



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

**Identificación y caracterización de microRNAs hepáticos  
como biomarcadores de esteatosis y colestasis por  
fármacos**

MIREIA LÓPEZ RIERA

DIRECTOR:

RAMIRO JOVER ATIENZA

PROGRAMA DE DOCTORADO: BIOMEDICINA Y  
BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultat de Ciències Biològiques

JULIO, 2019



**D. RAMIRO JOVER ATIENZA**, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia

CERTIFICA:

Que **Dña. MIREIA LÓPEZ RIERA**, Graduada en Farmacia por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo mi dirección la presente Tesis Doctoral titulada “**Identificación y caracterización de microRNAs hepáticos como biomarcadores de esteatosis y colestasis por fármacos**”, en el grupo acreditado de Hepatología Experimental y Trasplante Hepático del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

Y para que así conste, autorizo la defensa de la misma.

Fdo. D. Ramiro Jover Atienza



**Dña. MARÍA TERESA DONATO MARTÍN**, Doctora en Farmacia y Profesora adscrita al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia

CERTIFICA:

Que **Dña. MIREIA LÓPEZ RIERA**, Graduada en Farmacia por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo mi tutela la presente Tesis Doctoral titulada “**Identificación y caracterización de microRNAs hepáticos como biomarcadores de esteatosis y colestasis por fármacos**”, en el grupo acreditado de Hepatología Experimental y Trasplante Hepático del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

Y para que así conste, autorizo la defensa de la misma.

Fdo. Dña. María Teresa Donato Martín



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer este trabajo a toda la gente que me ha ayudado y apoyado durante todos estos años de investigación.

A los doctores José Vicente Castell y M<sup>a</sup> José Gómez-Lechón por haberme permitido formar parte del grupo de investigación de Hepatología Experimental del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Mi más sincero agradecimiento al director de esta tesis, el doctor Ramiro Jover por confiar en mi desde el principio y haberme dado la oportunidad de trabajar junto a su equipo. Pero, sobre todo, quiero agradecerle todo el tiempo invertido, sus consejos, ayuda y dedicación durante estos más de cinco años de duro trabajo. También me gustaría mencionar a la doctora Teresa Donato, que, como tutora de esta tesis, ha estado siempre dispuesta a ayudarme y resolver cualquiera de mis dudas.

Quiero agradecer a todos mis compañeros del grupo por acogerme y hacerme sentir una más del equipo desde el primer día. Gracias a su compañerismo y a su ayuda pude integrarme perfectamente en la rutina diaria de un laboratorio de investigación. Gracias a Carla y a Marta por todo el tiempo que dedicaron enseñándome desde lo más básico a la técnica más compleja.

A mi familia y amigos, a esas personas que siempre han estado ahí, apoyándome toda la vida y aguantándome tanto en los buenos como en los malos momentos. Gracias a su paciencia y a sus sabios consejos he conseguido llegar hasta aquí.

A todos y cada uno de vosotros, GRACIAS.



## INDICE

<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b>	15
<b>LISTADO DE TABLAS</b>	19
<b>LISTADO DE FIGURAS</b>	21
<b>RESUMEN</b>	27
<b>1- INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 El hígado	31
1.1.1 Anatomía hepática	31
1.1.2 Funciones del hígado	33
1.1.3 Ácidos biliares, bilis y transportadores hepatobiliares	35
1.2 Hepatotoxicidad	39
1.2.1 Definición e incidencia	39
1.2.2 Clasificación de la hepatotoxicidad y factores de riesgo	41
1.2.3 Mecanismos de hepatotoxicidad	43
1.3 Esteatosis hepática no alcohólica	45
1.3.1 Epidemiología	46
1.3.2 Historia natural y progresión	46
1.3.3 Etiopatogenia	48
1.3.4 Esteatosis hepática iatrogénica	49
1.4 Colestasis iatrogénica	50
1.4.1 Epidemiología	51
1.4.2 Etiopatogenia	51
1.4.3 Fármacos asociados a colestasis	53
1.5 Modelos para el estudio del DILI	54
1.5.1 Modelos <i>in vivo</i>	54
1.5.2 Modelos <i>in vitro</i>	55

