusella, J. F. and Houseal, T. W. (1997). Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative 'tumor progression' locus. *Oncogene* **14**, 611-616.
- Mercer, P. F. and Chambers, R. C. (2013). Coagulation and coagulation signalling in fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 1018-1027.
- Miao, C.-G., Yang, Y.-Y., He, X., Huang, C., Huang, Y., Zhang, L., Lv, X.-W., Jin, Y. and Li, J. (2013). Wnt signaling in liver fibrosis: progress, challenges and potential directions. *Biochimie* **95**, 2326-2335.
- Møller, S. and Henriksen, J. H. (2002). Cirrhotic cardiomyopathy: a pathophysiological review of circulatory dysfunction in liver disease. *Heart* **87**, 9-15.
- Myung, S. J., Yoon, J.-H., Gwak, G.-Y., Kim, W., Lee, J.-H., Kim, K. M., Shin, C. S., Jang, J. J., Lee, S.-H., Lee, S.-M. et al. (2007). Wnt signaling enhances the activation and survival of human hepatic stellate cells. *FEBS Lett.* **581**, 2954-2958.
- Oró, D., Yudina, T., Fernández-Varo, G., Casals, E., Reichenbach, V., Casals, G., González de la Presa, B., Sandalinas, S., Carvajal, S., Puentes, V. et al. (2016). Cerium oxide nanoparticles reduce steatosis, portal hypertension and display anti-inflammatory properties in rats with liver fibrosis. *J. Hepatol.* **64**, 691-698.
- Quintana, L. F., Campistol, J. M., Alcolea, M. P., Bañon-Maneus, E., Sol-González, A. and Cutillas, P. R. (2009). Application of label-free quantitative peptidomics for the identification of urinary biomarkers of kidney chronic allograft dysfunction. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 1658-1673.
- Rabilloud, T. (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* **2**, 3-10.
- Reichenbach, V., Fernández-Varo, G., Casals, G., Oró, D., Ros, J., Melgar-Lesmes, P., Weiskirchen, R., Morales-Ruiz, M. and Jiménez, W. (2012). Adenoviral dominant-negative soluble PDGFR β improves hepatic collagen, systemic hemodynamics, and portal pressure in fibrotic rats. *J. Hepatol.* **57**, 967-973.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W. and Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47.
- Sandin, M., Chawade, A. and Levander, F. (2015). Is label-free LC-MS/MS ready for biomarker discovery? *Proteomics Clin. Appl.* **9**, 289-294.
- Srinivas, P. R., Srivastava, S., Hanash, S. and Wright, G. L., Jr. (2001). Proteomics in early detection of cancer. *Clin. Chem.* **47**, 1901-1911.
- Swiatek, W., Tsai, I.-C., Klimowski, L., Pepler, A., Barnette, J., Yost, H. J. and Virshup, D. M. (2004). Regulation of casein kinase I epsilon activity by Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **279**, 13011-13017.
- Thorbecke, G. J., Liem, H. H., Knight, S., Cox, K. and Muller-Eberhard, U. (1973). Sites of formation of the serum proteins transferrin and hemopexin. *J. Clin. Invest.* **52**, 725-731.
- Tolosano, E., Hirsch, E., Patrucco, E., Camaschella, C., Navone, R., Silengo, L. and Altruda, F. (1999). Defective recovery and severe renal damage after acute hemolysis in hemopexin-deficient mice. *Blood* **94**, 3906-3914.
- Tsai, I.-C., Amack, J. D., Gao, Z.-H., Band, V., Yost, H. J. and Virshup, D. M. (2007). A Wnt-CKI ν epsilon-Rap1 pathway regulates gastrulation by modulating SIPA1L1, a Rap GTPase activating protein. *Dev. Cell* **12**, 335-347.
- West, J. and Card, T. R. (2010). Reduced mortality rates following elective percutaneous liver biopsies. *Gastroenterology* **139**, 1230-1237.

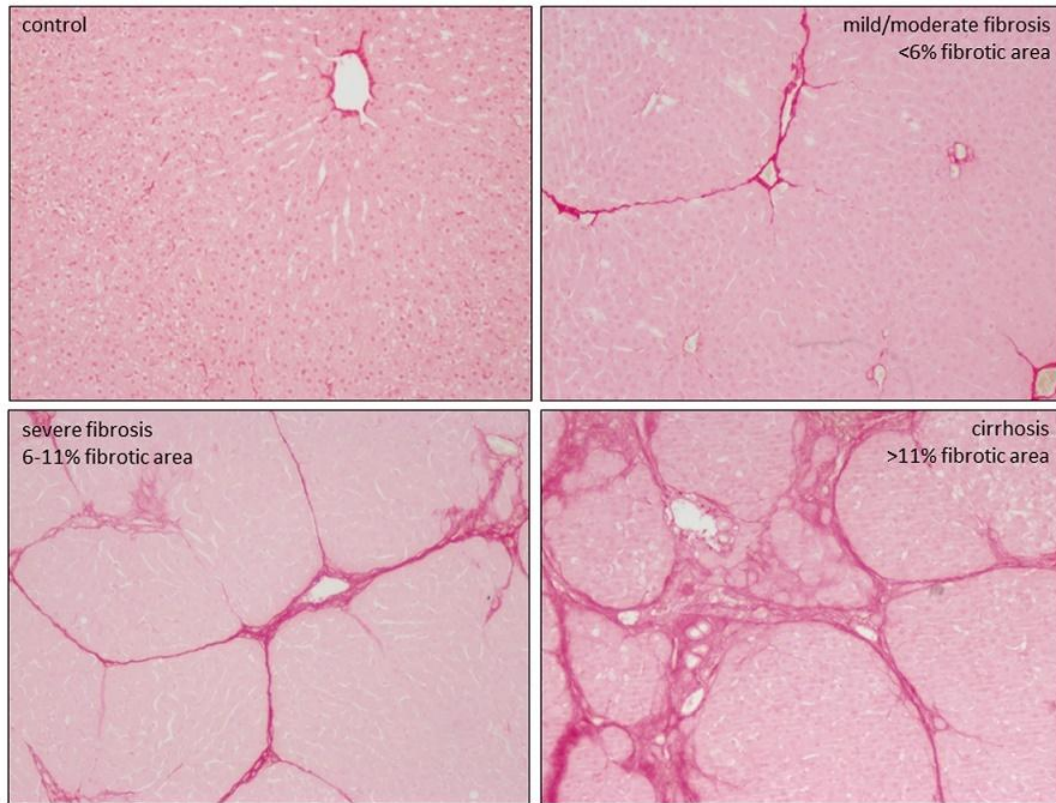


Figure S1: Representative liver-collagen content of control, mild and moderate fibrotic, severe fibrotic and cirrhotic rats. Representative photomicrographs of liver sections stained with Sirius Red corresponding to the control group and all the different stages of fibrosis in CCl₄-treated rats. As a consequence of the chronic liver injury, there was a progressive accumulation of extra cellular matrix in the hepatic tissue.

Table S1: Summary of the 45 most discriminatory proteins detected between rats with fibrosis and the control group.

Protein-coding gene	Fold Change	Average Expression	t	P Value	Adjusted P Value	B
HBA	-2.12	11.59	-11.38	8.46E-08	1.23E-05	8.52
MYO5A	1.58	11.71	10.10	3.13E-07	2.29E-05	7.22
HPT	-1.95	13.49	-9.33	7.33E-07	3.57E-05	6.36
HBB1	-2.15	10.36	-8.81	1.35E-06	4.28E-05	5.74
FINC	1.35	11.74	8.67	1.61E-06	4.28E-05	5.56
A1I3	1.62	19.16	8.59	1.76E-06	4.28E-05	5.47
FBP1L	1.46	13.39	8.37	2.32E-06	4.85E-05	5.19
EST2	-1.18	16.54	-7.13	1.18E-05	2.13E-04	3.53
XIRP2	0.93	12.35	7.05	1.31E-05	2.13E-04	3.42
MPPE1	1.10	10.96	6.89	1.66E-05	2.21E-04	3.18
APOB	-0.84	12.02	-6.88	1.67E-05	2.21E-04	3.18
EXOC3	1.31	12.49	5.72	9.52E-05	1.16E-03	1.39
SAMP	1.27	10.68	5.61	1.12E-04	1.26E-03	1.22
FETUA	-0.75	19.44	-5.56	1.23E-04	1.28E-03	1.13
AKAP4	1.66	9.47	5.46	1.45E-04	1.40E-03	0.96
CERU	-0.43	16.81	-5.42	1.54E-04	1.40E-03	0.89
APOE	-0.49	18.54	-5.26	2.01E-04	1.72E-03	0.62
RAD50	1.05	11.23	5.09	2.65E-04	2.15E-03	0.33
TRFE	-1.07	20.23	-5.01	3.02E-04	2.32E-03	0.20
EPO	-0.71	11.43	-4.88	3.73E-04	2.72E-03	-0.02
SPA3L	1.07	16.54	4.76	4.59E-04	3.19E-03	-0.23
AT2A1	0.66	12.22	4.66	5.47E-04	3.63E-03	-0.41
TPM2	-1.23	10.61	-4.62	5.88E-04	3.73E-03	-0.48
KIF2C	0.88	16.06	4.51	7.05E-04	4.29E-03	-0.67
HRG	-0.77	15.85	-4.46	7.76E-04	4.53E-03	-0.76
PDK1	-3.81	12.11	-4.33	9.78E-04	5.49E-03	-1.00
CG031	8.99	5.11	4.20	1.21E-03	6.57E-03	-1.22
NUCL	0.71	16.44	4.18	1.27E-03	6.62E-03	-1.27
GELS	0.47	13.93	4.05	1.60E-03	8.03E-03	-1.50
FA9	-4.87	9.00	-3.72	2.93E-03	1.37E-02	-2.11
MUG2	0.78	11.16	3.72	2.94E-03	1.37E-02	-2.11
CO4	-0.37	14.70	-3.70	3.01E-03	1.37E-02	-2.14
PZRN3	2.37	9.51	3.58	3.79E-03	1.65E-02	-2.37
RIMB1	7.37	4.17	3.57	3.84E-03	1.65E-02	-2.39
NUAK2	-0.45	13.85	-3.48	4.51E-03	1.88E-02	-2.55
CBPB2	-2.95	13.89	-3.47	4.63E-03	1.88E-02	-2.57
PON1	0.65	12.11	3.40	5.22E-03	2.06E-02	-2.69
VPS52	-1.13	12.04	-3.37	5.52E-03	2.12E-02	-2.75
PLMN	-0.55	17.28	-3.32	6.08E-03	2.27E-02	-2.85

LUM	0.82	8.98	3.31	6.21E-03	2.27E-02	-2.87
MRCKB	-0.42	11.74	-3.21	7.45E-03	2.65E-02	-3.05
SPAT1	0.54	14.50	3.14	8.54E-03	2.97E-02	-3.18
SI1L1	6.37	4.00	3.07	9.77E-03	3.32E-02	-3.32
APOH	-0.58	14.59	-3.00	1.11E-02	3.60E-02	-3.44
LRP2	-0.63	11.45	-3.00	1.11E-02	3.60E-02	-3.44

2n article.

La falta del fragment C-terminal de la cadena α del fibrinogen, de 5,9 kDa, precedeix la progressió de fibrosi en pacients amb malaltia hepàtica

La detecció precoç de la fibrosi hepàtica és de gran importància tant pel pronòstic com pel tractament dels pacients amb una malaltia hepàtica crònica. Una de les limitacions que existeix per aconseguir aquesta fita però, és la dificultat alhora d'obtenir mostres de pacients en estadis molt inicials del procés fibròtic. Amb l'excepció de la insuficiència hepàtica fulminant, la fibrosi hepàtica presenta una progressió lenta i una manca de manifestacions clíniques evidents fins i tot anys després del seu inici (Hernández-Gea i Friedman, 2011). En aquest context, l'ús de models animals ha estat de gran utilitat gràcies a la possibilitat d'obtenció de mostres biològiques ben definides en estadis molt inicials de la malaltia. Tot i això, continua essent necessària la validació final en pacients fibròtics per confirmar els resultats obtinguts. Una altra possible estratègia per afrontar aquest repte és l'anàlisi proteòmic directament en pacients amb VHC i sotmesos a un trasplantament hepàtic. Una de les característiques particulars que presenta aquesta població és la ràpida reinfecció de l'empelt després de la cirurgia que, sovint, es tradueix en una acceleració del procés fibròtic (Féray et al., 1992). De fet, al voltant del 30% d'aquests pacients presenta cirrosi als 5 anys del trasplantament hepàtic (Charlton et al., 2015). Així doncs, l'anàlisi de mostres sèriques d'aquests pacients constitueix una alternativa interessant per determinar nous biomarcadors no invasius d'inici del procés fibrogènic.

En aquest segon estudi, es va aprofitar la major rapidesa en el desenvolupament de fibrosi hepàtica dels pacients amb VHC i sotmesos a un trasplantament hepàtic per tal de determinar nous biomarcadors d'inici del procés fibrogènic i definir-ne el seu mecanisme. Un total de 159 mostres sèriques de diferents poblacions foren analitzades. Concretament, 19 pacients van ésser agrupats en el grup de definició i la resta en els diferents grups de validació. Els resultats d'aquest segon treball s'exposen a continuació:

1. Perfils proteòmics diferencials entre els pacients trasplantats amb recurrència i sense recurrència del VHC

El grup de definició fou constituït per dos tipus de pacients clarament diferenciats. El primer d'ells, el grup control, estava format per 9 pacients que inicialment presentaven VHC però que aconseguiren una resposta virològica sostinguda després de sotmetre's a un tractament antiviral abans del trasplantament hepàtic. El segon, estava compost per 10

pacients amb VHC i que presentaren recurrència del virus després de la cirurgia. Les mostres sèriques de tots els pacients es van obtenir 6 mesos després del trasplantament hepàtic. Les principals característiques demogràfiques d'ambdós grups es troben detallades a la Taula 1. Com era d'esperar, aquells pacients que presentaven una recurrència del VHC després de la intervenció quirúrgica va mostrar valors més elevats en l'índex ELF, així com de les aminotransferases AST i ALT. El GPVH també estava alterat en aquest grup. A nivell proteòmic, el patró d'expressió del grup control fou clarament dispar al del grup de pacients amb recurrència del VHC (Figura 1). Sis proteïnes estadísticament significatives van ésser detectades (Taula 2), essent el pic proteic amb una relació massa/càrrega (m/z) de 5.905 (5,9 kDa) el més destacat (pic "A"). Concretament, els pacients sense recurrència del VHC presentaven una elevada intensitat del pèptid mentre que en els pacients amb recurrència del VHC aquest era quasi inexistent.

2. Confirmació de la supressió del pic proteic de m/z 5.905 a causa del procés fibrogènic

Per confirmar que els canvis observats eren específicament deguts al procés fibrogènic i no pas a altres factors derivats de les característiques particulars dels pacients amb VHC i sotmesos a un trasplantament hepàtic, es varen analitzar mostres sèriques d'individus sans, pacients amb VHC sense haver estat sotmesos a un trasplantament hepàtic i pacients fibròtics i cirròtics amb una etiologia diferent a la del VHC. La Taula 3 resumeix les característiques clíniques i demogràfiques de tots els grups inclosos. Com anteriorment, els perfils proteòmics obtinguts per espectrometria de masses van confirmar el pic proteic de m/z 5.905 com el més diferencial entre grups (Figura 2). En concret, els individus sans presentaren una alta intensitat del pic en qüestió en comparació amb la resta de pacients fibròtics. De fet, la intensitat del pic de m/z 5.905 era quasi negligible en tots els pacients fibròtics, amb independència de la seva etiologia. Aquestes observacions varen indicar que ni el VHC ni el trasplantament hepàtic intervenien en la supressió de la intensitat del pic de m/z 5.905.

3. Validació del pic proteic de m/z 5.905

Per validar els resultats observats en un grup major de pacients, es van analitzar per SELDI-TOF MS 83 mostres sèriques de pacients amb VHC obtingudes 6 mesos després del trasplantament de fetge. El GPVH es va poder determinar en 53 d'ells, obtenint un valor promig de $5,5 \pm 0,8$ mm Hg. De nou, les intensitats dels pics proteics obtinguts van ser similars a les observades amb anterioritat en els altres grups de pacients fibròtics (Data S4). En concret, l'abundància de m/z 5.905 es trobava en nivells inferiors a $10 \mu A$ en més del 60% dels pacients.

La resta dels pacients fibròtics presentaren intensitats de fins a 81,4 μ A (Figura 3), tot i que eren clarament menors a les observades prèviament en els individus sans (391,9 \pm 43,1 μ A).

4. Identificació del pic proteic de m/z 5.905

Per poder aïllar i posteriorment identificar el potencial biomarcador, es van seleccionar les dues mostres sèriques dels individus sans que mostraren una major intensitat del pic de 5,9 kDa. Ambdues mostres van ésser barrejades i seguidament es va procedir a l'enriquiment per mitjà de resines cromatogràfiques, i a l'aïllament i separació del pic en qüestió per mitjà d'una electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS i tricina (tricine-SDS-PAGE) (Figura 4A,B). La banda proteica obtinguda es va escindir, tripsinitzar i finalment analitzar per espectrometria de masses en tàndem. Com es mostra a la Figura 4C, dues seqüències peptídiques van ésser identificades, les quals coincidien amb part de la seqüència aminoacídica de la cadena α del fibrinogen. Aquesta informació va permetre suggerir que la supressió del fragment peptídic de 5,9 kDa de la cadena α del fibrinogen era un marcador precoç de la fibrogènesi activa en pacients amb una malaltia hepàtica crònica.

5. Mecanisme de regulació de la cadena α del fibrinogen

Per determinar els potencials mecanismes encarregats de modular l'alteració sèrica del fragment peptídic de 5,9 kDa, la línia cel·lular HepG2 fou tractada durant 6 hores amb diferents estímuls proinflamatoris i profibrogènics (TNF- α , LPS, IL-1 β , AII, ET-1, apelina, fibronectina i TGF- β) i es va analitzar l'expressió de les cadenes α , β i γ del fibrinogen. Fent ús d'aquest model *in vivo*, només el factor de creixement TGF- β va induir canvis significatius en l'expressió de la cadena α del fibrinogen. En concret, va comportar una notable reducció d'aquesta cadena deixant inalterades les cadenes β i γ del fibrinogen (Figura 5). Finalment, l'anàlisi del secretoma, per mitjà del SELDI-TOF MS, de les cèl·lules HepG2 tractades amb TGF- β durant 48 hores va mostrar una reducció de l'abundància del fragment peptídic de 5,9 kDa en comparació amb les cèl·lules no tractades.



Lack of a 5.9 kDa Peptide C-Terminal Fragment of Fibrinogen α Chain Precedes Fibrosis Progression in Patients with Liver Disease

Santiago Marfà¹, Gonzalo Crespo², Vedrana Reichenbach¹, Xavier Forns², Gregori Casals¹, Manuel Morales-Ruiz¹, Miquel Navasa², Wladimiro Jiménez^{1,3*}

1 Biochemistry and Molecular Genetics Service, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Liver Unit, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Departament de Ciències Fisiològiques I, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

Early detection of fibrosis progression is of major relevance for the diagnosis and management of patients with liver disease. This study was designed to find non-invasive biomarkers for fibrosis in a clinical context where this process occurs rapidly, HCV-positive patients who underwent liver transplantation (LT). We analyzed 93 LT patients with HCV recurrence, 41 non-LT patients with liver disease showing a fibrosis stage $F \geq 1$ and 9 patients without HCV recurrence who received antiviral treatment before LT, as control group. Blood obtained from 16 healthy subjects was also analyzed. Serum samples were fractionated by ion exchange chromatography and their proteomic profile was analyzed by SELDI-TOF-MS. Characterization of the peptide of interest was performed by ion chromatography and electrophoresis, followed by tandem mass spectrometry identification. Marked differences were observed between the serum proteome profile of LT patients with early fibrosis recurrence and non-recurrent LT patients. A robust peak intensity located at 5905 m/z was the distinguishing feature of non-recurrent LT patients. However, the same peak was barely detected in recurrent LT patients. Similar results were found when comparing samples of healthy subjects with those of non-LT fibrotic patients, indicating that our findings were not related to either LT or HCV infection. Using tandem mass-spectrometry, we identified the protein peak as a C-terminal fragment of the fibrinogen α chain. Cell culture experiments demonstrated that TGF- β reduces α -fibrinogen mRNA expression and 5905 m/z peak intensity in HepG2 cells, suggesting that TGF- β activity regulates the circulating levels of this protein fragment. In conclusion, we identified a 5.9 kDa C-terminal fragment of the fibrinogen α chain as an early serum biomarker of fibrogenic processes in patients with liver disease.

Citation: Marfà S, Crespo G, Reichenbach V, Forns X, Casals G, et al. (2014) Lack of a 5.9 kDa Peptide C-Terminal Fragment of Fibrinogen α Chain Precedes Fibrosis Progression in Patients with Liver Disease. PLoS ONE 9(10): e109254. doi:10.1371/journal.pone.0109254

Editor: Ratna B. Ray, Saint Louis University, United States of America

Received: April 22, 2014; **Accepted:** September 5, 2014; **Published:** October 2, 2014

Copyright: © 2014 Marfà et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that, for approved reasons, some access restrictions apply to the data underlying the findings. Proteomics data derived from all the individuals are all contained within the supporting information file. Other information that may interfere with patient privacy will be provided upon request at Biomedical Diagnostic Center, Hospital Clínic, Barcelona (atencioclientcdb@clinic.ub.es).

Funding: This work was supported by grants Dirección General de Investigación Científica y Técnica (SAF 2009-08839 and SAF 2012-35979 to W. Jiménez and SAF 2010-19025 to M. Morales-Ruiz) and from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (SGR 2009/1496). CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III. This work is co-financed by the European Union through the European Regional Development Fund (ERDF), "A way of making Europe". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: wjimenez@clinic.ub.es

Introduction

Early detection of fibrosis progression and the development of portal hypertension is of major relevance in the prognosis and treatment of patients with chronic liver disease [1]. Indeed, early recognition of subjects prone to develop these alterations may allow prompt initiation of therapeutic interventions. Therefore, identification of noninvasive biomarkers related to the activation of the fibrogenic process is of major relevance, particularly in those subjects with sustained liver injury [2]. However, despite the numerous attempts to uncover such molecules, this objective has resulted elusive. This is likely related to the natural history of liver disease. With the exception of fulminant hepatic failure, liver

disease is an insidious process in which clinical detection and symptoms of hepatic decompensation may occur weeks, months or many years after the onset of injury, and healing may occur without clinical detection [3]. However, in particular clinical circumstances, i.e. patients infected with the hepatitis C virus (HCV), submitted to liver transplantation (LT), it is possible to expect recurrence of hepatic fibrosis and portal hypertension to occur within a short period of time [4]. Thus, these patients constitute a population particularly suitable to identify noninvasive markers of early fibrogenesis.

The current investigation took advantage of the faster development of hepatic fibrosis in HCV-positive LT patients. Serum samples were collected shortly after LT and high-throughput

proteomic techniques were used to ascertain whether the proteomic pattern of these samples differs from the proteomic pattern expression obtained from serum samples of non-infected LT patients. Ultimately, the investigation was aimed to identify early circulating serum biomarkers of active fibrogenesis in patients with liver disease.

Materials and Methods

Patients

One hundred and nineteen patients admitted to the Liver Unit to undergo a liver biopsy from June 2001 to January 2006 were prospectively considered for this study. Exclusion criteria were presence of ascites, chronic kidney failure in hemodialysis and moderate or severe acute graft rejection during the first three months, biliary complications or antiviral treatment during the first year after LT in the case of LT recipients. In addition 16 healthy volunteers were also included in the study.

The design of the study was two folded: first we assessed whether the serum proteomic profile of recurrent HCV-LT patients differs from that of non-recurrent HCV-LT patients. The serum proteomic profile and routine liver and renal function tests were initially analyzed in a training set of 10 HCV-RNA recurrent LT patients 6 months post LT that showed a fibrosis stage $F \geq 1$ at 1 year after LT. Paired hepatic venous pressure gradient (HVPG) determination was also available in 7 of these patients. The control group consisted in 9 patients without HCV-RNA recurrence, who underwent antiviral treatment before LT and achieve sustained virological response. In addition, serum samples were also collected from 41 non-LT patients with advanced liver disease. The HCV or hepatitis B virus (HBV) was present in 8 and 3 of these patients, respectively, whereas the etiology of liver disease was other than viral in the remaining (9 nonalcoholic steatohepatitis, NASH; 10 alcoholic liver disease, ALD; 4 autoimmune hepatitis, AH; and 7 cryptogenic). Thereafter, the results were validated in a test set of 83 HCV recurrent LT patients. Serum samples were also collected 6 months post-transplantation and the proteomic profile was evaluated along with liver and renal function tests. HVPG measurement in 53 of these patients was also performed.

Liver Biopsies and paired HVPG measurements

Percutaneous and transjugular liver biopsies and HVPG measurements were performed as we have previously described [5]. Fibrosis stage was scored using the Scheuer classification: no fibrosis (F0), minimal portal fibrosis (F1), periportal fibrosis (F2), fibrosis beyond the portal tract making septums (F3) and cirrhosis (F4) [6].

Serum fractionation

See (Data S1).

High-throughput proteomic processing of serum samples

Protein profiling was performed by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) using the eight-spot format CM10 (weak cationic exchange) ProteinChip arrays (Bio-Rad). In a preliminary study performed to set up the experimental conditions, 2 pooled serum samples from the 9 patients without HCV-RNA recurrence and the 10 patients included in the training set were loaded onto three different types of Protein Chip arrays: H50 (that binds proteins through reverse phase or hydrophobic interactions), CM10 (negatively charged surface that acts as a weak cation-exchanger)

and IMAC-30 (Immobilized Metal Affinity Capture surface preactivated with copper). The resulting spectra from each pool were compared and the CM10 array showed the highest number of peaks detected and the highest total signal intensity compared to H50 and IMAC-30; therefore only the CM10 array was used in the subsequent studies. Prior to sample loading, spots were equilibrated two times with 200 μ l of CM binding/washing buffer (0.1 M sodium acetate, pH 4). Each sample was loaded in duplicate randomly in order to minimize any systematic error. Forty microliters of fractionated serum sample was incubated in 60 μ L of CM binding buffer for 30 minutes on a shaker at room temperature. Afterwards, arrays were washed three times with 200 μ L CM washing buffer for 5 minutes at room temperature. Unbound serum proteins were removed by washing twice with deionized water. Thereafter, arrays were air-dried and 1 μ L of energy-absorbing matrix (saturated sinapinic acid in an aqueous solution containing 50% acetonitrile and 0.5% TFA) was added twice to each spot. The surface was allowed to air dry between each application. The array was read by using the ProteinChip PBS II reader (BioRad). Each spot was read at low (2500 nJ), medium (3000 nJ) and high (3500 nJ) energy laser intensities. The mass-to-charge ratio (m/z) was set from 1.000 to 25.000 m/z for the low-energy laser intensity, between 2.500 and 200.000 m/z for the medium-energy laser intensity and from 5.000 to 200.000 for the high-energy laser intensity. All spectra were calibrated using two external calibration standards (all-in-one peptide standard and all-in-one protein standard, BioRad). A peak resolution was optimized within 5.000 m/z , 12.000 m/z or 19.000 m/z according to low, medium or high energy laser intensity, respectively.

Data acquisition and analysis

All data were processed with the ProteinChip Data Manager Client 4.1 software (Bio-Rad). To minimize the possible random error and spectral outliers, all the raw data was normalized by the average total ion current across the group and all spectra differing by twice the standard deviation or more from the mean were deleted. Furthermore, the baseline was also corrected by adjusting the parameter to 30 times the expected peak width. For the peak selection, several parameters were selected for the identification of peak clusters. Thus, only peaks with a signal to noise equal or greater than 5; with a valley depth superior than three; found in a minimum of 20% of all spectra and with an m/z error below the 0.3% for the low-energy laser intensity spectra and below 2% for the medium- and high-energy laser intensity spectra, were considered. Subsequently, all peak clusters detected were verified manually. Relabeling, removal or addition of peaks was performed when necessary. To test the quality of the assay, pooled normal sera from two individuals was assessed. Five protein peaks randomly selected over the course of the study were used to calculate the coefficient of variance (CV) as described [7]. We then determined the reproducibility of the SELDI spectra, both within and between arrays (intra-assay and inter-assay, respectively). The intra-assay (spot to spot) CV was 11.95% for peak intensity and 0.02% for mass accuracy. The inter-assay (chip to chip) CV was 21.96% for peak intensity and 0.03% for mass accuracy.

Identification of candidate biomarker

See (Data S2).

Cell Culture

HepG2 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). This immortalized, stable cell line can be repeatedly frozen, thawed and propagated. HepG2 cells were seeded (2×10^6 cells/well) in vented T-75 flasks

Table 1. Baseline characteristics of liver transplant recipients in non recurrent and recurrent hepatitis C patients.

	NON RECURRENT HCV SUBJECTS (n = 9)	RECURRENT HCV SUBJECTS (n = 10)	P*
Sex (M/F)	7/2	3/7	
Age (yr)	53.9±3.3	55.9±2.3	NS
Fibrosis score (1 yr after LT)			
F 1–2 (n)	-	4	
F 3–4 (n)	-	6	
HVPG (1 yr after LT)			
HVPG <6 mm Hg (n)	-	0	
HVPG 6–10 mm Hg (n)	-	2	
HVPG ≥10 mm Hg (n)	-	5	
Bilirubin (mg/dl)	0.9±0.1	1.3±0.3	NS
Albumin (g/l)	43.1±1.1	37.8±2.1	<0.05
BUN (mg/dl)	27.4±3.5	34.0±3.4	NS
AST (U/l)	28.9±4.5	152.3±47.1	<0.001
ALT (U/l)	37.7±6.6	202.7±60.9	<0.001
Total proteins (g/l)	67.9±1.6	63.1±3.3	NS
PT(%)	93.2±2.4	86.3±3.4	NS
ELF score	9.9±0.3	11.7±0.5	<0.05

*in comparison to non recurrent HCV subjects (Mann-Whitney U test), NS: non significant. Results are given as mean±SEM.
doi:10.1371/journal.pone.0109254.t001

and grown to confluence in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 10% of fetal calf serum (FCS). Thereafter, cells were switched to 1% FCS and incubated (37°C) under normoxic

(21% O₂, 5% CO₂) or hypoxic conditions (5% O₂, 5% CO₂) in a controlled O₂ water-jacketed CO₂ incubator (Forma Scientific Series II, 3131, Marietta, OH) or treated with TNF-α (10 ng/ml, Sigma, St Louis, MO), lipopolysaccharide (LPS, 10 ng/ml,

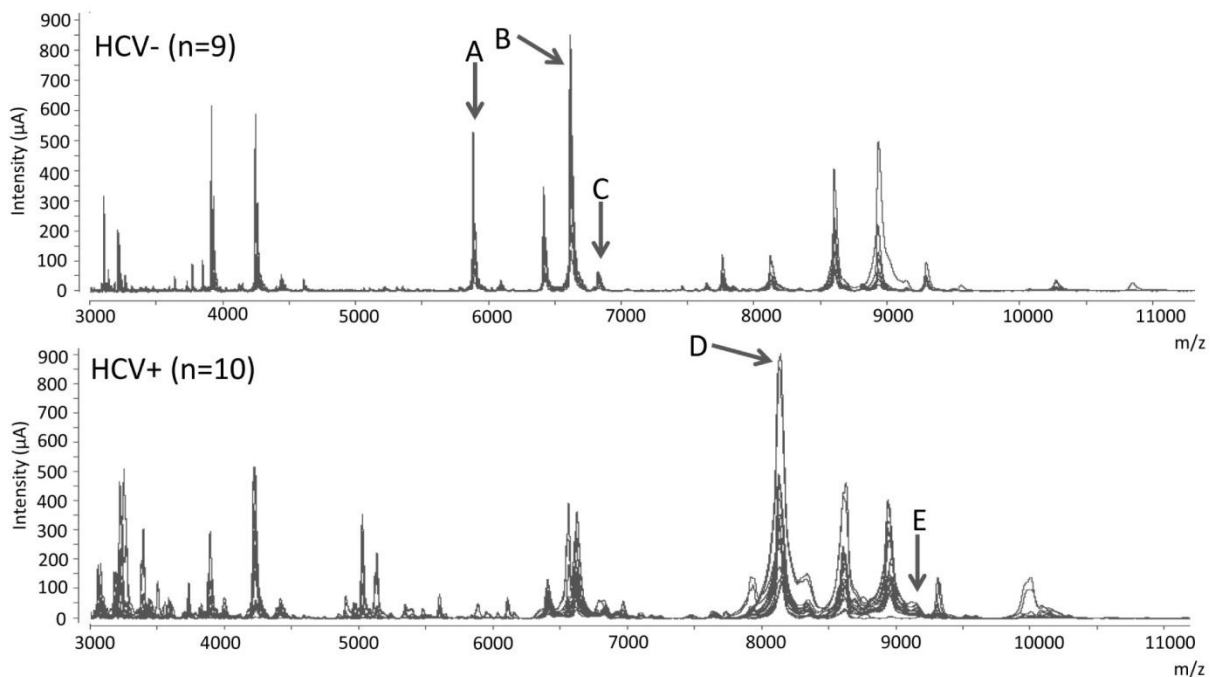


Figure 1. Differential proteomic profile between HCV– and HCV+ patients submitted to LT. Fragment ranging from 3000 to 11000 m/z of the differential SELDI-TOF-MS spectra of all serum samples obtained from patients 6 months after LT. The upper figure shows all overlapped spectra from HCV-negative patients (n = 9). The bottom figure shows the spectra from HCV-infected patients (n = 10). Arrows indicate peaks showing significantly different intensities between HCV– and HCV+ patients. Upper letters correspond to the identification peak noted in table 2.
doi:10.1371/journal.pone.0109254.g001

Table 2. Intensity values (μ A) of peaks showing different patterns of expression in the two groups of patients.

PEPTIDE	m/z (Da)	NON RECURRENT HCV SUBJECTS (n = 9)	RECURRENT HCV SUBJECTS (n = 10)
A	5905	257.1 \pm 43	5.99 \pm 3.49 ^d
B	6639	687.4 \pm 96.3	176.8 \pm 32.5 ^c
C	6845	71.9 \pm 8.9	27.13 \pm 5.42 ^b
D	8144	76.9 \pm 22.5	392.8 \pm 64.8 ^d
E	9172	15.1 \pm 6.4	26.03 \pm 3.37 ^a
F	12986	6.6 \pm 1.2	1.99 \pm 0.41 ^a

^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001, ^dp<0.0001; in comparison to non recurrent HCV subjects (Mann-Whitney U test). Results are given as mean \pm SEM.
doi:10.1371/journal.pone.0109254.t002

Sigma), AII (80 pM, Sigma), Endothelin-1 (2 nM, Sigma), Apelin (100 nM, Phoenix Pharmaceuticals, Burlingane, Ca), Fibronectin (10 ng/ml, Sigma), Interleukin-1 β (20 ng/ml, Sigma) and TGF- β (10 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, Mn). All experiments carried out in cell lines were reproduced three times in at least 2 independent assays. Conditioned media were harvested, concentrated (80:1) using 3000 MW Amicon Ultra centrifugal filters (Millipore Corp) and the presence of the fibrinogen α C-chain was assessed by SELDI-TOF-MS as described above.

Messenger RNA expression of human fibrinogen α , β , and γ chains in HepG2 cells

See (Data S3).

Measurements and statistical analysis

The same day of the liver biopsy, 20 ml of blood were obtained in a fasting status. Serum was stored at -80°C , and serum albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine transaminase (ALT), bilirubin and blood urea nitrogen (BUN) were measured with the ADVIA 2400 Instrument (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). Amino-terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP), hyaluronic acid (HA), and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase type-1 (TIMP-1) were measured in all patients by a CE-marked random-access automated clinical immunochemistry analyzer that performs magnetic separation enzyme immunoassay tests (ADVIA Centaur, Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). The enhanced liver fibrosis (ELF) score was calculated using the algorithm recommended in the CE-marked assay [ELF = 2.278 + 0.851 ln(HA) + 0.751 ln(PIIINP) + 0.394 ln(TIMP-1)] blood tests.

Statistical analysis of the results was performed by the non parametric Mann-Whitney U test and the Kruskal-Wallis test with the Dunn post hoc test as appropriated. Quantitative data were analyzed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA).

Ethics Statement

We obtained written informed consent from all patients included in the study and the investigation was approved by the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona following the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

Results

Mass Spectrogram of LT patients with early fibrosis recurrence significantly differs from that of non recurrent LT patients

The principal demographic values of patients included in the definition group are shown in Table 1. As per the selection criteria, most recurrent HCV patients showed higher fibrosis and ELF scores, elevated HVPG measures and greater AST and ALT values than non recurrent HCV subjects. Figure 1 depicts a portion of the spectra of all the samples investigated in this training group, ranging between 3000 and 11000 Daltons; the mass to charge ratio analyzed. The expression pattern of the spectrograms obtained from non recurrent HCV patients clearly differed from those of recurrent HCV subjects. Six statistically different peaks, identified in the figure as peptides A, B, C, D, and E, were detected. As shown in Table 2 the signal intensity of four of these peaks (A, B, C, and F) was markedly higher in non recurrent than in recurrent patients whereas an inverse situation was observed in the remaining two peaks (D and E). The most remarkable difference was detected on analyzing peptide A (5905 m/z), since it was fully evident in all samples obtained from non recurrent HCV patients but almost suppressed in the serum of recurrent HCV individuals.

Neither LT nor HCV infection account for Mass Spectrogram differences in patients with active fibrogenesis

An intriguing question arising from the above described results was to elucidate whether these findings result from the particular characteristics of HCV transplanted patients rather than to a differential feature characterizing early fibrogenic processes. Thus, the serum proteomic spectrum was next analyzed in healthy individuals, in non-LT fibrotic HCV infected patients and in non HCV fibrotic patients. The clinical and demographic characteristics of these subjects are shown in table 3. Fibrosis scores and liver function tests of the two groups of fibrotic patients were similar to those obtained in HCV LT patients. The mass spectrograms of all individuals included in this portion of the investigation are shown in figure 2. The upper, middle and lower parts correspond to healthy subjects, fibrotic non HCV subjects and fibrotic HCV patients, respectively. Since in the previous experiments the most striking differences were observed with peptide A, in this and the subsequent experiments we focused on the peak with a mass/charge ratio of 5905 Da. All serum samples analyzed from healthy subjects showed a spectrogram compatible with the presence of this peptide whereas pathological serum

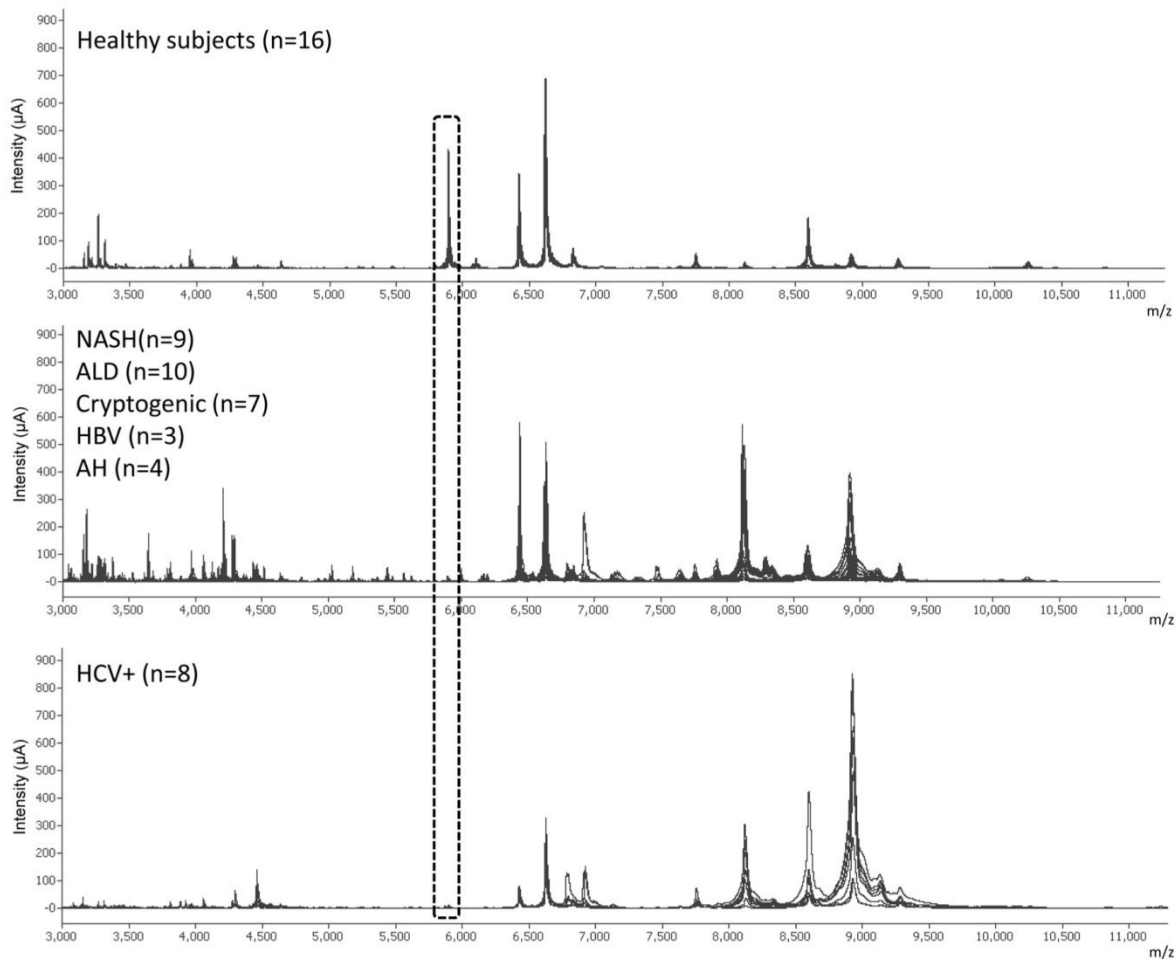


Figure 2. Lack of the 5.9 kDa protein peak in non-LT fibrotic patients. Portion of the SELDI-TOF-MS spectra comprised between 3000 and 11000 m/z of serum samples obtained from healthy subjects (n = 16) and patients with liver fibrosis of several etiologies (NASH, ALD, cryptogenic, AH, HBV and HCV). The lack of the protein peak at m/z 5905 is clearly associated with fibrogenesis regardless of its etiology. doi:10.1371/journal.pone.0109254.g002

samples, either from fibrotic non LT HCV patients or fibrogenic non HCV subjects showed the absence of this peptide or very low intensity peaks. These results indicate that neither HCV nor LT account for the suppressed expression of the A peptide in serum samples of fibrotic patients.

The Mass Spectrogram of most HCV infected patients lacks a 5.9 kDa fragment

To further confirm that peptide A behaves as an early serum biomarker of fibrosis, mass spectrometric analysis was performed in a test group of serum samples obtained from 83 HCV recurrent patients 6 months after LT. HVPG was assessed in 53 of these patients and the average value was of 5.5 ± 0.8 mm Hg. All the serum samples showed a quite similar expression pattern and coincidences included both the different peptide fragments detected and the signal intensity of these fragments (Data S4). The most relevant finding was, however, that the mass spectrum corresponding to peptide A showed a very low peak intensity in all samples obtained from HCV recurrent patients. In fact, in 53 out of the 83 patients the peak intensity at m/z 5905 was under the background levels of 10 μ A and in the remaining samples, intensities ranged between 11.5 and 81.4 μ A (figure 3). Thus, these results confirm the findings obtained in the training group in a larger group of subjects.

The 5.9 kDa protein is a C-terminal fragment of the fibrinogen α chain

To isolate the protein of interest and to determine candidate protein identity, serum samples from two healthy subjects containing high SELDI intensity were pooled and separated by tricine-SDS-PAGE (figure 4B). The band at 5.9 kDa was excised trypsinized and analyzed by LC-MS/MS. As shown in figure 4C, two peptide sequences were identified, which matched with the human fibrinogen α C-chain at 3.23% coverage, suggesting that suppression of the fibrinogen α C-chain 5.9 kDa fragment is an early surrogate indicative of active fibrogenesis in patients with liver disease.

TGF- β reduces the expression of the fibrinogen α chain but not of the β and γ chain in HepG2 cells assays

To unveil potential mechanisms governing the release of the 5.9 kDa peptide C-terminal fragment of the fibrinogen α chain in the serum of patients under an early fibrogenic process, HepG2 cells were treated with well known proinflammatory stimuli (TNF- α , LPS and Il-1 β) or profibrogenic substances (AII, ET-1, Apelin, Fibronectin and TGF- β) for 6 hours. With the exception of TGF- β , none of these substances induced significant changes in the expression of human fibrinogen chains messenger. However,

Table 3. Baseline characteristics of healthy subjects and HCV-infected and non-infected fibrotic patients.

	HEALTHY SUBJECTS (n = 16)	HCV INFECTED PATIENTS (n = 8)	NON INFECTED FIBROTIC PATIENTS (n = 33)
Sex (M/F)	(9/7)	(5/3)	(19/14)
Age (yr)	35.6±2.5	48.7±3.6	52.3±2.4***
Fibrosis score			
F 1–2 (n)	-	2	11
F 3–4 (n)	-	6	22
Etiology			
HCV (n)	-	8	-
HBV (n)	-	-	3
NASH (n)	-	-	9
ALD (n)	-	-	10
AH (n)	-	-	4
Cryptogenic (n)	-	-	7
Bilirubin (mg/dl)	0.6±0.1	0.5±0.06	1.2±0.2 ^{a,b}
Albumin (g/l)	41.0±1.5	42.9±0.6	40.9±1.2
BUN (mg/dl)	15.2±2.1	14.4±1.6	18.1±2.2
AST (U/l)	20.9±1.6	64.0±7.9***	56.3±6.6***
ALT (U/l)	15.9±2.3	82.1±8.8***	79.1±15.4***
Total proteins (g/l)	71.3±1.2	78.6±2.3	75.4±1.7
PT(%)	96.5±0.9	89.8±3.1	86.4±2.4*
ELF score	8.6±0.4	9.6±0.6	9.7±0.2
INR	1.00±0.01	1.04±0.03	1.10±0.03

^ap<0.05, ^{***}p<0.001 in comparison to healthy subjects and ^bp<0.01 in comparison to HCV infected patients (Kruskal-Wallis test with the Dunn pos hoc test). Results are given as mean±SEM.
doi:10.1371/journal.pone.0109254.t003

TGF-β markedly reduced the expression of the α chain in cultured human hepatocytes. As shown in figure 5, this phenomenon was specific for the α chain since no significant changes were observed on analyzing the β and γ chain messengers. In addition, culture

media of cells treated with TGF-β displayed diminished abundance of the 5.9 kDa fragment of the fibrinogen α C-chain in comparison to untreated cells.