1.6 Diagnóstico actual del DILI y nuevos biomarcadores	58
1.6.1 Biomarcadores clásicos para el diagnóstico y clasificación del DILI	59
1.6.2 Diagnóstico de EHGNA mediante pruebas de imagen	61
1.6.3 Diagnóstico de EHGNA mediante biopsia hepática	62
1.6.4 Nuevos biomarcadores	65
1.7 microRNAs	66
1.7.1 Biogénesis y función de los miRNAs	66
1.7.2 Regulación en la producción de los miRNAs	70
1.7.3 miRNAs como agentes o dianas terapéuticas	72
1.7.4 miRNAs circulantes como biomarcadores	72
1.8 Hipótesis del trabajo y objetivos	75

## **2- MATERIALES Y MÉTODOS**

2.1 Compuestos y fármacos	79
2.2 Cultivos celulares, incubación con compuestos y ensayos de citotoxicidad	80
2.2.1 Células HepG2	80
2.2.2 Hepatocitos humanos Upcyte	82
2.2.3 Hepatocitos humanos y hepatocitos de rata	85
2.2.4 Incubaciones <i>in vitro</i> y ensayo de citotoxicidad	85
2.3 Pacientes y sujetos control	86
2.3.1 Cohorte del estudio “EHGNA”	86
2.3.2 Cohortes del estudio “DILI”	88
2.3.3 Obtención y procesamiento de muestras	88
2.4 Purificación de RNA y cuantificación de miRNAs y mRNAs por RT-qPCR	89

2.4.1	Purificación de RNA total de células en cultivo y suero	89
2.4.2	Cuantificación de miRNAs en muestras celulares y séricas	92
2.4.3	Cuantificación de mRNAs en muestras celulares	97
2.5	Array de miRNAs (Affymetrix)	99
2.6	Secuenciación masiva de miRNAs	101
2.6.1	Secuenciación de miRNAs de hepatocitos humanos Upcyte	101
2.6.2	Secuenciación de miRNAs de suero humano	102
2.7	Cuantificación de lípidos intracelulares	103
2.7.1	Cuantificación de lípidos intracelulares mediante <i>High Content Screening</i> (HCS)	103
2.7.2	Cuantificación de triglicéridos intracelulares mediante ensayos colorimétricos	105
2.8	Electroforesis	106
2.9	Transfección de RNA de interferencia	107
2.10	Tratamiento de los datos y análisis estadísticos	109

### 3- RESULTADOS

#### Capítulo 1: Búsqueda de biomarcadores predictores de esteatosis iatrogénica

3.1	Efectos de la Ciclosporin A (CYCA) en el miRNoma de células HepG2	115
3.2	Los fármacos esteatósicos modelo presentan una huella común en el perfil de expresión de miRNAs en células HepG2	117
3.3	Confirmación del efecto de los fármacos esteatósico modelo sobre los miRNAs en hepatocitos humanos en cultivo	125

3.4 Los fármacos esteatósicos modelo incrementan la liberación de miRNAs al medio de cultivo	126
3.5 Algunos fármacos comúnmente prescritos para el síndrome metabólico también inducen los miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica	127
3.6 Las combinaciones de fármacos para SM potencian la inducción de los miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica	131
3.7 Algunos fármacos comúnmente prescritos para el SM inducen la acumulación de lípidos en células HepG2	133
3.8 Los miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica regulan mRNAs relacionados con el metabolismo lipídico	138

## **Capítulo 2: Búsqueda de miRNAs biomarcadores de esteatosis metabólica. Análisis comparativo del rendimiento predictivo entre miRNAs biomarcadores y biomarcadores clínicos**

3.9 Búsqueda de miRNAs identificados previamente como biomarcadores en pacientes de EHGNA	144
3.10 Características de la población de estudio	145
3.11 Nivel de expresión sérico de los miRNAs postulados previamente y su relación con el nivel de expresión en hígado	149
3.12 Validación de los miRNAs como biomarcadores para la esteatohepatitis no alcohólica y la fibrosis avanzada	153
3.13 Asociación de los miRNAs circulantes con las variables clínicas	158
3.14 Rendimiento diagnóstico de los miRNAs biomarcadores circulantes	159