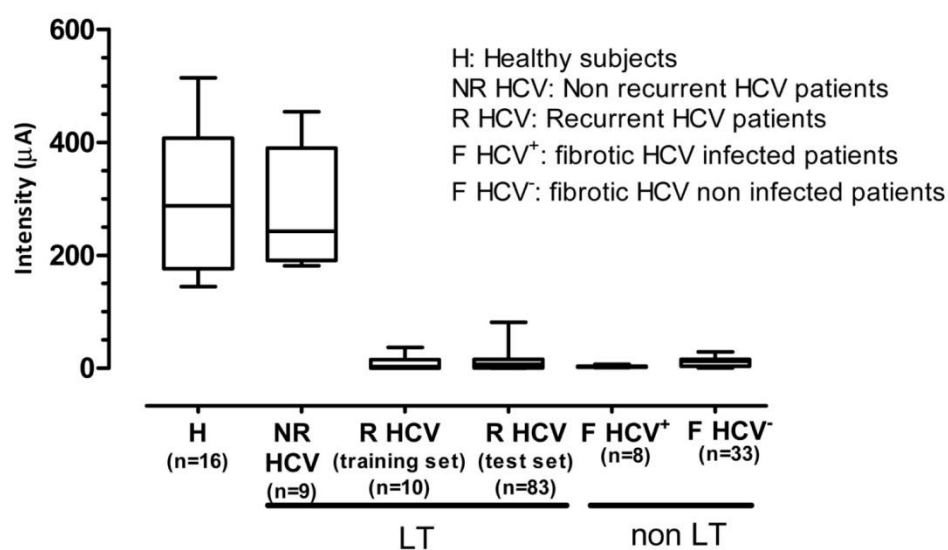


Figure 3. Comparison of the 5.9 kDa protein peak intensity between all the groups analyzed. SELDI-TOF-MS intensity values of the 5.9 kDa peak of the different groups of patients studied. Intensity of the peak was markedly suppressed in all patients under an active fibrogenic process.
doi:10.1371/journal.pone.0109254.g003

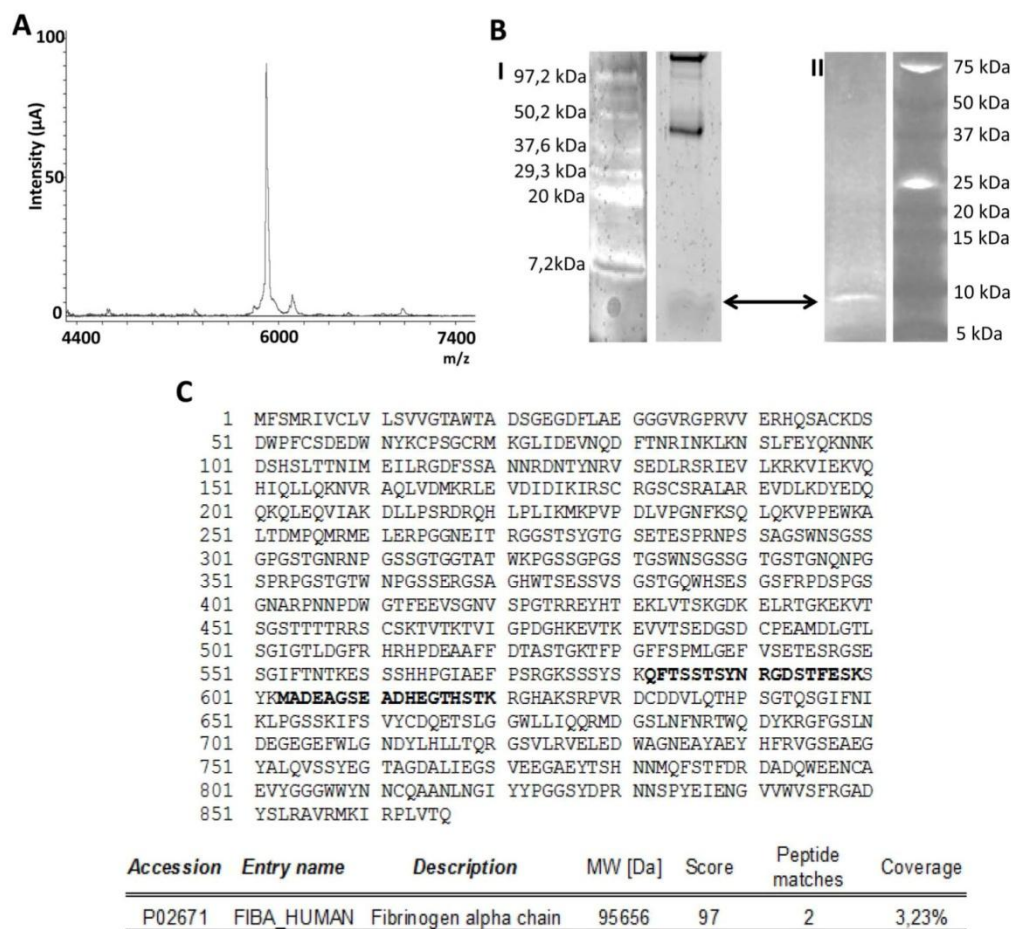


Figure 4. Isolation, separation and identification of the 5.9 kDa protein peak. A/ Spectra obtained by SELDI-TOF-MS showing the isolated protein peak after the purification process. B/ The isolated band indicated with arrows, after running two tris-tricine gels, one stained with sypro (I) and the other with oriole (II) staining. C/ Fragment of the Fibrinogen α -Chain identified as the differential protein peak by the amino acid sequencing. The two sequences identified are shown in bold. doi:10.1371/journal.pone.0109254.g004

Discussion

Evaluation of the extension and aggressiveness of the fibrogenic process in the injured liver is of major relevance for the diagnosis, prognosis and treatment of patients with hepatic disease [8]. The methods currently available to assess liver fibrosis include the serological determination of several parameters related to liver function and hepatic remodeling, imaging techniques, such as Fibroscan or ARFI and the use of invasive procedures such as HVPG measurement or liver biopsy, the latter still being the most widely accepted gold standard method for assessing liver fibrosis [9]. The specific limitations of each of these methods have been extensively discussed previously [10]. The risk of complications and low sensitivity for mild or moderate fibrosis are among the most remarkable limitations for invasive and non-invasive methods, respectively [11]. Recently, a liver fibrosis score, namely ELF, which combines the serum concentrations of substances related to collagen metabolism (PIIINP) and tissue remodeling (TIMP-1 and HA), has progressively been incorporated among the most common diagnostic tools to evaluate liver fibrosis. However, whereas this technique was found to be highly accurate in patients with advanced fibrosis (F3–F4 stage) [12–14] it appeared to be less efficacious in the diagnosis of mild or moderate fibrosis (F1–F2

stage) [15,16]. Early detection of active fibrogenic activity, therefore, still remains an open challenge in liver disease.

Fibrosis progression evolves over long periods of time, with this representing one of the most relevant difficulties to identify specific early biomarkers of fibrosis. In the current investigation this issue was overcome by assessing the proteomic profile of HCV-positive LT recipients in a training set of serum samples. Blood samples were obtained at 6 months after LT and a liver biopsy was performed 1 year after surgery to define fibrosis stage. It is well known that fibrosis progression is accelerated in recurrent hepatitis C, with 15% to 47% of LT recipients developing fibrosis/cirrhosis within the first 3 years post transplantation [17]. Therefore, rapid fibrosis progression is a major characteristic of this group of patients and for this reason they are particularly suitable to uncover serum tags of hepatic fibrosis.

SELDI-TOF-MS technology or protein chip profiling combines mass spectrometry with a surface enhanced biochip which allows uniform and reproducible binding and desorption of biomarkers [18]. SELDI-TOF-MS also incorporates sample pre-fractionation. This markedly decreases the complexity of protein rich fluids, such as serum, allowing comparison of peak intensity between samples using large sample sets [19]. In the current study, serum proteins were fractionated by anion exchange chromatography based on their isoelectric points using a pH gradient. The resulting fraction

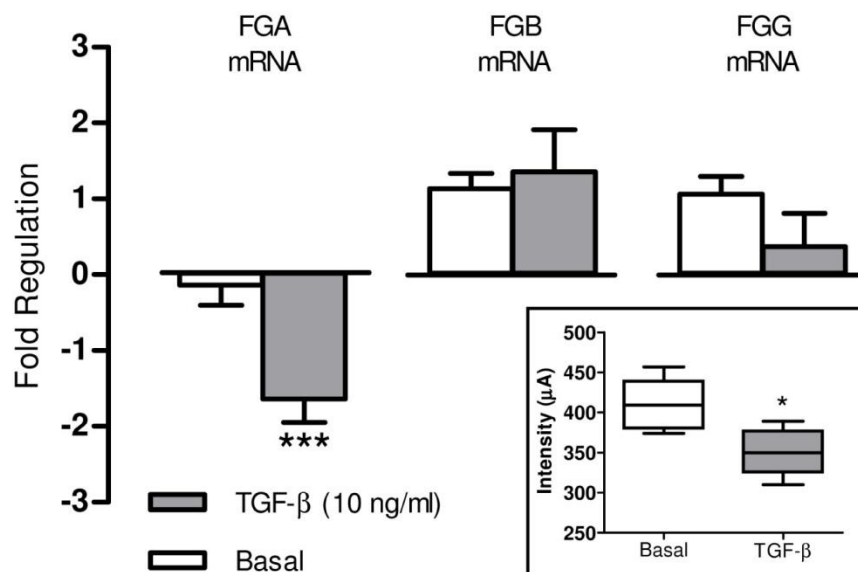


Figure 5. TGF- β reduces the fibrinogen α -chain expression in HepG2 cells. Fold regulation in Fibrinogen Alpha Chain (FGA), Beta Chain (FGB) and Gamma Chain (FGG) genes regulation in HepG2 cells after 6 hours of treatment with TGF- β (10 ng/ml). Results are given as mean \pm SE; *** p <0.001 vs. basal. Statistical analysis was calculated by unpaired Student's t test. The insert shows the intensity values of the 5.9 kDa peak detected in the cellular supernatant of HepG2 cells after 48 hours of treatment with TGF- β (10 ng/ml). Results are given as mean \pm SE; * p <0.05 vs. basal. Statistical analysis was calculated by Mann-Whitney U test. doi:10.1371/journal.pone.0109254.g005

was bound to a weak cation exchange surface to create an array of Protein Chip spots. This surface was selected according to its higher accuracy and reproducibility yields. Using this technology we were able to simultaneously detect relative protein expression levels over a range of molecular masses of 2 to 180 kDa, although the 2–20 kDa range appeared to be the most sensitive. By means of this profiling system, we found at least 6 serum biomarkers that were differentially increased or decreased in recurrent HCV patients. Among them, a protein of 5.9 kDa (protein A) was fully suppressed in the serum of all the HCV patients included in the training set. In contrast, readily detectable levels of this protein were detected in all non-recurrent HCV patients. We assessed whether LT and/or HCV infection account for the different expression patterns of peak A in serum samples of non-transplanted HCV positive and HCV negative subjects with fibrosis. The demographic and biochemical characteristics of patients with fibrosis included in the training set of samples were quite similar to those displayed by the fibrotic patients of this protocol with the exception of hepatic enzymes which, as expected, were higher in LT recurrent HCV patients than in fibrotic non-transplant patients. Both, the proteomic profile of the HCV positive samples and the proteomic profile of fibrotic patients non-infected sera, showed no or very low intensity peaks at the 5.9 kDa spectra. This markedly differed from the proteomic analysis of the serum samples of healthy subjects included in this set of experiments because all displayed consistent amounts of protein A. Interestingly, different etiologies (NASH, ALD, HBV, AH, cryptogenic) accounted for liver fibrosis in negative HCV patients, further emphasizing the close relationship between the lack of the 5.9 kDa protein and the fibrogenic process.

Next, the spectral data obtained in the test set were applied for validation purposes. All serum samples included in the test set showed an intensity m/z 5905 peak well below the values found in both healthy subjects and non recurrent HCV patients. Indeed, in most of these samples the A peak was not detected (figure 3). Overall, our results showing markedly decreased expression of the

m/z 5905 in the spectral profile of all samples from patients with fibrosis further strengthen the highly sensitive diagnostic performance of this peak.

A major limitation of SELDI-TOF-MS technology is related to the unfeasibility of directly identifying the protein of interest. In fact, for the majority of protein identifications it is necessary to achieve the enrichment of the specific peak by chromatography procedures and purification by SDS gel electrophoresis with subsequent tryptic digest. In our investigation, amino acid sequencing of the trypsin digest of the 5.9 kDa protein revealed it to be a fragment of the fibrinogen α C-chain. Human fibrinogen is a circulating 340 kDa glycoprotein which has been shown to be of hepatic origin *in vivo*. Moreover, inflammatory stimuli may induce *in vitro* secretion of this glycoprotein in non hepatic cells including epithelial cells, granulosa cells, cervical carcinoma cells and trophoblasts [20]. However, current evidence strongly suggests that the largest site of human plasma fibrinogen is the hepatocytes [21]. It is comprised of two symmetric half molecules bound by a disulphide knot, each consisting in one set of three different polypeptide termed α , β and γ . Each of these polypeptides is encoded by a separate gene located on chromosome four. The predominant α of circulating fibrinogen contains 610 aa (63.5 kDa), the β chain 461 aa (56 kDa) and the γ chain is heterogeneous, but the most abundant form consists of 411 aa (48 kDa). The protein shows extensive post translational modification including phosphorylation, sulphation, glycosylation and hydroxylation. The fibrinogen α C-domain of the human fibrinogen is the C-terminal two-thirds of the α chain that extends from the coiled oil portion of each half of the dimeric fibrinogen molecule [22,23]. The α C-fragments are released into circulation as natural by-products of fibrinolytic systemic activation and are therefore, found in the systemic circulation in healthy individuals [24]. Our results showing almost suppressed expression of the 5.9 kDa fragment of the α C-chain of fibrinogen in patients undergoing a fibrogenic process are in agreement with those previously reported by Nomura F et al in heavy drinkers [25].

Furthermore, these authors showed that serum levels of this fragment were recovered when alcohol intake has ceased for more than 3 months and they also extended their findings to HCV infected patients [26]. Later, this fragment was described as having diagnostic value in patients with acute respiratory syndrome [27], breast cancer [28] and pancreatic adenocarcinoma [29].

The regulation of total human fibrinogen by a number of proinflammatory agents has been previously investigated using the HepG2 hepatocellular carcinoma cell line [30]. This *in vitro* model faithfully recapitulates fibrinogen expression including α , β and γ fibrinogen [31] and has been used to study fibrinogen production and regulation *in vitro* [32]. Accordingly we subsequently assessed the potential regulatory role of several candidate mediators on α -fibrinogen expression in HepG2 cells. A number of proinflammatory/profibrogenic agents that have previously been involved in the pathogenesis of the fibroproliferative processes [33–35] were tested. Among them, only TGF- β showed significant regulatory activity on α -fibrinogen mRNA expression and decreased 5.9 kDa fibrinogen α C-fragment intensity. Of note was, however, that the fold change in the fibrinogen α C-fragment induced by TGF- β in HepG2 cells was markedly lower than that observed in samples from fibrotic patients. The marked differences between the *in vivo* and *in vitro* experimental conditions likely account for this discordance. For instance, HepG2 is a human derived carcinoma cell line that shows altered abundance of TGF- β receptors [36,37] which in turn could result in some sort of resistance to this cytokine. On the other hand it is well known that regulation of acute-phase proteins is mediated by a combination of cytokines thus raising the possibility that additional factors involved in inflammatory processes also regulate the expression of the 5.9 kDa fragment of fibrinogen [38]. Our results are in line with past studies in which TGF- β inhibited the induction of fibrinogen produced by IL-6 and decreased the synthesis of fibrinogen in HepG2 and HepB cells [38], respectively. These latter experiments also showed a parallel diminution in α -fibrinogen mRNA levels. This phenomenon seems to be mediated by post-transcriptional mechanisms since TGF- β did not modify fibrinogen gene transcription, suggesting that the effect of this cytokine in liver cells is regulated at the level of mRNA stability [39]. Overall, all these results indicate that TGF- β may regulate the synthesis of α -fibrinogen at the posttranscriptional level.

In summary, the current investigation took advantage of the faster development of hepatic fibrosis in HCV-positive LT patients to identify early circulating serum biomarkers of active fibrogenesis in patients with liver disease. Using high throughput SELDI-TOF-MS technology we unveiled a differential protein pattern profile between early fibrosis recurrence and non recurrent LT patients. Six protein peaks displaying statistically significant different intensities were observed within a range of 1000 to 25000 m/z.

References

- Pinzani M, Vizzutti F (2008) Fibrosis and cirrhosis reversibility: clinical features and implications. *Clin Liver Dis* 12(4): 901–913.
- Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM (2007) Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality. *J Cell Mol Med* 11: 1031–1051.
- Hernandez-Gea V, Friedman SL (2011) Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 6: 425–456.
- Battaller R, Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115: 209–218.
- Blasco A, Forns X, Carrión JA, García-Pagán JC, Gilibert R, et al. (2006) Hepatic venous pressure gradient identifies patients at risk of severe hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 43: 492–499.
- Scheuer PJ (1995) The nomenclature of chronic hepatitis: time for a change. *J Hepatol* 22: 112–114.
- Scarlett CJ, Saxby AJ, Nielsen A, Bell C, Samra JS, et al. (2006) Proteomic profiling of cholangiocarcinoma: diagnostic potential of SELDI-TOF MS in malignant bile duct stricture. *Hepatology* 44: 658–666.
- Afdhal NH, Nunes D (2004) Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 99(6): 1160–1174.
- Castera L, Pinzani M (2010) Biopsy and non-invasive methods for the diagnosis of liver fibrosis: does it take two to tango? *Gut* 59(7): 861–866.
- Fernandez-Varo G, Jimenez W (2011) Non invasive markers of liver fibrosis. *Europ Gastr & Hepatol Rev* 7(2): 93–96.
- Martinez SM, Crespo G, Navasa M, Forns X (2011) Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology* 53: 325–335.
- Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, et al. (2004) Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 127(6): 1704–1713.
- Lichtinghagen R, Pietsch D, Bantel H, Manns MP, Brand K, et al. (2013) The enhanced Liver Fibrosis (ELF) score: Normal values, influence factors and proposed cut-off values. *J Hepatol* 59: 236–242.
- Martinez SM, Fernández-Varo G, González P, Sampson E, Bruguera M, et al. (2011) Assessment of liver fibrosis before and after antiviral therapy by different

The peak located at 5905 m/z showed the most remarkable difference, since it was fully detected in non-recurrent LT patients but was almost suppressed in recurrent LT patients. Similar results were found when comparing samples of healthy subjects with those of non LT fibrotic patients both HCV positive and negative, indicating that our findings were not related to either LT or HCV infection. Identification of this protein peak showed more than a 99% coincidence with a C-terminal fragment of the fibrinogen α chain. Moreover, cell culture experiments demonstrated that TGF- β downregulates α -fibrinogen mRNA expression and decreases the peak intensity of the m/z 5.9 kDa protein in HepG2 cells. In conclusion, we identified a 5.9 kDa C-terminal fragment of the fibrinogen α chain as a serum biomarker of early fibrogenic processes in patients with liver disease. Since TGF- β inhibited α -fibrinogen mRNA expression in HepG2 cells it is tempting to speculate that the activation of this cytokine in the early phases of liver injury could be responsible for the impairment in the circulating levels of the fibrinogen α C-chain fragment in patients with active hepatic fibrogenesis.

Supporting Information

Data S1 Materials and Methods corresponding to the serum fractionation procedure.

(DOC)

Data S2 Materials and Methods corresponding to the identification of the candidate biomarker.

(DOC)

Data S3 Materials and Methods corresponding to the analysis of the messenger RNA expression of human fibrinogen α , β , and γ chains.

(DOC)

Data S4 Spreadsheet containing all protein peaks detected in all the samples included in the study.

(XLS)

Acknowledgments

The authors are indebted to Drs. F. Elortza and I. Iloro for their collaboration in the identification of the 5.9 kDa protein peak.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MN WJ. Performed the experiments: SM VR. Analyzed the data: SM VR G. Crespo. Contributed reagents/materials/analysis tools: SM VR G. Casals WJ. Contributed to the writing of the manuscript: SM WJ. Sample recruitment: XF. Revising the article critically: G. Crespo XF MMR MN. Final approval of the version to be published: SM G. Crespo VR XF G. Casals MMR MN WJ.

- serum markers panels in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Therap* 33: 138–148.
15. Nguyen D, Talwaker JA (2011) Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology* 53: 2107–2110.
 16. Crespo G, Fernández-Varo G, Mariño Z, Casals G, Miquel R, et al. (2012) ARFI, Fibroscan®, ELF and their combinations in the assessment of liver fibrosis: a prospective study. *J Hepatology* 57: 281–287.
 17. Berenguer M, Schuppan D (2013) Progression of liver fibrosis in post-transplant hepatitis C: mechanisms, assessment and treatment. *J Hepatology* 58: 1028–1041.
 18. Semmes OJ, Feng Z, Adam BL, Banez LL, Bigbee WL, et al. (2005) Evaluation of serum protein profiling by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection of prostate cancer: I. Assessment of platform reproducibility. *Clin Chem* 51(1): 102–112.
 19. Engwegen JY, Gast MC, Schellens JH, Beijnen JH (2006) Clinical proteomics: searching for better tumour markers with SELDI-TOF mass spectrometry. *Trends Pharmacol Sci* 27: 251–259.
 20. Weisel JW (2005) Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem* 70: 247–299.
 21. Tennent GA, Brennan SO, Stangou AJ, O’Grady J, Hawkins PN, et al. (2007) Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *Blood* 109: 1971–1974.
 22. Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G (1999) Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 41–46.
 23. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA (2001) The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci* 936: 11–30.
 24. Rudchenko S, Trakht I, Sobel JH (1996) Comparative structural and functional features of the human fibrinogen alpha C-domain and the isolated alpha C fragment. Characterization using monoclonal antibodies to defined COOH-terminal A alpha chain regions. *J Biol Chem* 271(5): 2523–2530.
 25. Nomura F, Tomonaga T, Sogawa K, Ohashi T, Nezu M, et al. (2004) Identification of novel and downregulated biomarkers for alcoholism by surface enhanced laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Proteomics* 4(4): 1187–1194.
 26. Sogawa K, Noda K, Umemura H, Seimiya JM, Kuga T, et al. (2013) Serum fibrinogen α C-chain 5.9 kDa fragment as a biomarker for early detection in hepatic fibrosis related to hepatitis C virus. *Proteomic Clin Appl* 7: 424–431.
 27. Pang RT, Poon TC, Chan KC, Lee NL, Chiu RW, et al. (2006) Serum proteomic fingerprints of adult patients with severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem* 52(3): 421–429.
 28. Belluco C, Petricoin EF, Mammano E, Facchiano F, Ross-Rucker S, et al. (2007) Serum proteomic analysis identifies a highly sensitive and specific discriminatory pattern in stage I breast cancer. *Ann Surg Oncol* 14(9): 2470–2476.
 29. Koopmann J, Zhang Z, White N, Rosenzweig J, Fedarko N, et al. (2004) Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 10(3): 860–868.
 30. Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209(4455): 497–499.
 31. Farrell DH, Mulvihill ER, Huang SM, Chung DW, Davie EW (1991) Recombinant human fibrinogen and sulfation of the gamma’ chain. *Biochemistry* 30(39): 9414–9420.
 32. Mackiewicz A, Speroff T, Ganapathi MK, Kushner I (1991) Effects of cytokine combinations on acute phase protein production in two human hepatoma cell lines. *J Immunol* 146(9): 3032–3037.
 33. Melgar-Lesmes P, Pauta M, Reichenbach V, Casals G, Ros J, et al. (2011) Hypoxia and proinflammatory factors upregulate apelin receptor expression in human stellate cells and hepatocytes. *Gut* 60(10): 1404–1411.
 34. Reichenbach V, Muñoz-Luque J, Ros J, Casals G, Navasa M, et al. (2013) Bacterial lipopolysaccharide inhibits CB2 receptor expression in human monocytic cells. *Gut* 62(7): 1089–1091.
 35. Melgar-Lesmes P, Casals G, Pauta M, Ros J, Reichenbach V, et al. (2010) Apelin mediates the induction of profibrogenic genes in human hepatic stellate cells. *Endocrinology* 151(11): 5306–5314.
 36. Liu P, Menon K, Alvarez E, Lu K, Teicher BA (2000) Transforming growth factor- β and response to anticancer therapies in human liver and gastric tumors in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 16: 599–610.
 37. Dituri F, Mazzocca A, Peidrò FJ, Papappicco P, Fabregat I, et al. (2013) Differential inhibition of the TGF- β signaling pathway in HCC cells using the small molecule inhibitor LY2157299 and the D10 monoclonal antibody against TGF- β receptor type II. *PLoS One* 8(6): e67109.
 38. Mackiewicz A, Ganapathi MK, Schultz D, Brabenc A, Weinstein J, et al. (1990) Transforming growth factor beta 1 regulates production of acute-phase proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(4): 1491–1495.
 39. Buenemann CL, Willy C, Buchmann A, Schmiechen A, Schwarz M (2001) Transformin growth factor- β 1 induced Smad signaling, cell cycle arrest and apoptosis in hepatoma cells. *Carcinogenesis* 22: 447–452.

EXPANDED EXPERIMENTAL PROCEDURES (DATA S1)

Serum fractionation:

The samples were fractionated by pH, using a protein chip serum fractionation kit (ProteinChip Serum Fractionation Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The kit consists of a 96 well filtration plate with Q HyperD F anion-exchange beads that required rehydration and equilibration before use. Two hundred microliters of rehydration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 9) was added to each well and incubated for 1 hour at room temperature. Thereafter, each well was equilibrated three times with 200 μ l of U1 buffer [1 M Urea, 0.2% (w/v) CHAPS, 50 mM Tris-HCl, pH 9]. Prior to fractionation, 20 μ L of serum sample was mixed with 30 μ L of U9 buffer [9 M Urea, 2% (w/v) CHAPS, 50 mM Tris-HCl, pH 9] in a 96-well V-bottom plate for 20 minutes at 4°C in a horizontal orbital microplate shaker. The sample was then diluted with 50 μ L of U1 buffer. One hundred μ l of the diluted serum sample was applied to each well and incubated for 30 min. at room temperature under constant shaking. Flow-through was collected by vacuum filtration into V-bottom microplates. The anion-exchange resin was incubated with an additional 100 μ L of Tris HCl buffer (50 mM Tris-HCl, 0,1% OGP, pH 9) for 10 minutes at room temperature with shaking. The wash was collected by vacuum filtration. This procedure was repeated twice with 100 μ l each of appropriate buffers with decreasing pH (pH 7, 5, 4 and 3). The final wash was performed with an organic wash buffer containing 33% (vol/vol) isopropanol and 16.7% (vol/vol) acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). The six fractions, 200 μ L each, were kept at -80°C until analysis. Fraction 1 (pH 9) was selected for subsequent analysis. Serum fraction was empirically determined from two pools of serum samples obtained

from HCV positive (n=10) and HCV negative (n=9) LT patients according to a protocol aimed to maximize the number of identifiable protein peaks while reducing peak-to-peak interference.

EXPANDED EXPERIMENTAL PROCEDURES (DATA S2)***Identification of candidate biomarker:***

Sample purification: Ion exchange fractionation was undertaken on a Q ceramic HyperD F mini spin column (Bio-Rad) pre-equilibrated with 800 μ l of binding washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 9) and 800 μ L of U1 buffer (three times), respectively. Serum samples from healthy subjects were diluted at a ratio of 1:1.5 in U9 buffer. Treated samples were diluted 1:1 in binding washing U1 buffer and applied to the spin column followed by incubation for 45 min. at 5°C. Unbound proteins were eluted by centrifugation. Then 400 μ l of elution buffer (50 mM Tris-HCl, 0.1% OGP, pH 9) were applied to the minispin column and centrifuged at 100 g, room temperature for 1 min. The flow-through was also collected. Eight minispin columns were used, and 6.4 mL of the eluted fraction were obtained in total. Eluted fractions containing the candidate biomarker were pooled and concentrated by molecular weight cut-off membrane fractionation (Amicon Ultra-4, 30000 MWCO, Millipore Corp. Billerica, MA). SELDI-TOF-MS was used to monitor the resulting concentrate for the peak of interest. The sample was then further purified on a CM ceramic HyperD F sorbent minispin Column. The column was equilibrated by loading 800 μ l of binding buffer (0.1 M sodium acetate, pH 4.0) three times. The concentrated protein sample was mixed at a ratio of 1:1.5 with binding buffer and applied to the column. 375 μ L of binding buffer were also added. The column was incubated for 45 min at 5°C, centrifuged and the eluate was discarded. 750 μ l of 0.5 M NaCl were added to the column, incubated for 20 min at room temperature and centrifuged at 100 g for 1 min. Two additional cut-off membrane fractionation steps were performed (Amicon Ultra-4, 3000 MWCO

and Amicon Ultra-0.5, 10000 MWCO, Millipore Corp.) to completely isolate the candidate biomarker. SELDI-TOF-MS was used again to monitor the resulting concentrate for the peak of interest.

SDS-PAGE gels: Samples were loaded in a Tris-Tricine gel using a buffer containing 50 mM Tris, pH 6.8, 5% glycerol, 1.67% b-mercaptoethanol, 1.67% SDS and 0.0062% bromophenol blue. Protein was boiled for 5 min and resolved independently in 12% acrylamide gels, using a Mini-Protean II electrophoresis cell (Bio-Rad). A constant voltage of 150 V was applied for 45 min for this purpose. The gel was fixed in a solution containing 10% acetic acid, 30% methanol for 30 min, and stained overnight in 0.1% Coomassie Brilliant Blue in 10% acetic acid, 30% methanol. The gels were then washed in a solution containing 10% ethanol and 7% acetic acid for 30 min.

Tryptic digestion: Gel bands were first sliced to small pieces, and washed in milli-Q water. Reduction and alkylation was applied by incubation with Dithiothreitol (DTT, 10 mM in 50 mM ammonium bicarbonate, 30 μ l) at 56 °C for 20 min, followed by an incubation in iodoacetamide (50 mM in 50 mM NH_4HCO_3 , 30 μ l) for another 20 min in the dark. Gel pieces were dried and incubated with trypsin (12.5 μ g/ml in 50 mM NH_4HCO_3 , 10 μ l) for 20 min in ice. After rehydration, the trypsin supernatant was discarded; spots were covered with 50 mM NH_4HCO_3 , and incubated overnight at 37°C. After digestion, acidic peptides were further extracted with trifluoroacetic acid 0.1% and dried out in a RVC2 25 Speedvac concentrator (Christ, Osterode Am Harsz, Germany). Peptides were resuspended in 5 μ l 0.1% folic acid and sonicated for 5 min. prior to their analysis. Two independent MS/MS methods were followed.

NanoLC-MS/MS and Data Analysis: Peptide mixtures obtained from the digestion were separated by on-line nanoLC and analyzed by electrospray tandem mass spectrometry. Peptide separation was performed on a nanoAcquity UPLC system (Waters) connected to an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Electron, Bremen, Germany). 2.5 μl of each sample were diluted to a final volume of 5 μl in CH_2O_2 0.1% and loaded onto a Symmetry 300 C18 UPLC Trap column, 180 μm x 20 mm, 5 μm (Waters Corporation, Mildford, MA). The precolumn was connected to a BEH130 C18 column, 75 μm x 200 mm, 1.7 μm (Waters Corporation) equilibrated in 3% acetonitrile and 0.1% HCOOH, and peptides were eluted at 300 nl/min using a 60 min linear gradient of 3–50% acetonitrile directly onto the nanoelectrospray ion source (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark).

The mass spectrometer automatically switched between MS and MS/MS acquisition in DDA mode. Survey full scan MS spectra (m/z 400–2000) were acquired in the orbitrap with 30,000 resolution at m/z 400. 6 most intense ions above 1,000 counts were sequentially subjected to CID fragmentation in the linear ion trap. Precursors with charge states of 2 and 3 were specifically selected for collision-induced dissociation. Collision-energy applied to each peptide was automatically normalized as a function of the m/z and charge state. Analyzed peptides were excluded for further analysis during 30 s using dynamic exclusion lists.

Searches were performed using Mascot Search engine (v2.2.07, Matrix Science, London, UK) on Proteome Discoverer 1.2. software (Thermo Electron, Bremen, Germany). Carbamidomethylation of cysteines as fixed modification, oxidation of methionines as variable modification, 5 ppm of peptide mass

tolerance, 0.5 Da fragment mass tolerance were adopted as search parameters, and 2 missed cleavages were allowed. Spectra were searched against UniprotKB/Swiss-Prot database (version 2013_01, 539,165 sequences, 191,456,931 residues), restricted to homos sapiens. Only proteins with at least two peptides passing $p < 0.05$ cut-off were considered for protein identification.

Peptide Mass Fingerprint and Peptide Fragment Fingerprinting: MALDI-TOF-TOF analysis was performed with a MALDI-LIFT-TOF AUTOFLEX III smartbeam (Bruker Daltonics). Each digested sample was loaded (1 μ l) onto a target (Bruker 384 ground steel) with 1 μ l of α cyano-4-hydroxy-cinamic acid. Data-dependent MS acquisitions were performed with charge state of 1 over a survey m/z range of 500-4000. Ionization was performed with a solid-state laser of 360 nm and 200 Hz. Laser intensity energies were varied depending of the analysis required. For MS 30-50% of intensity was used and around 90% for MS/MS. Resolution was always over 7500 along all mass-window range for MS analysis. Data acquisition was performed manually. Routinely 1400 scans were collected for Peptide Mass Fingerprinting whereas the most intense peaks were selected for MS/MS (400 scans for parent selection, and 1600 scans for fragments). Obtained spectra were processed using Flex analysis 3.0 and Biotools 3.2 (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Database searching is performed using Mascot (Matrix Science, London, UK) against UniprotKB/Swiss-Prot database. For protein identification the following parameters were adopted: carbamidomethylation of cysteines (C) as fixed modification and oxidation of methionines (M) as variable modifications, 50 ppm of peptide mass tolerance, 0.7 Da fragment mass tolerance and up to 2 missed cleavage points.

Calibration was performed externally, with pepmix (Bruker Daltonics), and internally, with trypsin peptides, when available.

EXPANDED EXPERIMENTAL PROCEDURES (DATA S3)***Messenger RNA expression of human fibrinogen α , β , and γ chains in HepG2 cells:***

Total RNA from cultured cells was extracted using a commercially available kit: Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc, Cincinnati, OH). One μ g of total RNA was reverse transcribed (RT) by using a complementary DNA synthesis kit (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers for human fibrinogen α chain (left: 5'-TGAAATTTTGAGAGGCGATT-3', right: 5'-CCTCTGACACTCGGTTGTAGG-3'), fibrinogen β chain (left: 5'-CTGAAATGTATCTCATTCAACCTGA-3', right: 5'-CCGTCTTGACGGTT CTGAAT-3'), fibrinogen γ chain (left: 5'-AGCCAGCTTGAAGCACA-3', right: 5'-TTGGCAATGTCTTGACAATCTT-3'), and HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1), a constitutively expressed gene used as an endogenous standard (left: 5'-TGACCTTGATTTATTTTGCATACC-3', right: 5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT-3'), were designed according to human fibrinogen α , β , and γ chain and HPRT sequences (GenBank NM_000508.3, NM_005141.4, NM_000509.4, NM_000194.2, respectively) using the ProbeFinder software (Probefinder v 2.49, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Real time quantitative PCR was analyzed in duplicate and performed with Lightcycler-480 (Roche Diagnostics). Ten μ l total volume reaction of diluted 1:8 cDNA, 200 nM primer dilution, 100 nM pre-validated 9-mer probe (Universal ProbeLibrary, Roche Diagnostics) and FastStart TaqMan Probe Master (Roche Diagnostics) was used in each PCR reaction. Fluorescence signal was captured during each of the 45 cycles (denaturizing 10 sec at 95°C, annealing 15 sec at

60°C and extension 20 sec at 72°C). HPRT was used as reference gene for normalization and water was used as negative control. Relative quantification was calculated using the comparative threshold cycle (CT), which is inversely related to the abundance of mRNA transcripts in the initial sample. The mean CT of duplicate measurements was used to calculate ΔCT as the difference in CT for target and reference. Relative quantity of product was expressed as fold-induction of the target gene compared with the control primers according to the formula $2^{-\Delta CT}$. The mean CT of duplicate measurements was used to calculate ΔCT as the difference in CT for target and reference. The relative quantity of product was expressed as fold-induction of the target gene compared with the reference gene according to the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$, where $\Delta\Delta CT$ represents ΔCT values normalized with the mean ΔCT of control samples.

SUPPLEMENTARY DATA (DATA S4)

Spreadsheet containing all protein peaks detected in all the samples included in the study.

L'arxiu excel (DATA S4) es pot descarregar a través del link següent:

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0109254>

DISCUSSIÓ

En la pràctica clínica, la detecció precoç de fibrosi hepàtica és un aspecte clau per poder iniciar els tractaments pertinents i evitar així futures complicacions als pacients que presenten algun tipus de malaltia hepàtica crònica. Com s'ha anat comentant al llarg la present tesi doctoral, la biòpsia hepàtica ha estat una de les metodologies més emprades per estimar aquest paràmetre (Mehta et al., 2009). No obstant, presenta importants limitacions que la fan un mètode de referència imperfecte. Entre elles, caldria destacar la seva naturalesa invasiva, la poca representativitat de la mostra obtinguda o la impossibilitat de realitzar-la de forma continuada per veure l'avaluació dinàmica de la fibrosi al llarg del tractament (Bedossa et al., 2003; Regev et al., 2002). Tots aquests factors han empès a la cerca de noves estratègies i biomarcadors no invasius amb major capacitat diagnòstica. En concret, l'avaluació d'alteracions en les proteïnes circulants ha estat una de les àrees més estudiades. Tenint present que els hepatòcits –el tipus cel·lular predominant en el fetge– són responsables de la síntesi de la majoria de proteïnes intrahepàtiques i extrahepàtiques (Tennent et al., 2007), és factible pensar que canvis subtils en l'arquitectura del fetge poden incórrer en anomalies en la síntesi de proteïnes i ser detectades conseqüentment en el torrent sanguini. Malauradament, els descobriments obtinguts fins al moment s'han restringit bàsicament a la detecció de fibrosi moderada/avançada i cirrosi.

La lenta progressió de la malaltia i la seva asimptomatologia en els inicis semblen ser dos dels principals obstacles per obtenir mostres en estadis precoços i poder així detectar biomarcadors específics de fibrosi hepàtica inicial. En el primer estudi, aquesta dificultat es va eludir gràcies a l'ús del model experimental d'inducció a fibrosi en rates mitjançant la inhalació de CCl₄. Estudis previs han demostrat com aquest model reproduïx fidelment les alteracions observades a nivell histològic, hemodinàmic, bioquímic i renal que pateixen els pacients fibròtics i cirròtics (Clària i Jiménez, 2005; Constandinou et al., 2005). De fet, aquests animals van incrementant gradualment la deposició de fibres de col·lagen a mesura que augmenta el temps d'exposició al CCl₄, la qual està associada amb un progressiu desajust de l'hemodinàmica sistèmica i esplàncnica, una alteració sèrica dels paràmetres de funció hepàtica i renal i una marcada retenció de sodi i aigua que finalment desemboca en la formació d'ascites (Clària i Jiménez, 2005). Així doncs, aquest model *in vivo* permet, no només identificar potencials biomarcadors de fibrosi hepàtica, sinó entendre millor els mecanismes fisiopatològics involucrats en aquest procés així com determinar la utilitat terapèutica de noves drogues antifibrogèniques (Fernández-Varo et al., 2016; Oró et al., 2016). Per aconseguir els objectius proposats en el primer treball, els animals van ser classificats en quatre grups en funció de la quantitat de col·lagen dipositada en el fetge i no pas en funció de les setmanes de tractament amb CCl₄, car la resposta individual a l'agent hepatotòxic és dispar entre els

animals. Les rates incloses en l'estudi van mostrar una deposició de fibra que oscil·lava entre el 1,9% i el 26,3%. Com era d'esperar, va existir una relació inversament proporcional entre el percentatge de fibra i els valors de la MAP, i una relació directament proporcional amb els valors de la PP. A més a més, es va observar una reducció en la concentració sèrica d'albumina i una activació marcada dels enzims hepàtics a mesura que el procés fibròtic avançava. Tots els resultats obtinguts tant en el grup de definició com en el de validació van confirmar la similitud del model *in vivo* amb la progressió que segueixen els pacients amb malaltia hepàtica.

El camp de la proteòmica ha evolucionat enormement durant l'última dècada gràcies a l'avenç de l'espectrometria de masses i a les millores en les tècniques de separació. Tradicionalment, l'estudi de les variacions proteiques s'havia realitzat per mitjà del gel d'electroforesi de dues dimensions (Adam et al., 2001). No obstant, aquest protocol té associats certs desavantatges que restringeixen enormement el seu ús. Les estratègies que fan ús de l'espectrometria de masses en canvi, s'han anat imposant per poder fer front a les noves exigències i necessitats. Dins d'aquestes alternatives, els mètodes lliures de marcatge s'han convertit en una eina interessant i indispensable en molts dels laboratoris d'investigació, car permeten l'anàlisi individual d'una gran quantitat de mostres gràcies a l'absència de restriccions de marcatge (Sandberg et al., 2014). Alhora, aconsegueixen analitzar de forma molt més exhaustiva el proteoma de diverses malalties (Altelaar et al., 2013; Casado et al., 2013; Quintana et al., 2009), i han demostrat ser alternatives molt prometedores per a la determinació de nous biomarcadors de diagnòstic i pronòstic (Sandin et al., 2015).

En aquest context, el primer estudi es va centrar en la cerca de biomarcadors circulants de fibrosi hepàtica per mitjà d'una anàlisi proteòmica en 94 rates fibròtiques/cirròtiques i 36 animals control emprant l'estratègia lliure de marcatge LC-MS/MS. Primerament es va realitzar una PCA, la qual va permetre visualitzar i agrupar les mostres del grup de definició en tres conjunts clarament diferenciats gràcies al seu patró proteic particular: els animals control, les rates fibròtiques i el grup cirròtic. Curiosament, l'avaluació bidimensional no va aconseguir distingir les rates amb una fibrosi lleu/moderada de les que presentaven una fibrosi més severa. Posteriorment, es va realitzar una anàlisi per determinar les vies de senyalització alterades en la fibrosi i cirrosi hepàtica, la qual va detectar principalment tres vies afectades en el grup d'animals fibròtics. Aquestes corresponien a les relacionades amb la senyalització de la resposta en fase aguda, la cascada de coagulació i els mecanismes implicats en la proliferació cel·lular. Com era d'esperar, la quantitat de vies de senyalització alterades en els animals cirròtics va ser major i es van observar afectacions en altres òrgans com el ronyó i el cor. Tots aquests resultats estan en concordança amb les característiques patològiques més característiques ja descrites en pacients amb diferents graus de fibrosi i cirrosi hepàtica

(Betrosian et al., 2007; Mercer i Chambers, 2013; Møller i Henriksen, 2002), reafirmant doncs la utilitat del model experimental per al descobriment de nous biomarcadors de detecció i estadificació de la malaltia hepàtica. Tot i els clars avantatges d'aquest mètode, és rellevant tenir present que els animals poden presentar diferències metabòliques així com reaccions immunològiques, expressió de gens o respostes farmacològiques dissemblants a les de l'ésser humà (Starkel i Leclercq, 2011), invalidant en termes de diagnòstic bioquímic algunes de les troballes obtingudes en aquests models experimentals. Tenint present que proteïnes amb una seqüència d'aminoàcids molt semblant sovint presenten funcions similars (Alberts et al., 2007; Lodish et et al., 2000), en el primer estudi es van intentar minimitzar aquestes limitacions seleccionant exclusivament les proteïnes altament conservades entre ambdues espècies. En concret, l'anàlisi proteòmica va permetre identificar dos potencials biomarcadors circulants relacionats amb la fibrosi i cirrosi hepàtica: la SIPA1L1 i l'hemopexina. La primera es trobava reduïda en estadis inicials de la malaltia mentre que la darrera estava incrementada en fases més avançades (cirrosi).

Pel que respecta a SIPA1L1, s'han identificat tres isoformes d'aproximadament 200 kDa cadascun (Gao et al., 1999). Actualment se sap que es tracta d'una proteïna activadora de GTPases (GAP), ja que posseeix una regió d'homologia amb els dominis de GAP (Gao et al., 1999). D'altra banda, SIPA1L1 s'ha descrit també com un potencial supressor de tumors, car es localitza en una regió del cromosoma 14, el qual ha demostrat presentar una pèrdua d'heterozigositat en meningiomes malignes (Gao et al., 1999; Menon et al., 1997). Així doncs, els resultats observats fins al moment semblen indicar que la seva inactivació contribueix a transformacions malignes. A causa de l'elevada similitud de la seqüència aminoacídica de SIPA1L1 entre rates i humans (95,34%), és faedor pensar que el resultat obtingut a partir del model *in vivo* es podria traduir a la fibrosi hepàtica humana i ser útil per a la detecció de la malaltia en els seus estadis inicials.

L'hemopexina és una glicoproteïna de 60 kDa que s'expressa majoritàriament a les cèl·lules del parènquima hepàtic (Thorbecke et al., 1973). Com que pertany a la família de les proteïnes de fase aguda, la seva síntesi està induïda per diverses citocines en resposta a un esdeveniment inflamatori (Baumann i Gauldie, 1994). A més a més, es tracta de la proteïna circulant amb la major afinitat pel grup hemo i es considera que és la principal responsable del seu transport dins del fetge (Tolosano et al., 1999). Aquesta característica ha conduït a la creença que l'hemopexina prevé a l'organisme de la toxicitat del grup hemo lliure, protegint-lo així contra la inflamació i la fibrosi hepàtica (Tolosano et al., 1999). Per altra banda, s'ha demostrat també que presenta un paper rellevant en el manteniment de les reserves de ferro de l'organisme (Smith i Morgan, 1981). Curiosament però, els resultats observats en el grup de

definició van mostrar un increment significatiu de la concentració sèrica d'hempexina en les rates cirròtiques en comparació amb els animals control.

Els resultats obtinguts en el grup de validació van confirmar la reducció dels nivells circulants de SIPA1L1 detectades en els estadis fibròtics. De fet, aquesta tendència es va mantenir al llarg dels grups amb fibrosi severa i cirrosi. En concret, l'avaluació per ELISA de la concentració sèrica de SIPA1L1 en els animals tractats amb CCl_4 , va mostrar una disminució del 40% en comparació amb els animals control. Si bé la precisió diagnòstica va ser excel·lent i estadísticament significativa per detectar fibrosi (AUROC: 0,865), aquesta fou inclús major alhora de detectar als animals amb una fibrosi lleu/moderada (AUROC: 0,904). Així doncs, tots els resultats obtinguts fins al moment indiquen que una reducció dels nivells circulants de SIPA1L1 permetria identificar a aquells individus asimptomàtics que es troben en un estadi molt inicial de fibrosi hepàtica. Contràriament, no es va reproduir de nou la tendència observada en el cas de l'hempexina com a biomarcador circulant de cirrosi hepàtica. De fet, l'avaluació sèrica d'aquesta proteïna en els diferents grups d'animals per mitjà de tècniques d'immunoassaig va evidenciar una elevada dispersió i, per tant, no va mostrar diferències estadísticament significatives en comparació amb el grup control. En concordança, la capacitat diagnòstica d'hempexina per detectar cirrosi hepàtica tampoc va manifestar cap mena de significació estadística.

Actualment no hi ha estudis on s'hagi descrit el paper potencial que SIPA1L1 pot tenir en la fibrosi hepàtica. Tanmateix, una investigació recent va demostrar que la senyalització de Wnt afecta la fosforilació i l'estabilitat de SIPA1L1 (Tsai et al., 2007). A més a més, s'ha descrit també que la senyalització de Wnt activa la caseïna quinasa I èpsilon ($\text{CKI}\epsilon$) (Swiatek et al., 2004), la qual indueix la fosforilació de SIPA1L1 i la seva degradació, així com una acumulació de β -catenina (Gao et al., 2002). Atès que la via de senyalització de Wnt s'activa durant la fibrosi hepàtica en les cèl·lules hepàtiques estrellades (Miao et al., 2013), és factible especular que la disminució de SIPA1L1 és una conseqüència de l'activació del procés fibrogènic. En aquest sentit, diverses investigacions han demostrat que l'activació sostinguda de la via de Wnt/ β -catenina està vinculada a la patogènesi de diferents trastorns fibròtics, inclosa la fibrosi hepàtica (Cheng et al., 2008, 2010; Jiang et al., 2006; Li et al., 2011; Myung et al., 2007). Per tant, les investigacions realitzades fins al moment estan en sintonia amb els nostres resultats i reforcen la idea que la reducció de SIPA1L1 és un marcador de l'activació precoç de la fibrogènesi en la malaltia hepàtica. No obstant això, el mecanisme específic i detallat pel qual aquest fenomen es produeix encara necessita ser aclarit.