3.15 Modelos de clasificación multivariante basados en los miRNAs séricos y/o variables clínicas clásicas	167
3.16 ¿Son los miRNAs biomarcadores de gravedad para la EHGNA identificados hasta ahora los mejores candidatos posibles?	169

### **Capítulo 3: Búsqueda de biomarcadores diagnósticos de colestasis iatrogénica**

3.17 El cultivo de hepatocitos en sándwich de colágeno favorece la expresión de los transportadores de ácidos biliares	175
3.18 miRNAs alterados por compuestos colestásicos modelo en hepatocitos humano	177
3.19 Identificación de una firma de miRNAs alterados por diferentes compuestos colestásicos	181
3.20 Características de las cohortes de pacientes de DILI	186
3.21 Niveles circulantes de miRNAs asociados a fármacos colestásicos en pacientes de DILI	192
3.22 Análisis secuencial de miRNAs circulantes en el suero de pacientes de DILI	199
3.23 Análisis del rendimiento de los nuevos miRNAs como biomarcadores para la clasificación de pacientes de DILI	202

### **4- DISCUSIÓN**

4.1 Búsqueda de biomarcadores de esteatosis iatrogénica	209
4.2 Búsqueda de biomarcadores de colestasis iatrogénica	222
4.3 Analisis integral y comparativo de los miRNAs identificados intracelularmente y en el suero de los pacientes	230

<b>5- CONCLUSIONES</b>	237
------------------------	-----

<b>6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	241
<b>7- ANEXO I</b>	265
<b>8- ANEXO II</b>	289

## **LISTADO DE ABREVIATURAS:**

AB: Ácidos biliares  
ABCG5/8: *ATP-binding cassette sub-family G member 5/8*  
AG: Ácidos grasos  
AGO: Argonauta  
AINE: Antiinflamatorio no esteroideo  
ALT: Alanino aminotransferasa  
AMIK: Amikacina  
AMIO: Amiodarona  
AMIT: Amitriptilina  
AMLO: Amlodipino  
ANIT:  $\alpha$ -naftil-isotiocianato  
APRI: *AST to platelet ratio index*  
ARFI: Fuerza de radiación acústica de impulsos  
ASPI: Ácido acetilsalicílico  
ATOR: Atorvastatina  
ATP: Adenosín trifosfato  
BCRP: *Breast cancer resistance protein*  
BSEP: *Bile salt export pump*  
CA: *Cholic acid* (Ácido cólico)  
CDCA: *Chenodeoxycholic acid* (Ácido quenodesoxicólico)  
CHLO: Clorpromazina  
CITR: Citrato  
Ck18: Citoqueratina 18  
Cmax: Concentración terapéutica máxima  
Ct: *PCR threshold cycle*  
CYCA: Ciclosporina  
CYP450: Citocromo P450  
DCA: *Deoxycholic acid* (Ácido desoxicólico)  
DGCR8: *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*  
DIAZ: Diazepam  
DILI: *Drug-induced liver injury* (Lesión hepática inducida por fármacos)  
DM2: Diabetes mellitus tipo 2  
DMSO: Dimetilsulfóxido

DOXY: Doxiciclina  
EHGNA: Enfermedad del hígado graso no alcohólico  
EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica  
ERM: Elementos de respuesta de miRNA  
ETHY: Etinilestradiol  
FA: Fosfatasa alcalina  
FENO: Fenofibrato  
FLIP: *Fatty liver inhibition of progression*  
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
Hb: Hemoglobina  
HCS: *High content screening*  
HDCT: Hidroclorotiazida  
HDL: *High density lipoprotein* (Lipoproteína de alta densidad)  
HOMA: *Homeostatic model assessment*  
HTX: Hepatotoxicidad  
HU: Hepatocitos Upcyte  
IMC: Índice de masa corporal  
IPSCs: *Induced pluripotent stem cells* (Células madre pluripotentes inducidas)  
IRBE: Irbesartan  
KETO: Ketotifeno  
LCA: *Lithocholic acid* (Ácido litocólico)  
LDL: *Low density lipoprotein* (Lipoproteína de baja densidad)  
LORA: Lorazepam  
LSN: Límite superior de normalidad  
MAPR: Maprotilina  
MDR1: *Multidrug resistance protein 1*  
MDR3: *Multiple Drug Resistance 3*  
METF: Metformina  
miRNA: microRNA  
MMP: Potencial de membrana mitocondrial  
mRNA: *messenger RNA* (RNA mensajero)  
MRP2: *Multidrug resistance protein 2*  
MRP3: *Multidrug resistance protein 3*