Una altra estratègia per determinar nous biomarcadors de fibrosi hepàtica és l'anàlisi proteòmica de pacients amb VHC i sotmesos a un trasplantament hepàtic. Està ben demostrat

que aquest grup particular de pacients presenta una recurrència del virus en l'empelt, la qual es tradueix en una acceleració del procés fibròtic (Féray et al., 1992). Per tant, la determinació d'alteracions proteiques en aquest conjunt de pacients poc temps de la cirurgia pot permetre identificar biomarcadors circulants relacionats amb l'activació del procés fibrogènic i detectar estadis de fibrosi hepàtica inicial asimptomàtics. En aquest context, el segon estudi es va centrar en la cerca de biomarcadors sèrics en aquests pacients mitjançant l'estratègia proteòmica *top-down*. Les mostres sèriques es van obtenir 6 mesos després del trasplantament hepàtic i es va realitzar una biòpsia a l'any de la cirurgia per definir el grau de la fibrosi hepàtica.

La tecnologia SELDI-TOF MS és un sistema molt utilitzat per a la determinació de biomarcadors de detecció, de diagnòstic i de pronòstic de diferents malalties (Gallo et al., 2016; Gonçalves et al., 2008; Kelly et al., 2012; Marfà et al., 2016; Vinther-Jensen et al., 2015). Una de les majors avantatges d'aquest tipus d'estratègia proteòmica és el seu elevat rendiment. A causa de l'elevada variabilitat que existeix entre pacients, la capacitat d'analitzar un gran nombre de mostres permet compensar aquest factor i dotar de major poder estadístic als potencials biomarcadors detectats. Es tracta d'una tecnologia que combina l'espectrometria de masses amb *arrays* que presenten superfícies modificades de retenció selectiva, els quals poden interactuar amb un determinat grup de proteïnes (Vorderwülbecke et al., 2005). Aquesta característica permet disminuir notablement la complexitat proteica de la mostra, fet altament rellevant en les mostres sèriques de pacients. En base a l'estudi realitzat, l'*array* CM10 va ser l'emprat gràcies als majors rendiments de precisió, reproductibilitat i diferències proteiques entre els grups. No obstant, previ a la introducció de la mostra al bioxip, es va realitzar un pretractament per reduir encara més la seva complexitat.

L'estudi proteòmic realitzat en el grup de definició va mostrar sis proteïnes estadísticament significatives entre els pacients que presentaven una recurrència del VHC després del trasplantament hepàtic i els que no (grup control). Entre elles, el pic proteic de m/z 5.905 (5,9 kDa) fou el més interessant, car es trobava completament suprimit en els pacients amb recurrència del VHC en comparació amb el grup control, on presentava una intensitat mitjana de 257,1 μ A. Aquests primers resultats van posar de manifest la inequívoca utilitat d'aquest tipus d'estratègia i, alhora, van emfatitzar la clara alteració proteica existent ja des dels inicis del procés fibrogènic. Cal tenir present que l'anàlisi proteòmica es va dur a terme amb mostres sèriques de pacients trasplantats obtingudes tan sols 6 mesos després de la cirurgia. Si bé la biòpsia hepàtica es va realitzar 6 mesos després (1 any post-trasplantament), molts dels pacients presentaven estadis fibròtics lleus i moderats. Per tant, és factible pensar

que als sis mesos post-cirurgia la gran majoria d'ells es trobava en un estadi molt inicial del procés fibrogènic.

Arribats en aquest punt, era important confirmar que les variacions observades fins al moment eren degudes al procés fibròtic i no pas a quelcom relacionat amb el VHC. Per aquest motiu es van seleccionar mostres sèriques d'individus sans, pacients fibròtics i cirròtics amb VHC però sense haver estat sotmesos a un trasplantament hepàtic i finalment un grup de pacients fibròtics i cirròtics amb etiologies diferents a la del VHC (EHNA, HA, hepatitis autoimmune, VHB i criptogènica). Les característiques bioquímiques i demogràfiques d'aquest grup de pacients van ser similars a les observades en el grup de definició. L'única excepció fou, com era d'esperar, en els enzims hepàtics, els quals eren clarament superior en els pacients fibròtics sotmesos al trasplantament. Aquesta diferència però, no va ser rellevant a l'hora d'analitzar el perfil proteòmic dels diferents pacients. Novament, la concentració sèrica del pic proteic de 5,9 kDa es trobava totalment reduïda en els pacients fibròtics independent de l'etiologia i del trasplantament hepàtic. Per contra, els individus sans mostraven intensitats molt elevades ($391,9 \pm 43,1 \mu\text{A}$). Totes aquestes observacions van permetre reafirmar la hipòtesi que l'alteració del pic proteic de 5,9 kDa era deguda exclusivament al procés fibròtic.

La validació dels resultats en qualsevol estudi és un altre pas fonamental per confirmar les observacions detectades. Així doncs, per poder determinar el comportament del pic de m/z 5.905, es van analitzar 83 pacients amb VHC i sotmesos a un trasplantament hepàtic per mitjà del SELDI-TOF MS. Totes les mostres sèriques dels pacients fibròtics presentaven intensitats clarament reduïdes en comparació amb les observades en els individus sense un procés fibrogènic actiu. De fet, en la majoria d'ells el pic proteic es trobava completament suprimit. Globalment doncs, aquests resultats van emfatitzar l'elevada sensibilitat i poder diagnòstic que presentava el pic proteic de 5,9 kDa.

Una de les limitacions de la tecnologia SELDI-TOF MS està relacionada amb la impossibilitat de caracteritzar directament les proteïnes d'interès (Ndao et al., 2010). No obstant, per tal d'identificar el pic proteic de m/z 5.905, es va procedir a un enriquiment previ de la proteïna en qüestió per mitjà de resines cromatogràfiques i a una posterior separació i purificació mitjançant gels d'electroforesi. Seguidament, la banda es va escindir, tripsinitzar i finalment analitzar per espectrometria de masses en tàndem. En el nostre cas, la seqüència aminoacídica del pic proteic de 5,9 kDa va indicar que es tractava del fragment C-terminal de la cadena α del fibrinogen.

El fibrinogen és una de les proteïnes més abundants en sang i juga un paper clau en el procés de coagulació (Davalos i Akassoglou, 2012; Mosesson et al., 2001). Estructuralment, aquesta glicoproteïna de fase aguda de 340 kDa està composta per dos conjunts simètrics de

tres cadenes diferents conegudes com $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ i γ , les quals estan sintetitzades per gens independents tots ells localitzats en el cromosoma 4 (Herrick et al., 1999; Kant et al., 1985). Si bé les evidències existents apunten als hepatòcits com els majors inductors de la síntesi del fibrinogen, estudis *in vitro* han observat com diversos estímuls inflamatoris poden induir també la secreció d'aquesta glicoproteïna en cèl·lules tan dispars com les epitelials, les cèl·lules de carcinoma de coll uterí o els trofoblasts, entre d'altres (Weisel, 2005). La cadena $\text{A}\alpha$ predominant és la cadena polipeptídica més llarga, que conté 610 residus i un pes de 63,5 kDa. Les cadenes $\text{B}\beta$ (56 kDa) i γ (48 kDa) presenten un total de 461 i 411 aminoàcids, respectivament. No obstant, totes elles són molt heterogènies a causa dels *splicings* alternatius, a les MPTs i a les degradacions proteolítiques (Herrick et al., 1999). L'extrem N-terminal de cada cadena està enllaçat per ponts disulfur, formant el seu domini central "E". En aquesta regió, les cadenes $\text{A}\alpha$ i $\text{B}\beta$ presenten una petita seqüència peptídica coneguda com a fibrinopèptid A i B, respectivament, que són crucials per a la prevenció de la conversió de fibrinogen a fibrina (Gorkun et al., 1997; Weisel et al., 1993). A l'extrem oposat, els fragments C-terminal de les cadenes $\text{B}\beta$ i γ , juntament amb una porció de la cadena $\text{A}\alpha$, constitueixen els dos dominis exteriors "D" (Mosesson, 2005). La seqüència peptídica final de la cadena $\text{A}\alpha$ s'anomena domini " αC " i forma una espècie d'apèndix que es mou lliurement (Doolittle, 1973) i pot interactuar no només entre si, sinó també amb la regió central de la molècula o fins i tot amb altres dominis " αC " en la polimerització de fibrina. A més a més, aquesta regió és susceptible de ser escindida per diverses proteases incloent la plasmina i consegüentment, ser alliberada a la circulació com un subproducte natural d'activació sistèmica fibrinolítica (Cesarman-Maus i Hajjar, 2005; Rudchenko et al., 1996). Els resultats obtinguts en aquest segon estudi mostren una concentració sèrica quasi inexistent del fragment C-terminal de la cadena α del fibrinogen en els pacients amb un procés fibrogènic actiu. Aquestes observacions coincideixen amb les detectada prèviament en pacients alcohòlics (Nomura et al., 2004). Concretament, aquest estudi va demostrar que els nivells sèrics d'aquest fragment es recuperaven quan la ingesta d'alcohol s'aturava durant més de 3 mesos. Més tard, el mateix grup va estendre els seus resultats als pacients infectats pel VHC (Sogawa et al., 2013). Tanmateix, diferents estudis apunten a que aquest fragment no és específic de la fibrosi hepàtica, car s'han observat també alteracions sèriques del mateix pèptid en pacients amb síndrome respiratòria aguda, amb càncer de mama i amb adenocarcinoma de pàncrees, entre d'altres (Belluco et al., 2007; Koopmann et al., 2004; Pang et al., 2006).

La regulació i síntesi del fibrinogen en la seva totalitat s'havia investigat amb anterioritat usant la línia cel·lular HepG2 (Knowles et al., 1980). Aquest model *in vitro* va permetre estudiar la producció i regulació del fibrinogen en funció de diferents estímuls proinflamatoris

(Mackiewicz et al., 1991). Malgrat això, el mecanisme pel qual el fragment de 5,9 kDa de la cadena α del fibrinogen es veia reduït en les mostres sèriques de pacients amb un procés fibrogènic actiu no estava aclarit. Per aquest motiu, es va decidir avaluar el potencial paper regulador de diversos agents profibrogènics i proinflamatoris implicats en la patogènesi dels processos fibrògens (Melgar-Lesmes et al., 2010, 2011; Reichenbach et al., 2013) sobre l'expressió de la cadena α del fibrinogen en les cèl·lules HepG2. De tots ells, només el TGF- β va mostrar una reducció significativa de l'expressió de la cadena α del fibrinogen (ARNm) i una disminució del fragment peptídic de 5,9 kDa. No obstant, el decrement d'aquest pic proteic fou clarament menor a l'observat en les mostres sèriques dels pacients fibròtics. Segurament, les diferències existents entre les condicions experimentals dels models *in vivo* i *in vitro* són una de les causes d'aquesta discordança. De fet, les HepG2 són una línia cel·lular de carcinoma hepatocel·lular humà les quals mostren una alteració en l'abundància dels receptors de TGF- β (Dituri et al., 2013; Liu et al., 2000). Aquest fet podria donar lloc a algun tipus de resistència a aquesta citocina i explicar la menor reducció del pic proteic. Per altra banda, és probable que l'efecte observat *in vivo* sigui conseqüència de múltiples factors, ja que és ben sabut que la regulació de proteïnes de fase aguda està modulada per una combinació de diverses citocines (Moshage, 1997). Aquesta situació planteja la possibilitat que existeixin altres agents implicats en la regulació de l'expressió del fragment de 5,9 kDa de fibrinogen i que provoquin un efecte sinèrgic en la reducció d'aquest pèptid. De fet, un estudi molt recent liderat pel Dr. Fumio Nomura (Kikuchi et al., 2016) sembla indicar que la reducció en l'alliberament d'aquest pèptid en pacients fibròtics no només és degut a una disminució en la síntesi de la cadena α del fibrinogen, sinó també a una alteració en les reaccions enzimàtiques. L'estudi preliminar apunta a que el fragment de 5,9 kDa és alliberat per enzims que s'activen posteriorment a la recollida de la sang. A més a més, s'afirma que la trombina actua com a iniciador del procés, mentre que la plasmina i l'elastasa neutròfila trenquen el fibrinogen per formar l'extrem N-terminal i el C-terminal del fragment de 5,9 kDa, respectivament.

Les observacions d'aquest estudi estan en consonància amb treballs anteriors on es demostrava l'efecte inhibidor del TGF- β envers el fibrinogen produït per la IL-6 en cèl·lules HepG2 (Mackiewicz et al., 1990). Tots aquests efectes semblen estar mediat per mecanismes postraduccional (Hassan et al., 1992). Globalment doncs, els resultats obtinguts fins al moment indiquen que l'activació de TGF- β en les fases inicials de la lesió hepàtica podria ser una de les responsables de l'alteració dels nivells circulants del fragment C-terminal de la cadena α del fibrinogen en els pacients amb una fibrogènesi hepàtica activa.

En resum, ambdós estudis demostren que, tant el model *in vivo* d'inducció a fibrosi en rates mitjançant la inhalació de CCl_4 com l'ús de pacients amb VHC i sotmesos a un

trasplantament hepàtic, són dues estratègies interessants per tal d'abordar la cerca de nous biomarcadors de detecció d'un procés fibròtic inicial. En concret, s'han observat alteracions proteòmiques en estadis molt precoços de la malaltia hepàtica, essent la SIPA1L1 i el fragment de 5,9 kDa de la cadena α del fibrinogen dos dels biomarcadors circulants més prometedors. En el primer estudi, la validació futura de SIPA1L1 en humans juntament amb la definició del seu mecanisme permetran confirmar les alteracions existents i focalitzar els esforços en tractaments específics que reverteixin aquest fenomen. En el segon treball en canvi, els recursos s'hauran de centrar en el disseny d'un immunoassaig específic d'aquest fragment peptídic per poder reduir la complexitat i la durada del protocol, permetre l'automatització del procés, minimitzar costos i facilitar, per tant, el seu ús massiu.

CONCLUSIONS

A partir dels resultats obtinguts en els dos estudis que componen aquesta tesi doctoral, es pot concloure que:

1. Existeix una signatura proteòmica diferencial entre les mostres sèriques de rates control, fibròtiques i cirròtiques.
2. L'anàlisi proteòmic lliure de marcatge ha permès identificar i validar SIPA1L1 com a potencial biomarcador sèric de fibrosi hepàtica inicial en el model *in vivo* d'inducció de fibrosi mitjançant l'administració crònica de CCl₄.
3. Els nivells sèrics de SIPA1L1 es mantenen reduïts en els animals amb fibrosi severa i cirrosi, en comparació amb el grup control.
4. A causa de l'elevada similitud en la seqüència aminoacídica de SIPA1L1 entre rates i humans, els resultats suggereixen que aquesta proteïna podria ser un bon marcador no invasiu de detecció de fibrosi precoç en pacients amb una malaltia hepàtica crònica.
5. Existeix un perfil proteòmic sèric diferencial entre els pacients fibròtics i els que presenten un procés fibrogènic actiu.
6. La diferent intensitat del pic proteic de m/z 5.905 (5,9 kDa) permet detectar, de forma altament sensible i específica, als pacients amb VHC i sotmesos a un trasplantament hepàtic que presenten un procés fibrogènic actiu.
7. L'alteració observada del pic proteic de 5,9 kDa és específica del procés fibrogènic i no pas deguda a altres factors derivats de les característiques particulars dels pacients estudiats.
8. Els estudis d'identificació van concloure que el pic proteic de 5,9 kDa corresponia al fragment C-terminal de la cadena α del fibrinogen.
9. Els experiments *in vitro* en la línia cel·lular HepG2 suggereixen que l'activació de TGF- β , en les fases primerenques de la lesió hepàtica, podria ser una de les responsables en l'alteració dels nivells circulants del fragment C-terminal de la cadena α del fibrinogen en els pacients que presenten un procés fibrogènic actiu.

Globalment, l'avaluació de la fibrosi hepàtica és de gran importància tant pel diagnòstic com pel tractament dels pacients amb una malaltia hepàtica crònica. En aquest context, la seva detecció pot ser millorada a través de la cerca de nous marcadors més sensibles i específics que permetin identificar la malaltia en estadis més inicials. Així doncs, i segons els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral, es pot concloure que tant la combinació de models experimentals amb tècniques proteòmiques lliures de marcatge, com l'ús de mostres pacients amb VHC i sotmesos a un trasplantament hepàtic amb la tecnologia SLEDI-TOF MS, són bones estratègies per desvetllar biomarcadors no invasius de fibrosi hepàtica inicial. En concret, SIPA1L1 i el fragment peptídic C-terminal de la cadena α del fibrinogen semblen ser dos nous marcadors sèrics que permetrien millorar significativament el diagnòstic precoç d'aquesta malaltia.

ANNEX

altres publicacions

- Reyes A., Marti J., **Marfa S.**, Jiménez W., Reichenbach V., Pelegrina A., Fondevila C., Garcia-Valdecasas J. C., Fuster J. (2017). Prognostic prediction by liver tissue proteomic profiling in patients with colorectal liver metastases. *Future Oncol.* doi: 10.2217/fo-2016-0461.
- **Marfà S.**, Jiménez W. (2016). Fibrinogen α -chain as a serum marker of liver disease. In: *Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications. Biomarkers in Liver Disease* (ed. V. R. Preedy), pp. 1-20. Dordrecht, Netherlands: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-007-7742-2_7-1.
- **Marfà S.**, Marti J., Reyes A., Casals G., Fernández-Varo G., Carvajal S., García-Valdecasas J. C., Fuster J., Jiménez W. (2016). Metastatic Tissue Proteomic Profiling Predicts 5-Year Outcomes in Patients with Colorectal Liver Metastases. *Transl Oncol.* 9(5), 445-452.
- Marcos J., Pol M., Fabregat A., Ventura R., Renau N., Hanzu F. A., Casals G., **Marfà S.**, Barceló B., Barceló A., Robles J., Segura J., Pozo O. J. (2015). Urinary cysteinyl progestogens: Occurrence and origin. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 152, 53-61.
- Casals G., Fernández-Varo G., Melgar-Lesmes P., **Marfà S.**, Reichenbach V., Morales-Ruiz M., Jiménez W. (2013). Factors involved in extracellular matrix turnover in human derived cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem.* 32(5), 1125-1136.
- Casals G., Azzalini L., Tomas C., **Marfa S.**, Morales-Ruiz M., Heras M., Jimenez W., Sionis A. (2012). Admission B-type natriuretic peptide retains prognostic value in patients with acute coronary syndrome and preserved left ventricular ejection fraction. *Int J Cardiol.* 158(3), 459-460.

REFERÈNCIES

- A-Kader H. H. (2012).** Practical approach to a child with hepatobiliary disorder. In: *Textbook of clinical paediatrics*, 2nd Edition (ed. A. Y. Elzouki, H. A. Harfi, H. M. Nazer, W. Oh, F. B. Stapleton, R. J. Whitley), pp 1971-1977. Berlin, Germany: Springer.
- Adam B. L., Vlahou A., Semmes O. J. and Wright G. L. Jr. (2001).** Proteomic approaches to biomarker discovery in prostate and bladder cancers. *Proteomics*. 1(10), 1264-1270.
- Adams L. A., Bulsara M., Rossi E., DeBoer B., Speers D., George J., Kench J., Farrell G., McCaughan G. W., Jeffrey G. P. (2005).** Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clin Chem*. 51(10), 1867-1873.
- Adkins J. N., Varnum S. M., Auberry K. J., Moore R. J., Angell N. H., Smith R. D., Springer D. L., Pounds J. G. (2002).** Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 1(12), 947-955.
- Aebbersold R., Mann M. (2003).** Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 422(6928), 198-207.
- Aivado M., Spentzos D., Alterovitz G., Otu H. H., Grall F., Giagounidis A. A., Wells M., Cho J. Y., Germing U., Czibere A., Prall W. C., Porter C., Ramoni M. F., Libermann T. A. (2005).** Optimization and evaluation of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) with reversed-phase protein arrays for protein profiling. *Clin Chem Lab Med*. 43(2), 133-140.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2007).** *Molecular Biology of the Cell*. 5th Edition. New York, USA: Garland Science.
- Altelaar A. F., Munoz J., Heck A. J. (2013).** Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet*. 14(1), 35-48.
- Anderson N. L., Anderson N. G. (1998).** Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*. 19(11), 1853-1861.
- Anderson N. L., Anderson N. G. (2002).** The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 1(11), 845-867. Erratum in: *Mol Cell Proteomics* (2003). 2(1), 50.
- Anderson N. L., Polanski M., Pieper R., Gatlin T., Tirumalai R. S., Conrads T. P., Veenstra T. D., Adkins J. N., Pounds J. G., Fagan R., Lobley A. (2004).** The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics*. 3(4), 311-326.
- Angulo P., Hui J. M., Marchesini G., et al. (2007).** The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 45(4), 846-854.
- Ardito F., Perrone D., Cocchi R., Lo Russo L., DE Lillo A., Giannatempo G., Lo Muzio L. (2016).** Novel possibilities in the study of the salivary proteomic profile using SELDI-TOF/MS technology. *Oncol Lett*. 11(3), 1967-1972.

- Armirotti A.,** Damonte G. (2010). Achievements and perspectives of top-down proteomics. *Proteomics*. 10(20), 3566-3576.
- Asselah T.,** Bièche I., Paradis V., Bedossa P., Vidaud M., Marcellin P. (2007). Genetics, genomics, and proteomics: implications for the diagnosis and the treatment of chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis*. 27(1), 13-27.
- Aston F. W.** (1919). A positive ray spectrograph. *Philosophical Magazine* 38(228), 707-714.
- Bakhtiar R.,** Tse F. L. (2000). Biological mass spectrometry: a primer. *Mutagenesis*. 15(5), 415-430.
- Bantscheff M.,** Schirle M., Sweetman G., Rick J., Kuster B. (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*. 389(4), 1017-1031.
- Baranova A.,** Lal P., Bircerdinc A., Younossi Z. M. (2011). Non-invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterol*. 11, 91.
- Bataller R.,** Brenner D. A. (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 115(2), 209-218.
- Bataller R.,** Brenner D. A. (2009). Pathogenesis of Hepatic Fibrosis. In: *Textbook of Gastroenterology*, 5th Edition (ed. T. Yamada, D. H. Alpers, N. Kaplowitz, C. Owyang, D. W. Powell, A. Kalloo), pp. 658-679. Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Baumann H.,** Gauldie J. (1994). The acute phase response. *Immunol Today*. 15(2), 74-80.
- Bedossa P.,** Carrat F. (2009). Liver biopsy: the best, not the gold standard. *J Hepatol*. 50(1), 1-3.
- Bedossa P.,** Dargère D., Paradis V. (2003). Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 38(6), 1449-1457.
- Belluco C.,** Petricoin E. F., Mammano E., Facchiano F., Ross-Rucker S., Nitti D., Di Maggio C., Liu C., Lise M., Liotta L. A., Whiteley G. (2007). Serum proteomic analysis identifies a highly sensitive and specific discriminatory pattern in stage 1 breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 14(9), 2470-2476.
- Benyon R. C.,** Iredale J. P. (2000). Is liver fibrosis reversible? *Gut*. 46(4), 443-446.
- Berenguer M.** (2002). Natural history of recurrent hepatitis C. *Liver Transpl*. 8(10 Suppl 1), S14-S18.
- Berenguer M.,** Prieto M., Palau A., Rayón J. M., Carrasco D., Juan F. S., López-Labrador F. X., Moreno R., Mir J., Berenguer J. (2003). Severe recurrent hepatitis C after liver retransplantation for hepatitis C virus-related graft cirrhosis. *Liver Transpl*. 9(3), 228-235.
- Berenguer M.,** Schuppan D. (2013). Progression of liver fibrosis in post-transplant hepatitis C: mechanisms, assessment and treatment. *J Hepatol*. 58(5), 1028-1041.
- Betrosian A. P.,** Agarwal B., Douzinas E. E. (2007). Acute renal dysfunction in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 13(42), 5552-5559.

- Biomarkers Definitions Working Group. (2001).** Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 69(3), 89-95.
- Bischoff R., Schlüter H. (2012).** Amino acids: chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications. *J Proteomics.* 75(8), 2275-2296.
- Bishop M. L., Fody E. P., Schoeff L. E. (2013).** *Clinical chemistry: Principles, techniques, correlations, 7th Edition.* Baltimore, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Blachier M., Leleu H., Peck-Radosavljevic M., Valla D. C., Roudot-Thoraval F. (2013).** The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol.* 58(3), 593-608.
- Blasco A., Fornis X., Carrión J. A., García-Pagán J. C., Gilibert R., Rimola A., Miquel R., Bruguera M., García-Valdecasas J. C., Bosch J., Navasa M. (2006).** Hepatic venous pressure gradient identifies patients at risk of severe hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Hepatology.* 43(3):492-499.
- Boeker K. H., Haberkorn C. I., Michels D., Flemming P., Manns M. P., Lichtinghagen R. (2002).** Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta.* 316(1-2), 71-81.
- Bosch J., Abraldes J. G., Berzigotti A., García-Pagan J. C. (2009).** The clinical use of HVPG measurements in chronic liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 6(10), 573-582.
- Boschetti E., Chung M. C., Righetti P. G. (2012).** "The quest for biomarkers": are we on the right technical track? *Proteomics Clin Appl.* 6(1-2), 22-41.
- Boursier J., Isselin G., Fouchard-Hubert I., Oberti F., Dib N., Lebigot J., Bertrais S., Gallois Y., Calès P., Aubé C. (2010).** Acoustic radiation force impulse: a new ultrasonographic technology for the widespread noninvasive diagnosis of liver fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 22(9), 1074-1084.
- Braun R. J., Kinkl N., Beer M. and Ueffing M. (2007).** Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal Bioanal Chem.* 389(4), 1033-1045.
- Buhimschi I. A. (2012).** Using SELDI-TOF mass spectrometry on amniotic fluid and for clinical proteomics and theranostics in disorders of pregnancy. *Methods Mol Biol.* 818, 171-197.
- Cadranel J. F., Rufat P., Degos F. (2000).** Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEFL). *Hepatology.* 32(3), 477-481.
- Calès P., Boursier J., Oberti F., Hubert I., Gallois Y., Rousselet M. C., Dib N., Moal V., Macchi L., Chevaller A., Michalak S., Hunault G., Chaigneau J., Sawadogo A., Lunel F. (2008).** FibroMeters: a family of blood tests for liver fibrosis. *Gastroenterol Clin Biol.* 32(6 Suppl 1), 40-51.

- Calès P.**, Oberti F., Michalak S., Hubert-Fouchard I., Rousselet M. C., Konaté A., Gallois Y., Ternisien C., Chevaller A., Lunel F. (2005). A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology*. 42(6), 1373-1381.
- Carrión J. A.** (2009). [Utility of Fibroscan in the evaluation of liver fibrosis]. *Gastroenterol Hepatol*. 32(6), 415-423.
- Carrión J. A.**, Fernández-Varo G., Bruguera M., García-Pagán J. C., García-Valdecasas J. C., Pérez-Del-Pulgar S., Forns X., Jiménez W., Navasa M. (2010). Serum fibrosis markers identify patients with mild and progressive hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Gastroenterology*. 138(1), 147-158.e1.
- Casado P.**, Alcolea M. P., Iorio F., Rodríguez-Prados J. C., Vanhaesebroeck B., Saez-Rodríguez J., Joel S., Cutillas P. R. (2013). Phosphoproteomics data classify hematological cancer cell lines according to tumor type and sensitivity to kinase inhibitors. *Genome Biol*. 14(4), R37.
- Casado P.**, Bilanges B., Rajeeve V., Vanhaesebroeck B., Cutillas P. R. (2014). Environmental stress affects the activity of metabolic and growth factor signaling networks and induces autophagy markers in MCF7 breast cancer cells. *Mol Cell Proteomics*. 13(3), 836-848.
- Castera L.** (2012). Noninvasive methods to assess liver disease in patients with hepatitis B or C. *Gastroenterology*. 142(6), 1293-1302.
- Castera L.** (2014). Hepatitis B: are non-invasive markers of liver fibrosis reliable? *Liver Int*. 34(Suppl 1), 91-96.
- Castera L.**, Foucher J., Bernard P. H., Carvalho F., Allaix D., Merrouche W., Couzigou P., de Lédinghen V. (2010a). Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13,369 examinations. *Hepatology*. 51(3), 828-835.
- Castera L.**, Pinzani M. (2010). Biopsy and non-invasive methods for the diagnosis of liver fibrosis: does it take two to tango? *Gut*. 59(7), 861-866.
- Castera L.**, Sebastiani G., Le Bail B., de Lédinghen V., Couzigou P., Alberti A. (2010b). Prospective comparison of two algorithms combining non-invasive methods for staging liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 52(2), 191-198.
- Cesarman-Maus G.**, Hajjar K. A. (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*. 129(3), 307-321.
- Chalasani N.**, Clark W. S., Martin L. G., Kamean J., Khan M. A., Patel N. H., Boyer T.D. (2000). Determinants of mortality in patients with advanced cirrhosis after transjugular intrahepatic portosystemic shunting. *Gastroenterology*. 118(1), 138-144.
- Chan K. C.**, Lucas D. A., Hise D., Schaefer C. F., Xiao Z., Janini G. M., Buetow K. H., Issaq H. J., Veenstra T. D., Conrads T. P. (2004). Analysis of the human serum proteome. *Clin Proteomics*. 1(2), 101-225.

- Charlton M.**, Everson G. T., Flamm S. L., et al. (2015). Ledipasvir and Sofosbuvir Plus Ribavirin for Treatment of HCV Infection in Patients With Advanced Liver Disease. *Gastroenterology*. 149(3), 649-659
- Cheng J. H.**, She H., Han Y. P., Wang J., Xiong S., Asahina K., Tsukamoto H. (2008). Wnt antagonism inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 294, G39-G49.
- Cheng S. L.**, Shao J. S., Halstead L. R., Distelhorst K., Sierra O., Towler D. A. (2010). Activation of vascular smooth muscle parathyroid hormone receptor inhibits Wnt/beta-catenin signaling and aortic fibrosis in diabetic arteriosclerosis. *Circ Res*. 107, 271-282.
- Choi T. Y.**, Ninov N., Stainier D. Y., Shin D. (2014). Extensive conversion of hepatic biliary epithelial cells to hepatocytes after near total loss of hepatocytes in zebrafish. *Gastroenterology*. 146(3),776-788.
- Clària J.**, Jiménez W. (2005). Experimental Models of Cirrhosis and Ascites. In: *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment*, 2nd Edition. (ed. P. Ginés, V. Arroyo, J. Rodés and R. W. Schrier), pp. 215-226. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Cohen S. L.**, Chait B. T. (1996). Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins. *Anal Chem*. 68(1), 31-37.
- Constandinou C. C.**, Henderson N., Iredale J. (2005). Modeling liver fibrosis in rodents. In: *Fibrosis Research: Methods and Protocols*. (ed. J. Varga, D. A. Brenner, S. H. Phan), pp. 237-250. Totowa, USA: Humana Press.
- Cox M. M.**, Doudna J., O'Donnell M. (2015). *Molecular biology. Principles and practice*. New York, USA: W.H. reeman and Company.
- Crespo G.**, Fernández-Varo G., Mariño Z., Casals G., Miquel R., Martínez S. M., Gilabert R., Forns X., Jiménez W., Navasa M. (2012). ARFI, FibroScan, ELF, and their combinations in the assessment of liver fibrosis: a prospective study. *J Hepatol*. 57(2), 281-287.
- Curry M. P.**, O'Leary J. G., Bzowej N., et al. (2015). Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV in Patients with Decompensated Cirrhosis. *N Engl J Med*. 373(27), 2618-2628.
- DallaPiazza M.**, Amorosa V. K., Localio R., Kostman J. R., Lo Re V 3rd. (2010). Prevalence and risk factors for significant liver fibrosis among HIV-monoinfected patients. *BMC Infect Dis*. 10, 116.
- D'Amico G.**, Garcia-Tsao G., Pagliaro L. (2006). Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol*. 44(1), 217-231.
- Davalos D.**, Akassoglou K. (2012). Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin Immunopathol*. 34(1), 43-62.

- De Bock M.**, de Seny D., Meuwis M. A., Chapelle J. P., Louis E., Malaise M., Merville M. P., Fillet M. (2010). Challenges for biomarker discovery in body fluids using SELDI-TOF-MS. *J Biomed Biotechnol.* 2010, 906082.
- Denisov E.**, Damoc E., Lange O., Makarov A. (2012). Orbitrap mass spectrometry with resolving powers above 1,000,000. *Int. J. Mass Spectrom.* 325-327, 80-85.
- Desmet V. J.**, Roskams T. (2003). Reversal of cirrhosis: evidence-based medicine? *Gastroenterology.* 125(2), 629-630.
- Desmet V. J.**, Roskams T. (2004). Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol.* 40(5), 860-867.
- Devarajan P.**, Ross G. F. (2009). Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization for Urinary Proteome Analysis. In: *Renal and Urinary Proteomics: Methods and Protocols* (ed. V. Thongboonkerd), pp. 299-320. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Diao L.**, Clarke C. H., Coombes K. R., Hamilton S. R., Roth J., Mao L., Czerniak B., Baggerly K. A., Morris J. S., Fung E. T., Bast R. C. Jr. (2011). Reproducibility of SELDI Spectra Across Time and Laboratories. *Cancer Inform.* 10, 45-64.
- Dienstag J. L.**, Goldin R. D., Heathcote E. J., Hann H. W., Woessner M., Stephenson S. L., Gardner S, Gray D. F., Schiff E. R. (2003). Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology.* 124(1), 105-117.
- Dijkstra M.**, Vonk R. J., Jansen R. C. (2006). SELDI-TOF mass spectra: a view on sources of variation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 847(1), 12-23.
- Dituri F.**, Mazzocca A., Fernando J., Papappicco P., Fabregat I., De Santis F., Paradiso A., Sabbà C., Giannelli G. (2013). Differential Inhibition of the TGF- β Signaling Pathway in HCC Cells Using the Small Molecule Inhibitor LY2157299 and the D10 Monoclonal Antibody against TGF- β Receptor Type II. *PLoS One.* 8(6), e67109.
- Doolittle R. F.** (1973). Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion. *Adv Protein Chem.* 27, 1-109.
- Domon B.**, Aebersold R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science.* 312(5771), 212-217.
- Doonan S.** (2002). Peptides and Proteins. In *Tutorial Chemistry Texts*, pp. 1-16. Cambridge, UK: RSC.
- Du Y.**, Parks B. A., Sohn S., Kwast K. E., Kelleher N. L. (2006). Top-down approaches for measuring expression ratios of intact yeast proteins using Fourier transform mass spectrometry. *Anal Chem.* 78(3), 686-694.
- Dufour J. F.**, DeLellis R., Kaplan M. M. (1997). Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med.* 127(11), 981-985.

- Dunn W. B.**, Broadhurst D., Brown M., Baker P. N., Redman C. W., Kenny L. C., Kell D. B. (2008). Metabolic profiling of serum using Ultra Performance Liquid Chromatography and the LTQ-Orbitrap mass spectrometry system. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 871(2), 288-298.
- El-Serag H. B.** (2011). Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 365(12), 1118-1127.
- Eliuk S.**, Makarov A. (2015). Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 8, 61-80.
- Ellis E. L.**, Mann D. A. (2012). Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *J Hepatol.* 56(5), 1171-1180.
- European Association for the Study of the Liver.** (2011). EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 55(2), 245-264.
- Fahey B. J.**, Nightingale K. R., Nelson R. C., Palmeri M. L., Trahey G. E. (2005). Acoustic radiation force impulse imaging of the abdomen: demonstration of feasibility and utility. *Ultrasound Med Biol.* 31(9), 1185-1198.
- Farnsworth N.**, Fagan S. P., Berger D. H., Awad S. S. (2004). Child-Turcotte-Pugh versus MELD score as a predictor of outcome after elective and emergent surgery in cirrhotic patients. *Am J Surg.* 188(5), 580-583.
- Fattovich G.**, Stroffolini T., Zagni I., Donato F. (2004). Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology.* 127(5 Suppl 1), S35-S50.
- Feld J. J.**, Jacobson I. M., Hézode C., et al. (2015). Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection. *N Engl J Med.* 373(27), 2599-2607.
- Féray C.**, Samuel D., Thiers V., Gigou M., Pichon F., Bismuth A., Reynes M., Maisonneuve P., Bismuth H., Bréchot C. (1992). Reinfection of liver graft by hepatitis C virus after liver transplantation. *J Clin Invest.* 89(4), 1361-1365.
- Fernández-Varo G.** (2012). Marcadores serológicos de fibrosis. *Gastroenterol Hepatol.* 35(Suppl 2), 10-16.
- Fernández-Varo G.**, Oró D., Cable E. E., Reichenbach V., Carvajal S., de la Presa B. G., Wiśniewski K., Ginés P., Harris G., Jiménez W. (2016). Vasopressin 1a receptor partial agonism increases sodium excretion and reduces portal hypertension and ascites in cirrhotic rats. *Hepatology.* 63(1), 207-216.
- Fields S.** (2001). Proteomics. Proteomics in genomeland. *Science.* 291(5507), 1221-1224.
- Finehout E. J.**, Lee K. H. (2004). An introduction to mass spectrometry applications in biological research. *Biochem Mol Biol Educ.* 32(2), 93-100.
- Forner A.**, Llovet J. M., Bruix J. (2012). Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 379(9822):1245-1255.

- Forns X.**, Ampurdanès S., Llovet J. M., Aponte J., Quintó L., Martínez-Bauer E., Bruguera M., Sánchez-Tapias J. M., Rodés J. (2002). Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*. 36(4 Pt 1), 986-992.
- Foucher J.**, Chanteloup E., Vergniol J., Castéra L., Le Bail B., Adhoute X., Bertet J., Couzigou P., de Lédinghen V. (2006). Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut*. 55(3),403-408.
- Friedman S. L. (2003)**. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol*. 38(Suppl 1), S38-53.
- Friedman S. L. (2008a)**. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 134(6), 1655-1669.
- Friedman S. L. (2008b)**. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 88(1), 125-172.
- Friedman S. L. (2010)**. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 7(8), 425-436.
- Friedrich-Rust M.**, Ong M. F., Martens S., Sarrazin C., Bojunga J., Zeuzem S., Herrmann E. (2008). Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *Gastroenterology*. 134(4), 960-974.
- Friedrich-Rust M.**, Rosenberg W., Parkes J., Herrmann E., Zeuzem S., Sarrazin C. (2010). Comparison of ELF, FibroTest and FibroScan for the non-invasive assessment of liver fibrosis. *BMC Gastroenterol*. 10, 103.
- Fruilio N.**, Trillaud H. (2013). Ultrasound elastography in liver. *Diagn Interv Imaging*. 94(5), 515-534.
- Fukao T.**, Mitchell G., Sass J. O., Hori T., Orii K., Aoyama Y. (2014). Ketone body metabolism and its defects. *J Inherit Metab Dis*. 37(4), 541-551
- Fürst P.**, Stehle P. (2004). What are the essential elements needed for the determination of amino acid requirements in humans? *J Nutr*. 134(6 Suppl), 1558S-1565S.
- Fuster J.**, Charco R., Llovet J. M., Bruix J., García-Valdecasas J. C. (2005). Liver transplantation in hepatocellular carcinoma. *Transpl Int*. 18(3), 278-282.
- Gallo C.**, Ciavarella D., Santarelli A., Ranieri E., Colella G., Lo Muzio L., Lo Russo L. (2016). Potential Salivary Proteomic Markers of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics*. 13(1), 55-61.
- Gandhi, C. R. (2014)**. Cellular Anatomy of the Liver (Hepatocyte, Biliary Epithelial Cells, Kupffer Cells, Hepatic Stellate Cells). In: *Pathobiology of Human Disease:A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*, 1st. Edition (ed. L. M. McManus and R. N. Mitchell), pp. 1759-1769. Philadelphia, USA: Elsevier, Inc.

- Gao Q.**, Srinivasan S., Boyer S. N., Wazer D. E., Band V. (1999). The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. *Mol Cell Biol.* 19(1), 733-744.
- Gao Z. H.**, Seeling J. M., Hill V., Yochum A., Virshup D. M. (2002). Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(3), 1182-1187.
- Garcia-Tsao G.**, Bosch J. (2010). Management of varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *N Engl J Med.* 362(9), 823-832. Erratum in: *N Engl J Med* (2011). 364(5), 490.
- Gerber S. A.**, Rush J., Stemman O., Kirschner M. W., Gygi S. P. (2003). Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(12), 6940-6945.
- Gillette M. A.**, Carr S. A. (2013). Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. *Nat Methods.* 10(1), 28-34.
- Ginès P.**, Cárdenas A., Arroyo V., Rodés J. (2004). Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med.* 350(16), 1646-1654.
- Girometti R.**, Furlan A., Bazzocchi M., Soldano F., Isola M., Toniutto P., Bitetto D., Zuiani C. (2007). Diffusion-weighted MRI in evaluating liver fibrosis: a feasibility study in cirrhotic patients. *Radiol Med.* 112(3), 394-408.
- Glish G. L.**, Burinsky D. J. (2008). Hybrid mass spectrometers for tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 19(2), 161-172.
- Gonçalves A.**, Charafe-Jauffret E., Bertucci F., Audebert S., Toiron Y., Esterni B., Monville F., Tarpin C., Jacquemier J., Houvenaeghel G., Chabannon C., Extra J. M., Viens P., Borg J. P., Birnbaum D. (2008). Protein profiling of human breast tumor cells identifies novel biomarkers associated with molecular subtypes. *Mol Cell Proteomics.* 7(8), 1420-1433.
- Gorkun O. V.**, Veklich Y. I., Weisel J. W., Lord S. T. (1997). The conversion of fibrinogen to fibrin: recombinant fibrinogen typifies plasma fibrinogen. *Blood.* 89(12), 4407-4414.
- Granger J.**, Siddiqui J., Copeland S., Remick D. (2005). Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. *Proteomics.* 5(18), 4713-4718.
- Grant D. M.** (1991). Detoxification pathways in the liver. *J Inherit Metab Dis.* 14(4), 421-430.
- Graveley B. R.** (2001). Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.* 17(2), 100-107.
- Gressner A. M.**, Bachem M. G. (1990). Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Semin Liver Dis.* 10(1), 30-46.
- Greten T. F.**, Papendorf F., Bleck J. S., Kirchhoff T., Wohlberedt T., Kubicka S., Klempnauer J., Galanski M., Manns M. P. (2005). Survival rate in patients with hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis of 389 patients. *Br J Cancer.* 92(10):1862-1868.

- Grigorescu M. (2006).** Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis. *J Gastrointest Liver Dis.* 15(2), 149-159.
- Griffiths J. (2008).** A brief history of mass spectrometry. *Anal Chem.* 80(15), 5678-5683.
- Grønbaek K., Christensen P. B., Hamilton-Dutoit S., Federspiel B. H., Hage E., Jensen O. J., Vyberg M. (2002).** Interobserver variation in interpretation of serial liver biopsies from patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 9(6), 443-449.
- Groszmann R. J., Garcia-Tsao G., Bosch J., Grace N. D., Burroughs A. K., Planas R., Escorsell A., Garcia-Pagan J. C., Patch D., Matloff D. S., Gao H., Makuch R.; Portal Hypertension Collaborative Group. (2005).** Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 353(21), 2254-2261.
- Guéchet J., Lasnier E., Sturm N., Paris A., Zarski J. P.; ANRS HC EP 23 Fibrostar study group. (2010).** Automation of the Hepascore and validation as a biochemical index of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C from the ANRS HC EP 23 Fibrostar cohort. *Clin Chim Acta.* 411(1-2), 86-91.
- Guechet J., Laudat A., Loria A., Serfaty L., Poupon R., Giboudeau J. (1996).** Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen aminoterminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin Chem.* 42, 558-563.
- Guha I. N., Parkes J., Roderick P., Chattopadhyay D., Cross R., Harris S., Kaye P., Burt A. D., Ryder S. D., Aithal G. P., Day C. P., Rosenberg W. M. (2008).** Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology.* 47(2), 455-460.
- Gygi S. P., Rist B., Gerber S. A., Turecek F., Gelb M. H., Aebersold R. (1999).** Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* 17(10), 994-999.
- Halfon P., Bourlière M., Pénaranda G., Deydier R., Renou C., Botta-Fridlund D., Tran A., Portal I., Allemand I., Rosenthal-Allieri A., Ouzan D. (2005).** Accuracy of hyaluronic acid level for predicting liver fibrosis stages in patients with hepatitis C virus. *Comp Hepatol.* 4, 6.
- Hall J. E., Guyton A. C. (2011).** Metabolismo de las proteínas. In: *Guyton y Hall: Tratado de fisiología médica*, 12ª Edición. pp. 953-966. Barcelona, España: Elsevier España, S.L.
- Ham B. M., MaHam A. (2015).** *Analytical Chemistry: a chemist and laboratory technician's toolkit.* Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Hamilton S., Langford P. R. (2013).** Identification of biomarkers of infectious disease using surface-enhanced laser desorption/ionisation mass spectrometry. In: *Quantitative proteome analysis: methods and applications* (ed. K. Imai, S. Y. F. Li), pp. 226-274. Boca Raton, USA: Taylor & Francis Group, LLC.

- Han X.**, Aslanian A., Yates JR. 3rd. (2008). Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* 12(5), 483-490.
- Hanash S.** (2003). Disease proteomics. *Nature.* 422(6928), 226-232.
- Hanash S.**, Celis J. E. (2002). The Human Proteome Organization: a mission to advance proteome knowledge. *Mol Cell Proteomics.* 1(6), 413-414.
- Hannivoort R. A.**, Hernandez-Gea V., Friedman S. L. (2012). Genomics and proteomics in liver fibrosis and cirrhosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 5(1), 1.
- Hardman M.**, Makarov A. A. (2003). Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. *Anal Chem.* 75(7), 1699-1705.
- Hassan J. H.**, Chelucci C., Peschle C., Sorrentino V. (1992). Transforming growth factor beta (TGF-beta) inhibits expression of fibrinogen and factor VII in a hepatoma cell line. *Thromb Haemost.* 67(4), 478-483.
- Hasse J. M.** (2008). Nutrition aspects of liver failure. In: *Nutrition and gastrointestinal disease*, 1st Edition (ed. M. H. DeLegge), pp. 85-106. Totowa, USA: Humana Press, Inc.
- Herebian D.**, Lamshöft M., Mayatepek E., Spiekerkoetter U. (2010). Identification of NTBC metabolites in urine from patients with hereditary tyrosinemia type 1 using two different mass spectrometric platforms: triple stage quadrupole and LTQ-Orbitrap. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 24(6), 791-800.
- Hernández B.**, Parnell A., Pennington S. R. (2014). Why have so few proteomic biomarkers "survived" validation? (Sample size and independent validation considerations). *Proteomics.* 14(13-14), 1587-1592.
- Hernandez-Gea V.**, Friedman S. L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 6, 425-456.
- Herrick S.**, Blanc-Brude O., Gray A., Laurent G. (1999). Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol.* 31(7), 741-746.
- Hézode C.**, Roudot-Thoraval F., Nguyen S., Grenard P., Julien B., Zafrani E. S., Pawlotsky J. M., Dhumeaux D., Lotersztajn S., Mallat A. (2005). Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 42(1), 63-71. Erratum in: *Hepatology* (2005). 42(2), 506.
- Hoffmann E.**, Stroobant V. (2007). *Mass spectrometry: principles and applications*, 3rd Edition. Chichester, New York: Wiley-Interscience.
- Hong H.**, Dragan Y., Epstein J., Teitel C., Chen B., Xie Q., Fang H., Shi L., Perkins R., Tong W. (2005). Quality control and quality assessment of data from surface-enhanced laser desorption/ionization (SELDI) time-of flight (TOF) mass spectrometry (MS). *BMC Bioinformatics.* (6)Suppl 2, S5.

- Hortin G. L., Sviridov D. (2010).** The dynamic range problem in the analysis of the plasma proteome. *J Proteomics*. 73(3), 629-636.
- Hsu C. C., Chou P. T., Zare R. N. (2015).** Imaging of Proteins in Tissue Samples Using Nanospray Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 87(22), 11171-11175.
- Huch M. (2015).** Regenerative biology: The versatile and plastic liver. *Nature*. 517(7533), 155-156.
- Hui C. K., Leung N., Shek T. W., Yao H., Lee W. K., Lai J. Y., Lai S. T., Wong W. M., Lai L. S., Poon R. T., Lo C. M., Fan S. T., Lau G. K. (2007).** Hong Kong Liver Fibrosis Study. Sustained disease remission after spontaneous HBeAg seroconversion is associated with reduction in fibrosis progression in chronic hepatitis B Chinese patients. *Hepatology*. 46(3), 690-698.
- Hutchens T. W., Yip T. T. (1993).** New desorption strategies for mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 7, 576-580
- Huwart L., van Beers B. E. (2008).** MR elastography. *Gastroenterol Clin Biol*. 32(6 Suppl 1), 68-72.
- Imbert-Bismut F., Ratziu V., Pieroni L., Charlotte F., Benhamou Y., Poinard T; MULTIVIRC Group. (2001).** Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet*. 357(9262), 1069-1075.
- Inutan E. D., Trimpin S. (2013).** Matrix assisted ionization vacuum (MAIV), a new ionization method for biological materials analysis using mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 12(3), 792-796.
- Iredale J. P. (2007).** Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest*. 117(3), 539-548.
- Ishak K., Baptista A., Bianchi L., et al. (1995).** Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 22(6), 696-699
- Jansen P. L. M., Beuers, U., Elferink, O. (2012).** Mechanisms of Bile Secretion. In: *Zakim and Boyer's hepatology :a textbook of liver disease*, 6th Edition (ed. T. D. Boyer, M. P. Manns and A. J. Sanyal), pp. 47-63. Philadelphia, USA: Elsevier, Inc.
- Jeong W. K., Lim H. K., Lee H. K., Jo J. M., Kim Y. (2014).** Principles and clinical application of ultrasound elastography for diffuse liver disease. *Ultrasonography*. 33(3), 149-160.
- Jiang F, Parson C. J., Stefanovic B. (2006).** Gene expression profile of quiescent and activated rat hepatic stellate cells implicates Wnt signaling pathway in activation. *J Hepatol*. 45(3), 401-409.
- Jiang X., Ye M., Zou H. (2008).** Technologies and methods for sample pretreatment in efficient proteome and peptidome analysis. *Proteomics*. 8(4), 686-705.

- Jiménez W.**, Clària J., Arroyo V., Rodés J. (1992). Carbon tetrachloride induced cirrosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 7(1), 90-97.
- Jock C. A.**, Paulauskis J. D., Baker D., Olle E., Bleavins M. R., Johnson K. J., Heard P. L. (2004). Influence of matrix application timing on spectral reproducibility and quality in SELDI-TOF-MS. *Biotechniques.* 37(1), 30-2, 34.
- Johns T. N.**, Evans B. B. (1962). Collateral pathways in portal hypertension. *Ann Surg.* 155, 838-845.
- Kalli A.**, Smith G. T., Sweredoski M. J., Hess S. (2013). Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers. *J Proteome Res.* 12(7), 3071-3086.
- Kamath P. S.**, Wiesner R. H., Malinchoc M., Kremers W., Therneau T. M., Kosberg C. L., D'Amico G., Dickson E. R., Kim W.R. (2001). A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology.* 33(2), 464-470.
- Kanmura S.**, Uto H., Kusumoto K., Ishida Y., Hasuike S., Nagata K., Hayashi K., Ido A., Stuver S. O., Tsubouchi H. (2007). Early diagnostic potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system. *Hepatology.* 45(4), 948-956.
- Kant J. A.**, Fornace A. J. Jr., Saxe D., Simon M. I., McBride O. W., Crabtree G. R. (1985). Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(8), 2344-2348.
- Karch K. R.**, Zee B. M., Garcia B. A. (2014). High resolution is not a strict requirement for characterization and quantification of histone post-translational modifications. *J Proteome Res.* 13(12), 6152-6159.
- Kelleher N. L.**, Lin H. Y., Valaskovic G. A., Aaserud D. J., Fridriksson E. K., McLafferty F. W. (1999). Top down versus bottom up protein characterization by tandem high-resolution mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 806-812.
- Kelleher T. B.**, Mehta S. H., Bhaskar R., Sulkowski M., Astemborski J., Thomas D. L., Moore R. E., Afdhal N. H. (2005). Prediction of hepatic fibrosis in HIV/HCV co-infected patients using serum fibrosis markers: the SHASTA index. *J Hepatol.* 43(1), 78-84.
- Kelly P.**, Paulin F., Lamont D., Baker L., Clearly S., Exon D., Thompson A. (2012). Pre-treatment plasma proteomic markers associated with survival in oesophageal cancer. *Br J Cancer.* 106(5), 955-961.
- Kenny L. C.**, Broadhurst D. I., Dunn W., Brown M., North R. A., McCowan L., Roberts C., Cooper G. J., Kell D. B., Baker P. N.; Screening for Pregnancy Endpoints Consortium. (2010). Robust early pregnancy prediction of later preeclampsia using metabolomic biomarkers. *Hypertension.* 56(4), 741-749.
- Kent S. B.** (2009). Total chemical synthesis of proteins. *Chem Soc Rev.* 38(2), 338-351.

- Kikuchi W.**, Nishimura M., Kuga T., Tsuchida S., Saito T., Satoh M., Noda K., Kodera Y., Tomonaga T., Nomura F. (2016). Fibrinogen alpha C chain 5.9 kDa fragment (FIC5.9), a biomarker for various pathological conditions, is produced in post-blood collection by fibrinolysis and coagulation factors. *Clin Proteomics*. 13, 27.
- Kim M. S.**, Pinto S. M., Getnet D., et al. (2014). A draft map of the human proteome. *Nature*. 509(7502), 575-581.
- Kim W.**, Bennett E. J., Huttlin E. L., Guo A., Li J., Possemato A., Sowa M. E., Rad R., Rush J., Comb M. J., Harper J. W., Gygi S. P. (2011). Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell*. 44(2), 325-340.
- Kingdon K. H.** (1923). A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures. *Physical Review*. 21(4), 408-418.
- Kisseleva T.**, Brenner D. A. (2006). Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 21 Suppl 3, S84-S87.
- Knodell R. G.**, Ishak K. G., Black W. C., Chen T. S., Craig R., Kaplowitz N., Kiernan T. W., Wollman J. (1981). Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*. 1(5), 431-435.
- Knowles B. B.**, Howe C. C., Aden D. P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*. 209(4455), 497-499.
- Koda M.**, Matunaga Y., Kawakami M., Kishimoto Y., Suou T., Murawaki Y. (2007). FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 45(2), 297-306.
- Koopmann J.**, Zhang Z., White N., Rosenzweig J., Fedarko N., Jagannath S., Canto M. I., Yeo C. J., Chan D. W., Goggins M. (2004). Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res*. 10(3), 860-868.
- Koppelaar D. W.**, Barinaga C. J., Denton M. B., Sperline R. P., Hieftje G. M., Schilling G. D., Andrade F. J., Barnes J. H. 4th. (2005). MS detectors. *Anal Chem*. 77(21), 418A-427A.
- Kovtoun S. V.**, Cotter R. J. (2000). Mass-correlated pulsed extraction: theoretical analysis and implementation with a linear matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom*. 11(10), 841-853.
- Kral J. G.**, Thung S. N., Biron S., Hould F. S., Lebel S., Marceau S., Simard S., Marceau P. (2004). Effects of surgical treatment of the metabolic syndrome on liver fibrosis and cirrhosis. *Surgery*. 135(1), 48-58.

- Kuhn E.**, Wu J., Karl J., Liao H., Zolg W., Guild B. (2004). Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ¹³C-labeled peptide standards. *Proteomics*. 4(4), 1175-1186.
- Kweon Y. O.**, Goodman Z. D., Dienstag J. L., Shiff E. R., Brown N. A., Buschardt E., Schoonhoven R., Brenner D. A., Fried M. W. (2001). Decreasing fibrogenesis: An immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 35(6), 749-755.
- Lander E. S.**, Linton L. M., Birren B. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409(6822), 860-921.
- Lane L. A.**, Qian X., Smith A. M., Nie S. (2015). Physical chemistry of nanomedicine: understanding the complex behaviors of nanoparticles in vivo. *Annu Rev Phys Chem*. 66, 521-547.
- Larance M.**, Lamond A. I. (2015). Multidimensional proteomics for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 16(5), 269-280.
- Larsen M. R.**, Trelle M. B., Thingholm T. E., Jensen O. N. (2006). Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. *Biotechniques*. 40(6), 790-798.
- Laurent T. C.**, Fraser J. R. (1992). Hyaluronan. *FASEB J*. 6(7), 2397-2404.
- Lawitz E.**, Makara M., Akarca U. S., et al. (2015). Efficacy and Safety of Ombitasvir, Paritaprevir, and Ritonavir in an Open-Label Study of Patients With Genotype 1b Chronic Hepatitis C Virus Infection With and Without Cirrhosis. *Gastroenterology*. 149(4), 971-980.
- Lee U. E.**, Friedman S. L. (2011). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 25(2), 195-206.
- Leroy V.**, Hilleret M. N., Sturm N., Trocme C., Renversez J. C., Faure P., Morel F., Zarski J. P. (2007). Prospective comparison of six non-invasive scores for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 46(5), 775-782.
- Li W.**, Zhu C., Chen X., Li Y., Gao R., Wu Q. (2011). Pokeweed antiviral protein down-regulates Wnt/beta-catenin signalling to attenuate liver fibrogenesis in vitro and in vivo. *Dig Liver Dis*. 43(7), 559-566.
- Li Y.**, Wu J., Zhang W., Zhang N., Guo H. (2013). Identification of serum CCL15 in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 108(1), 99-106.
- Li Z.**, Adams R. M., Chourey K., Hurst G. B., Hettich R. L., Pan C. (2012). Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on LTQ Orbitrap Velos. *J Proteome Res*. 11(3), 1582-1590.
- Lichtinghagen R.**, Pietsch D., Bantel H., Manns M. P., Brand K., Bahr M. J. (2013). The Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score: normal values, influence factors and proposed cut-off values. *J Hepatol*. 59(2), 236-242.

- Lim Y. S., Kim W. R. (2008).** The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease. *Clin Liver Dis.* 12(4), 733-746, vii.
- Lim A. K., Patel N., Hamilton G., Hajnal J. V., Goldin R. D., Taylor-Robinson S. D. (2003).** The relationship of in vivo ³¹P MR spectroscopy to histology in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 37(4), 788-794.
- Lindor K. D., Bru C., Jorgensen R. A., Rakela J., Bordas J. M., Gross J. B., Rodes J., McGill D. B., Reading C. C., James E. M., Charboneau J.W., Ludwig J., Batts K. P., Zinsmeister A. R. (1996).** The role of ultrasonography and automatic-needle biopsy in outpatient percutaneous liver biopsy. *Hepatology.* 23(5), 1079-1083.
- Liu P., Menon K., Alvarez E., Lu K., Teicher B. A. (2000).** Transforming growth factor- β and response to anticancer therapies in human liver and gastric tumors in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 16(3), 599-610.
- Liu Z., Yuan Z., Zhao Q. (2014).** SELDI-TOF-MS proteomic profiling of serum, urine, and amniotic fluid in neural tube defects. *PLoS One.* 9(7), e103276.
- Lodish, H., Berk A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnel, J. (2000).** *Molecular Cell Biology.* 4th edition. New York, USA: W. H. Freeman.
- Lozano R., Naghavi M., Foreman K., et al. (2012).** Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 380(9859), 2095-2128. Erratum in: *Lancet* (2013). 381(9867), 628.
- Lu Q., Ling W. (2016).** Ultrasound elastography in the assessment of liver fibrosis. In: *Operative techniques in liver resection*, 1st Edition. (ed. L. Yan), pp. 53-64. Springer Netherlands.
- Luca A., García-Pagán J. C., Bosch J., Feu F., Caballería J., Groszmann R. J., Rodés J. (1997).** Effects of ethanol consumption on hepatic hemodynamics in patients with alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology.* 112(4), 1284-1289.
- Luque-Garcia J. L., Neubert T. A. (2007).** Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1153(1-2), 259-276.
- Macías J., Berenguer J., Japón M. A., Girón J. A., Rivero A., López-Cortés L. F., Moreno A., González-Serrano M., Iribarren J. A., Ortega E., Miralles P., Mira J. A., Pineda J. A. (2009).** Fast fibrosis progression between repeated liver biopsies in patients coinfecting with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus. *Hepatology.* 50(4), 1056-1063.
- Mackiewicz A., Ganapathi M. K., Schultz D., Brabenec A., Weinstein J., Kelley M. F., Kushner I. (1990).** Transforming growth factor beta 1 regulates production of acute-phase proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(4), 1491-1495.
- Mackiewicz A., Speroff T., Ganapathi M. K., Kushner I. (1991).** Effects of cytokine combinations on acute phase protein production in two human hepatoma cell lines. *J Immunol.* 146(9), 3032-3037.

- Magdeldin S.**, Enany S., Yoshida Y., Xu B., Zhang Y., Zureena Z., Lokamani I., Yaoita E., Yamamoto T. (2014). Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Proteomics*. 11(1), 16
- Makarov, A. A. (1999)**. Mass spectrometer. US Patent, 5886346.
- Makarov A. A. (2000)**. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem*. 72(6), 1156-1162.
- Makarov A.** , Denisov E., Kholomeev A., Balschun W., Lange O., Strupat K., Horning S. (2006). Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem*. 78(7), 2113-2120.
- Malinchoc M.**, Kamath P. S., Gordon F. D., Peine C. J., Rank J., ter Borg P. C. (2000). A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology*. 31(4), 864-871.
- Manduca A.**, Oliphant T. E., Dresner M. A., Mahowald J. L., Kruse S. A., Amromin E., Felmlee J. P., Greenleaf J. F., Ehman R. L. (2001). Magnetic resonance elastography: non-invasive mapping of tissue elasticity. *Med Image Anal*. 5(4), 237-254.
- Mani H.**, Kleiner D. E. (2009). Liver biopsy findings in chronic hepatitis B. *Hepatology*. 49(5 Suppl), S61-71.
- Mann M.**, Kelleher N. L. (2008). Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(47), 18132-18138.
- Mannan R.**, Misra V., Misra S. P., Singh P. A., Dwivedi M. (2014). A comparative evaluation of scoring systems for assessing necro-inflammatory activity and fibrosis in liver biopsies of patients with chronic viral hepatitis. *J Clin Diagn Res*. 8(8), FC08-12.
- Marcellin P.**, Gane E., Buti M., et al. (2013). Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet*. 381(9865), 468-475.
- Marfà S.**, Marti J., Reyes A., Casals G., Fernández-Varo G., Carvajal S., García-Valdecasas J. C., Fuster J., Jiménez W. (2016). Metastatic Tissue Proteomic Profiling Predicts 5-Year Outcomes in Patients with Colorectal Liver Metastases. *Transl Oncol*. 9(5), 445-452.
- Marko-Varga G.**, Lindberg H., Löfdahl C. G., Jönsson P., Hansson L., Dahlbäck M., Lindquist E., Johansson L., Foster M., Fehniger T. E. (2005). Discovery of biomarker candidates within disease by protein profiling: principles and concepts. *J Proteome Res*. 4(4), 1200-1212
- Marshall A. G.**, Verdun F. R. (1990). *Fourier transformation in NMR, optical, and mass spectrometry: a user's handbook*. Amsterdam, NED: Elsevier.
- Martínez S. M.**, Crespo G., Navasa M., Forns X. (2011). Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology*. 53(1), 325-335.

- Martinez S. M.,** Fernández-Varo G., González P., Sampson E., Bruguera M., Navasa M., Jiménez W., Sánchez-Tapias J. M., Forn X. (2011). Assessment of liver fibrosis before and after antiviral therapy by different serum marker panels in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 33(1), 138-148.
- Matharoo-Ball B.,** Miles A. K., Creaser C. S., Ball G., Rees R. (2008). Serum biomarker profiling in cancer studies: a question of standardisation? *Vet Comp Oncol.* 6(4), 224-247.
- McCuskey, R. (2012).** Anatomy of the liver. In: *Zakim and Boyer's hepatology :a textbook of liver disease*, 6th Edition (ed. T. D. Boyer, M. P. Manns and A. J. Sanyal), pp. 3-19. Philadelphia, USA: Elsevier, Inc.
- Megger D. A.,** Bracht T., Meyer H. E., Sitek B. (2013). Label-free quantification in clinical proteomics. *Biochim Biophys Acta.* 1834(8), 1581-1590.
- Mehta S. H.,** Lau B., Afdhal N. H., Thomas D. L. (2009). Exceeding the limits of liver histology markers. *J Hepatol.* 50(1), 36-41.
- Melgar-Lesmes P.,** Casals G., Pauta M., Ros J., Reichenbach V., Bataller R., Morales-Ruiz M., Jimenez W. (2010). Apelin mediates the induction of profibrogenic genes in human hepatic stellate cells. *Endocrinology.* 151(11), 5306-5314.
- Melgar-Lesmes P.,** Pauta M., Reichenbach V., Casals G., Ros J., Bataller R., Morales-Ruiz M., Jiménez W. (2011). Hypoxia and proinflammatory factors upregulate apelin receptor expression in human stellate cells and hepatocytes. *Gut.* 60(10), 1404-1411.
- Menon A. G.,** Rutter J. L., von Sattel J. P., Synder H., Murdoch C., Blumenfeld A., Martuza R. L., von Deimling A., Gusella J. F., Houseal T. W. (1997). Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative 'tumor progression' locus. *Oncogene.* 14(5), 611-616.
- Mercer P. F.,** Chambers R. C. (2013). Coagulation and coagulation signalling in fibrosis. *Biochim Biophys Acta.* 1832(7), 1018-1027.
- (The French) METAVIR Cooperative Study Group. (1994).** Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 20(1 Pt 1), 15-20.
- Miao C. G.,** Yang Y. Y., He X., Huang C., Huang Y., Zhang L., Lv X. W., Jin Y., Li J. (2013). Wnt signaling in liver fibrosis: progress, challenges and potential directions. *Biochimie.* 95(12), 2326-2335.
- Michalopoulos G. K. (2007).** Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 213(2), 286-300.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. (2015).** Patrones de mortalidad en España, 2012.
<http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/estadisticas/estMinisterio/mortalidad/docs/PatronesMortalidadEspana2012.pdf>
- Mitchell P. (2010).** Proteomics retrenches. *Nat Biotechnol.* 28(7), 665-670.

- Miyai, K. (1991).** Structural organization of the liver. In: *Hepatotoxicology*, 1st Edition (ed. R. G. Meeks, S. D. Harrison, R. J. Bull), pp. 1-66. Florida, USA: CRC Press, Inc.
- Modrek B., Lee C. (2002).** A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet.* 30(1), 13-19.
- Møller S., Henriksen J. H. (2002).** Cirrhotic cardiomyopathy: a pathophysiological review of circulatory dysfunction in liver disease. *Heart.* 87(1), 9-15.
- Moore K. P., Aithal G. P. (2006).** Guidelines on the management of ascites in cirrhosis. *Gut.* 55 Suppl 6, vi1-12.
- Morales-Ruiz M., Tugues S., Cejudo-Martín P., Ros J., Melgar-Lesmes P., Fernández-Llama P., Arroyo V., Rodés J., Jiménez W. (2005).** Ascites from cirrhotic patients induces angiogenesis through the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Hepatol.* 43(1), 85-91.
- Mosesson M. W. (2005).** Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 3(8), 1894-1904.
- Mosesson M. W., Siebenlist K. R., Meh D. A. (2001).** The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci.* 936, 11-30.
- Moshage H. (1997).** Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol.* 181(3), 257-266.
- Mukherjee M., Gollan J. L. (2011).** Assessment of liver function. In: *Sherlock's diseases of the liver and biliary system*, 12th Edition (ed. J. S. Dooley, A. Lok, A. K. Burroughs, J. Heathcote), pp. 20-35. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Muñoz-Luque J., Ros J., Fernández-Varo G., Tugues S., Morales-Ruiz M., Alvarez C. E., Friedman S. L., Arroyo V., Jiménez W. (2008).** Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 324(2), 475-483.
- Muthupillai R., Lomas D. J., Rossman P. J., Greenleaf J. F., Manduca A., Ehman R. L. (1995).** Magnetic resonance elastography by direct visualization of propagating acoustic strain waves. *Science.* 269(5232), 1854-1857.
- Myung S. J., Yoon J. H., Gwak G. Y., Kim W., Lee J. H., Kim K. M., Shin C. S., Jang J. J., Lee S. H., Lee S. M., Lee H. S. (2007).** Wnt signaling enhances the activation and survival of human hepatic stellate cells. *FEBS Lett.* 581(16), 2954-2958.
- Ndao M., Rainczuk A., Rioux M. C., Spithill T. W., Ward B. J. (2010).** Is SELDI-TOF a valid tool for diagnostic biomarkers? *Trends Parasitol.* 26(12), 561-567.
- Nguyen P., Leray V., Diez M., Serisier S., Le Bloc'h J., Siliart B., Dumon H. (2008).** Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 92(3), 272-283.
- Niessen W. M., Falck D. (2015).** Introduction to Mass Spectrometry, a tutorial 1. In: *Analyzing biomolecular interactions by mass spectrometry*, 1st Edition. (ed. J. Kool and W. M. Niessen), pp. 1-54. Berlin, Germany: John Wiley & Sons, Ltd.

- Nøjgaard C.**, Johansen J. S., Christensen E., Skovgaard L. T., Price P. A., Becker U; EMALD Group. (2003). Serum levels of YKL-40 and PIIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 39(2), 179-186.
- Nomura F.**, Tomonaga T., Sogawa K., Ohashi T., Nezu M., Sunaga M., Kondo N., Iyo M., Shimada H., Ochiai T. (2004). Identification of novel and downregulated biomarkers for alcoholism by surface enhanced laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Proteomics.* 4(4), 1187-1194.
- Novikova S. I.**, He F., Cutrufello N. J., Lidow M. S. (2006). Identification of protein biomarkers for schizophrenia and bipolar disorder in the postmortem prefrontal cortex using SELDI-TOF-MS ProteinChip profiling combined with MALDI-TOF-PSD-MS analysis. *Neurobiol Dis.* 23(1), 61-76.
- O'Connor C. M.**, Adams J. U. (2010). *Essentials of Cell Biology*. Cambridge, MA: NPG Education.
- Olsen J. V.**, Macek B., Lange O., Makarov A., Horning S., Mann M. (2007). Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods.* 4(9), 709-712.
- Olsen J. V.**, Schwartz J. C., Griep-Raming J., Nielsen M. L., Damoc E., Denisov E., Lange O., Remes P., Taylor D., Splendore M., Wouters E. R., Senko M., Makarov A., Mann M., Horning S. (2009). A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Mol Cell Proteomics.* 8(12), 2759-2769.
- Ong S. E.**, Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D. B., Steen H., Pandey A., Mann M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 1(5), 376-386.
- Oró D.**, Yudina T., Fernández-Varo G., Casals E., Reichenbach V., Casals G., González de la Presa B., Sandalinas S., Carvajal S., Puentes V., Jiménez W. (2016). Cerium oxide nanoparticles reduce steatosis, portal hypertension and display antiinflammatory properties in rats with liver fibrosis. *J Hepatol.* 64(3), 691-698.
- Pamreddy A.**, Panyala N. R. (2016). Top-down proteomics: applications, recent developments and perspectives. *Journal of Applied Bioanalysis.* 2(2), 52-75.
- Panchaud A.**, Affolter M., Moreillon P., Kussmann M. (2008). Experimental and computational approaches to quantitative proteomics: status quo and outlook. *J Proteomics.* 71(1), 19-33.
- Pang R. T.**, Poon T. C., Chan K. C., Lee N. L., Chiu R. W., Tong Y. K., Wong R. M., Chim S. S., Ngai S. M., Sung J. J., Lo Y. M. (2006). Serum proteomic fingerprints of adult patients with severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem.* 52(3), 421-429.
- Parola M.**, Pinzani M. (2009). Hepatic wound repair. *Fibrogen Tissue Rep.* 2(1), 4.
- Patel K.**, Gordon S. C., Jacobson I., Hézode C., Oh E., Smith K. M., Pawlotsky J. M., McHutchison J. G. (2004). Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild

from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol.* 41(6), 935-942.

Patel V. J., Thalassinos K., Slade S. E., Connolly J. B., Crombie A., Murrell J. C., Scrivens J. H. (2009). A comparison of labeling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches. *J Proteome Res.* 8(7), 3752-3759.

Pauta M., Rotllan N., Fernández-Hernando A., Langhi C., Ribera J., Lu M., Boix L., Bruix J., Jimenez W., Suárez Y., Ford D. A., Baldán A., Birnbaum M. J., Morales-Ruiz M., Fernández-Hernando C. (2016). Akt-mediated foxo1 inhibition is required for liver regeneration. *Hepatology.* 63(5), 1660-1674.

Pauta M., Rotllan N., Vales F., Fernandez-Hernando A., Allen R. M., Ford D. A., Marí M., Jiménez W., Baldán A., Morales-Ruiz M., Fernández-Hernando C. (2013). Impaired liver regeneration in Ldlr^{-/-} mice is associated with an altered hepatic profile of cytokines, growth factors, and lipids. *J Hepatol.* 59(4), 731-737.

Pellicoro A., Ramachandran P., Iredale J. P., Fallowfield J. A. (2014). Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol.* 14(3), 181-194.

Pérez-Tamayo R. (1979). Cirrhosis of the liver: a reversible disease? *Pathol Annu.* 14 Pt 2, 183-213.

Pesavento J. J., Mizzen C. A., Kelleher N. L. (2006). Quantitative analysis of modified proteins and their positional isomers by tandem mass spectrometry: human histone H4. *Anal Chem.* 78(13), 4271-4280.

Peterson A. C., McAlister G. C., Quarmby S. T., Griep-Raming J., Coon J. J. (2010). Development and characterization of a GC-enabled QLT-Orbitrap for high-resolution and high-mass accuracy GC/MS. *Anal Chem.* 82(20), 8618-8628.

Piehowski P. D., Petyuk V. A., Orton D. J., Xie F., Moore R. J., Ramirez-Restrepo M., Engel A., Lieberman A. P., Albin R. L., Camp D. G., Smith R. D., Myers A. J. (2013). Sources of technical variability in quantitative LC-MS proteomics: human brain tissue sample analysis. *J Proteome Res.* 12(5), 2128-2137.

Pinzani M. (1999). Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol.* 21(4), 475-490.

Poynard T., Lebray P., Ingiliz P., Varaut A., Varsat B., Ngo Y., Norha P., Munteanu M., Drane F., Messous D., Bismut F. I., Carrau J. P., Massard J., Ratzu V., Giordanella J. P. (2010). Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest). *BMC Gastroenterol.* 10, 40.

Prudêncio M., Rodriguez A., Mota M. M. (2006). The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. *Nat Rev Microbiol.* 4(11), 849-856.

Pugh R. N., Murray-Lyon I. M., Dawson J. L., Pietroni M. C., Williams R. (1973). Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg.* 60(8), 646-649

- Puntmann V. O. (2009).** How-to guide on biomarkers: biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease. *Postgrad Med J.* 85(1008), 538-545.
- Quintana L. F.,** Campistol J. M., Alcolea M. P., Bañon-Maneus E., Sol-González A., Cutillas P. R. (2009). Application of label-free quantitative peptidomics for the identification of urinary biomarkers of kidney chronic allograft dysfunction. *Mol Cell Proteomics.* 8(7), 1658-1673.
- Rabilloud T. (2002).** Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics.* 2(1), 3-10.
- Radionova A.,** Filippov I., Derrick P. J. (2015). In pursuit of resolution in time-of-flight mass spectrometry: A historical perspective. *Mass Spectrom Rev.* doi: 10.1002/mas.21470. [Epub ahead of print]
- Rahn S. B. (2001).** Liver biopsy interpretation in chronic hepatitis. *J Insur Med.* 33(1), 110-113.
- Reeds P. J. (2000).** Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J Nutr.* 130(7), 1835S-1840S.
- Regev A.,** Berho M., Jeffers L. J., Milikowski C., Molina E. G., Pyrsopoulos N. T., Feng Z. Z., Reddy K. R., Schiff E. R. (2002). Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol.* 97(10), 2614–2618.
- Reichenbach V.,** Muñoz-Luque J., Ros J., Casals G., Navasa M., Fernández-Varo G., Morales-Ruiz M., Jiménez W. (2013). Bacterial lipopolysaccharide inhibits CB2 receptor expression in human monocytic cells. *Gut.* 62(7), 1089-1091.
- Reig M.,** Mariño Z., Perelló C., Iñarrairaegui M., Ribeiro A., Lens S., Díaz A., Vilana R., Darnell A., Varela M., Sangro B., Calleja J. L., Fornis X., Bruix J. (2016). Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *J Hepatol.* 65(4), 719-726.
- Ripoll C.,** Groszmann R. J., Garcia-Tsao G., Bosch J., Grace N., Burroughs A., Planas R., Escorsell A., Garcia-Pagan J. C., Makuch R., Patch D., Matloff D. S; Portal Hypertension Collaborative Group. (2009). Hepatic venous pressure gradient predicts development of hepatocellular carcinoma independently of severity of cirrhosis. *J Hepatol.* 50(5), 923-928.
- Ripoll C.,** Groszmann R., Garcia-Tsao G., Grace N., Burroughs A., Planas R., Escorsell A., Garcia-Pagan J. C., Makuch R., Patch D., Matloff D. S., Bosch J; Portal Hypertension Collaborative Group. (2007). Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology.* 133(2), 481-488.
- Roberts M. S.,** Angus D. C., Bryce C. L., Valenta Z., Weissfeld L. (2004). Survival after liver transplantation in the United States: a disease-specific analysis of the UNOS database. *Liver Transpl.* 10(7), 886-897.

- Roboz J. (2002).** *Mass spectrometry in cancer research*. Florida, USA: CRC Press LLC.
- Roboz J. (2008).** Applications of mass spectrometry in oncology. In: *Medical application of mass spectrometry* (ed. K. Vékey, A. Telekes and A. Vertes), pp. 379-406. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, B. V.
- Rockey D. C., Friedman S. L. (2012).** Hepatic fibrosis and cirrhosis. In: *Zakim and Boyer's hepatology :a textbook of liver disease*, 6th Edition (ed. T. D. Boyer, M. P. Manns and A. J. Sanyal), pp. 64-85. Philadelphia, USA: Elsevier, Inc.
- Rollin D., Whistler T., Vernon S. D. (2007).** Laboratory methods to improve SELDI peak detection and quantitation. *Proteome Sci.* 5, 9.
- Rosenberg W. M., Voelker M., Thiel R., Becka M., Burt A., Schuppan D., Hubscher S., Roskams T., Pinzani M., Arthur M. J.; European Liver Fibrosis Group. (2004).** Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology.* 127(6), 1704-1713.
- Roskams T., Desmet V. J., Verslype C. (2007).** Development, structure and function of the liver. In: *MacSween's Pathology of the Liver*, 5th Edition (ed. A. D. Burt, B. C. Portmann and L. D. Ferrell), pp. 1-74. Edinburgh, UK: Elsevier, Inc.
- Ross P. L., Huang Y. N., Marchese J. N., et al. (2004).** Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics.* 3(12), 1154-1169.
- Roulot D., Czernichow S., Le Clésiau H., Costes J. L., Vergnaud A. C., Beaugrand M. (2008).** Liver stiffness values in apparently healthy subjects: influence of gender and metabolic syndrome. *J Hepatol.* 48(4), 606-613.
- Rudchenko S., Trakht I., Sobel J. H. (1996).** Comparative structural and functional features of the human fibrinogen alpha C-domain and the isolated alpha C fragment. Characterization using monoclonal antibodies to defined COOH-terminal A alpha chain regions. *J Biol Chem.* 271(5), 2523-2530.
- Salguero, M. L. (2007).** Detoxification. In: *Integrative medicine*, 2nd Edition (ed. D. Rakel), pp. 1123-1136.
- Sandberg A., Branca R. M., Lehtiö J., Forshed J. (2014).** Quantitative accuracy in mass spectrometry based proteomics of complex samples: the impact of labeling and precursor interference. *J Proteomics.* 96, 133-144.
- Sandin M., Chawade A. and Levander F. (2015).** Is label-free LC-MS/MS ready for biomarker discovery? *Proteomics Clin Appl.* 9(3-4), 289-294.
- Sandrin L., Fourquet B., Hasquenoph J. M., Yon S., Fournier C., Mal F., Christidis C., Ziol M., Poulet B., Kazemi F., Beaugrand M., Palau R. (2003).** Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol.* 29(12), 1705-1713.

- Satoh T.**, Tsuno H., Iwanaga M., Kammei Y. (2005). The design and characteristic features of a new time-of-flight mass spectrometer with a spiral ion trajectory. *J Am Soc Mass Spectrom.* 16(12), 1969-1975.
- Sauer S.**, Kliem M. (2010). Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 8(1), 74-82.
- Scheuer P. J.** (1991). Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol.* 13(3), 372-374.
- Schiavon Lde L.**, Narciso-Schiavon J. L., de Carvalho-Filho R. J. (2014). Non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 20(11), 2854-2866.
- Schuppan D.**, Afdhal N. H. (2008). Liver Cirrhosis. *Lancet.* 371(9615), 838-851.
- Schuppan D.**, Kim Y. O. (2013). Evolving therapies for liver fibrosis. *J Clin Invest.* 123(5), 1887-1901.
- Schwegler E. E.**, Cazares L., Steel L. F., Adam B. L., Johnson D. A., Semmes O. J., Block T. M., Marrero J. A., Drake R. R. (2005). SELDI-TOF MS profiling of serum for detection of the progression of chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 41(3), 634-642.
- Scigelova M.**, Makarov A. (2006). Orbitrap mass analyzer - overview and applications in proteomics. *Proteomics.* 6(Suppl 2), 16-21.
- Sebastiani G.** (2012). Serum biomarkers for the non-invasive diagnosis of liver fibrosis: the importance of being validated. *Clin Chem Lab Med.* 50(4), 595-597
- Segovia-Silvestre T.**, Reichenbach V., Fernández-Varo G., Vassiliadis E., Barascuk N., Morales-Ruiz M., Karsdal M. A., Jiménez W. (2011). Circulating CO3-610, a degradation product of collagen III, closely reflects liver collagen and portal pressure in rats with fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 4, 19.
- Sephel G. C.**, Woodward S. C. (2009). Repair, regeneration, and fibrosis. In: *Essentials of Rubin's pathology*, 5th Edition (ed. E. Rubin, H. M. Reisner), pp. 36-70. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Serpaggi J.**, Carnot F., Nalpas B., Canioni D., Guéchet J., Lebray P., Vallet-Pichard A., Fontaine H., Bedossa P., Pol S. (2006). Direct and indirect evidence for the reversibility of cirrhosis. *Hum Pathol.* 37(12), 1519-1526.
- Sheth S. G.**, Flamm S. L., Gordon F. D., Chopra S. (1998). AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol.* 93(1), 44-48.
- Siuti N.**, Kelleher N. L. (2007). Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry. *Nat Methods.* 4(10), 817-821.
- Smith A.**, Morgan WT. (1981). Hemopexin-mediated transport of heme into isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 256(21), 10902-10909.

- Sogawa K.**, Noda K., Umemura H., Seimiya J. M., Kuga T., Tomonaga T., Nishimura M., Kanai F., Imazeki F., Takizawa H., Yoneda M., Nakajima A., Tsutsumi M., Yokosuka O., Nomura F. (2013). Serum fibrinogen α C-chain 5.9 kDa fragment as a biomarker for early detection in hepatic fibrosis related to hepatitis C virus. *Proteomic Clin Appl.* 7(5-6), 424-431.
- Soriano H. (2004).** Normal hepatocyte function and mechanisms of dysfunction. In: *Pediatric gastrointestinal disease: pathophysiology, diagnosis, management Volume 1.* 4th Edition (ed. W. A. Walker, O. Goulet, R. E. Kleinman, P. M. Sherman, B. L. Shneider, I. R. Sanderson), pp. 89-97. Hamilton, USA: BC Decker Inc.
- Srinivas P. R.**, Srivastava S., Hanash S. and Wright G. L. Jr. (2001). Proteomics in early detection of cancer. *Clin Chem.* 47(10), 1901-1911.
- Srinivasan G.**, James C. M., Krzycki J. A. (2002). Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science.* 296(5572), 1459-1462.
- Starkel P.**, Leclercq I. A. (2011). Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 25(2), 319-333.
- Sterling R. K.**, Lissen E., Clumeck N., Sola R., Correa M. C., Montaner J., Sulkowski M., Torriani F. J., Dieterich D. T., Thomas D. L., Messinger D., Nelson M; APRICOT Clinical Investigators. (2006). Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology.* 43(6), 1317-1325
- Suzuki A.**, Angulo P., Lymp J., Li D., Satomura S., Lindor K. (2005). Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 25(4), 779-786.
- Sun L.**, Zhu G., Dovichi N. J. (2013). Comparison of the LTQ-Orbitrap Velos and the Q-Exactive for proteomic analysis of 1-1000 ng RAW 264.7 cell lysate digests. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 27(1), 157-162.
- Swiatek W.**, Tsai I. C., Klimowski L., Pepler A., Barnette J., Yost H. J., Virshup D. M. (2004). Regulation of casein kinase I epsilon activity by Wnt signaling. *J Biol Chem.* 279(13), 13011-13017.
- Talwalkar J. A.**, Yin M., Fidler J. L., Sanderson S. O., Kamath P. S., Ehman R. L. (2008). Magnetic resonance imaging of hepatic fibrosis: emerging clinical applications. *Hepatology.* 47(1), 332-342.
- Teare J. P.**, Sherman D., Greenfield S. M., Simpson J., Bray G., Catterall A. P., Murray-Lyon I. M., Peters T. J., Williams R., Thompson R. P. (1993). Comparison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis. *Lancet.* 342(8876), 895-898.
- Tennent G. A.**, Brennan S. O., Stangou A. J., O'Grady J., Hawkins P. N., Pepys M. B. (2007). Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *Blood.* 109(5), 1971-1974.

- Theise N. D. (2007).** Liver biopsy assessment in chronic viral hepatitis: a personal, practical approach. *Mod Pathol.* 20(Suppl 1), S3-14.
- Thompson A., Schäfer J., Kuhn K., Kienle S., Schwarz J., Schmidt G., Neumann T., Johnstone R., Mohammed A. K., Hamon C. (2003).** Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem.* 75(8), 1895-1904. Erratum in: *Anal Chem.* (2003). 75(18), 4942.
- Thorbecke G. J., Liem H. H., Knight S., Cox K., Muller-Eberhard U. (1973).** Sites of formation of the serum proteins transferrin and hemopexin. *J Clin Invest.* 52(3), 725-731.
- Tirumalai R. S., Chan K. C., Prieto D. A., Issaq H. J., Conrads T. P., Veenstra T. D. (2003).** Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics.* 2(10), 1096-1103.
- Tolosano E., Hirsch E., Patrucco E., Camaschella C., Navone R., Silengo L., Altruda F. (1999).** Defective recovery and severe renal damage after acute hemolysis in hemopexin-deficient mice. *Blood.* 94(11), 3906-3914.
- Trak-Smayra V., Dargere D., Noun R., Albuquerque M., Yaghi C., Gannagé-Yared M. H., Bedossa P., Paradis V. (2009).** Serum proteomic profiling of obese patients: correlation with liver pathology and evolution after bariatric surgery. *Gut.* 58(6), 825-832.
- Tran J. C., Zamdborg L., Ahlf D. R., et al. (2011).** Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. *Nature.* 480(7376), 254-258.
- Trocme C., Leroy V., Sturm N., Hilleret M. N., Bottari S., Morel F., Zarski J. P. (2006).** Longitudinal evaluation of a fibrosis index combining MMP-1 and PIIINP compared with MMP-9, TIMP-1 and hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C treated by interferon-alpha and ribavirin. *J Viral Hepat.* 13(10), 643-651.
- Tsai I. C., Amack J. D., Gao Z. H., Band V., Yost H. J., Virshup D. M. (2007).** A Wnt-CKIvarepsilon-Rap1 pathway regulates gastrulation by modulating SIPA1L1, a Rap GTPase activating protein. *Dev Cell.* 12(3), 335-347.
- Tsochatzis E. A., Bosch J., Burroughs A.K. (2012).** New therapeutic paradigm for patients with cirrhosis. *Hepatology.* 56(5), 1983-1992.
- van Beek D., Funaki B. (2013).** Hemorrhage as a complication of percutaneous liver biopsy. *Semin Intervent Radiol.* 30(4), 413-416
- Vanbellingen Q. P., Elie N., Eller M. J., Della-Negra S., Touboul D., Brunelle A. (2015).** Time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging of biological samples with delayed extraction for high mass and high spatial resolutions. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 29(13), 1187-1195.
- Vargas-Blasco V. (2004).** Cirrosis hepatica. *Medicina Interna*, 2nd Edition (ed. J. Rodes, J. Guardia), pp 1505-1524. Barcelona, Spain: Masson.

- Veenstra T. D.**, Conrads T. P., Hood B. L., Avellino A. M., Ellenbogen R. G., Morrison R. S. (2005). Biomarkers: mining the biofluid proteome. *Mol Cell Proteomics*. 4(4), 409-418.
- Venkatesh S. K.**, Yin M., Ehman R. L. (2013). Magnetic resonance elastography of liver: technique, analysis, and clinical applications. *J Magn Reson Imaging*. 37(3), 544-555.
- Vinther-Jensen T.**, Simonsen A. H., Budtz-Jørgensen E., Hjermand L. E., Nielsen J. E. (2015). Ubiquitin: a potential cerebrospinal fluid progression marker in Huntington's disease. *Eur J Neurol*. 22(10), 1378-1384.
- Vorderwülbecke S.**, Cleverley S., Weinberger S. R., Wiesner A. (2005). Protein quantification by the SELDI-TOF-MS-based ProteinChip® System. *Nat Methods*. 2(5), 393-395.
- Wagner I.**, Musso H. (1983). New naturally occurring amino acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22(11), 816-828.
- Wai C. T.**, Greenson J. K., Fontana R. J., Kalbfleisch J. D., Marrero J. A., Conjeevaram H. S., Lok A. S. (2003). A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 38(2), 518-526
- Wakim-Fleming J.**, Mullen K. D. (2005). Long-term management of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis*. 9(1), 135-149.
- Walther T. C.**, Olsen J. V., Mann M. (2010). Yeast Expression Proteomics by High-Resolution Mass Spectrometry. *Meth Enzymol*. 470, 259-280.
- Wang J.**, Gardinali P. R. (2014). Identification of phase II pharmaceutical metabolites in reclaimed water using high resolution benchtop Orbitrap mass spectrometry. *Chemosphere*. 107, 65-73.
- Wasinger V. C.**, Cordwell S. J., Cerpa-Poljak A., Yan J. X., Gooley A. A., Wilkins M. R., Duncan M. W., Harris R., Williams K. L., Humphery-Smith I. (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 16(7):1090-1094.
- Watkins PB.** (2009). Biomarkers for the diagnosis and management of drug-induced liver injury. *Semin Liver Dis*. 29(4), 393-399.
- Weisel J. W.** (2005). Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem*. 70, 247-299.
- Weisel J. W.**, Veklich Y., Gorkun O. (1993). The sequence of cleavage of fibrinopeptides from fibrinogen is important for protofibril formation and enhancement of lateral aggregation in fibrin clots. *J Mol Biol*. 232(1), 285-297.
- West-Nørager M.**, Kelstrup C. D., Schou C., Høgdall E. V., Høgdall C. K., Heegaard N. H. (2007). Unravelling in vitro variables of major importance for the outcome of mass spectrometry-based serum proteomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 847(1), 30-37.

- Westin J.**, Lagging L. M., Spak F., Aires N., Svensson E., Lindh M., Dhillon A. P., Norkrans G., Wejstål R. (2002). Moderate alcohol intake increases fibrosis progression in untreated patients with hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 9(3), 235-241.
- WHO International Programme on Chemical Safety Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles.** (1993). Obtinguda de: http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc_numerical/en/ (Nº 155)
- WHO International Programme on Chemical Safety Biomarkers and Risk Assessment: Validity and Validation.** (2001). Obtinguda de: http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc_numerical/en/ (Nº 222)
- Wiesner R.**, Edwards E., Freeman R., Harper A., Kim R., Kamath P., Kremers W., Lake J., Howard T., Merion R. M., Wolfe R. A., Krom R; United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee. (2003). Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology.* 124(1), 91-96.
- Wilhelm M.**, Schlegl J., Hahne H., et al. (2014). Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature.* 509(7502), 582-587.
- Wilkins M.** (2009). Proteomics data mining. *Expert Rev Proteomics.* 6(6), 599-603.
- Wilkins M. R.**, Sanchez J. C., Gooley A. A., Appel R. D., Humphery-Smith I., Hochstrasser D. F., Williams K. L. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 13, 19-50.
- Wood S. L.**, Rogers M., Cairns D. A., Paul A., Thompson D., Vasudev N. S., Selby P. J., Banks R. E. (2010). Association of serum amyloid A protein and peptide fragments with prognosis in renal cancer. *Br J Cancer.* 103(1), 101-111.
- Xiao Z.**, Prieto D., Conrads T. P., Veenstra T. D., Issaq H. J. (2005). Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. *Mol Cell Endocrinol.* 230(1-2), 95-106.
- Yates J. R.**, Ruse C. I., Nakorchevsky A. (2009). Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 11, 49-79.
- Yilmaz N.**, Shiffman M. L., Stravitz R. T., Sterling R. K., Luketic V. A., Sanyal A. J., Mills A. S., Contos M. J., Coterell A., Maluf D., Posner M. P., Fisher R. A. (2007). A prospective evaluation of fibrosis progression in patients with recurrent hepatitis C virus following liver transplantation. *Liver Transpl.* 13(7), 975-983
- Yin M.**, Talwalkar J. A., Glaser K. J., Manduca A., Grimm R. C., Rossman P. J., Fidler J. L., Ehman R. L. (2007). Assessment of hepatic fibrosis with magnetic resonance elastography. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 5(10), 1207-1213.
- Zabrouskov V.**, Han X., Welker E., Zhai H., Lin C., van Wijk K. J., Scheraga H. A., McLafferty F. W. (2006). Stepwise deamidation of ribonuclease A at five sites determined by top down mass spectrometry. *Biochemistry.* 45(3), 987-992.
- Zein C. O.** (2010). Clearing the smoke in chronic liver diseases. *Hepatology.* 51(5), 1487-1490.

- Zenobi R., Knochenmuss R. (1998).** Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spect. Rev.* 17(5), 337-366.
- Zhang H., Ge Y. (2011).** Comprehensive analysis of protein modifications by top-down mass spectrometry. *Circ Cardiovasc Genet.* 4(6), 711.
- Zinoni F., Birkmann A., Stadtman T. C., Böck A. (1986).** Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(13), 4650-4654.