MRP4: *Multidrug resistance protein 4*  
NAS: *NAFLD activity score*  
NLR: Razón de verosimilitud negativa  
NTCP: *Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide*  
OATPs: *Organic anion-transporting polypeptides*  
OMEPr: Omeprazol  
OST $\alpha/\beta$ : *Organic solute transporter  $\alpha/\beta$*   
PARA: Paracetamol  
PARO: Paroxetina  
PBGD: Porfobilinógeno deaminasa  
PBS: *Phosphate-buffered saline* (Tampón fosfato salino)  
PCA: *Principal components analysis* (Análisis de componentes principales)  
PLR: Razón de verosimilitud positiva  
PLS-DA: Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales  
RISC: *RNA-induced silencing complex*  
RNAi: RNA de interferencia  
RNAseq: Secuenciación de RNA  
RT-qPCR: *Real time-quantitative PCR* (PCR cuantitativa en tiempo real)  
RUCAM: *Roussel-Uclaf Causality Assessment Method*  
SAF score: *Steatosis-Activity-Fibrosis score*  
Se: Sensibilidad  
SIMV: Simvastatina  
SITA: Sitagliptina  
SM: Síndrome metabólico  
Sp: Especificidad  
TAMO: Tamoxifeno  
TG: Triglicéridos  
TMRM: *Tetramethylrhodamine methy ester*  
TRAM: Tramadol  
TRBP: *Tar RNA binding protein* (Proteínas de unión a RNA Tar)  
VALP: Ácido valproico  
VENL: Venlafaxina  
VPN: Valor predictivo negativo

VPP: Valor predictivo positivo

XPO5: Exportin 5

$\gamma$ -GT:  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa

## **LISTADO DE TABLAS:**

**Tabla 1.1:** Fármacos que inducen esteatosis hepática y los mecanismos de hepatotoxicidad propuestos (Pag 50)

**Tabla 1.2:** Fármacos que causan colestasis y los mecanismos de hepatotoxicidad propuestos (Pag 53)

**Tabla 2.1:** Valores basales e inducidos de la actividad enzimática del CYP450 para los HU del donante 10-03 (Pag 82)

**Tabla 2.2:** Protocolo específico para el cultivo de hepatocitos en sándwich de colágeno (Pag 84)

**Tabla 2.3:** Secuencias de los *primers* para las cuantificaciones de miRNAs por RT-qPCR (Pags 96 y 97)

**Tabla 2.4:** Secuencias (5' - 3') de los *primers* para las cuantificaciones de mRNAs por RT-qPCR (Pag 99)

**Tabla 2.5:** Volúmenes y concentraciones de los reactivos necesarios para la transfección (Pag 109)

**Tabla 3.1:** Posibles mRNA diana del miR-29a-3p (Pags 139 y 140)

**Tabla 3.2:** Sitios de unión del miR-29a-3p con los mRNA diana (Pag 143)

**Tabla 3.3:** Características basales de la cohorte de estudio EHGNA (Pags 146-148)

**Tabla 3.4:** Rendimiento de los predictores de EHNA evaluados por el análisis de curvas ROC según el SAF *score* (Pag 160)

**Tabla 3.5:** Rendimiento de los predictores de EHNA evaluados por el análisis de curvas ROC según el NAS *score* (Pags 162 y 163)

**Tabla 3.6:** Rendimiento de los predictores de EHNA evaluados por el análisis de curvas ROC según el grado de Fibrosis (Pag 165)

**Tabla 3.7:** Evaluación mediante la validación cruzada (LOO-CV) del rendimiento predictivo de los modelos PLS-DA basados en marcadores clínicos convencionales y/o miRNAs para predecir SAF  $A \geq 2$ , NAS  $\geq 5$  o Fibrosis  $> 2$  (Pag 168)

**Tabla 3.8:** miRNAs diferencialmente expresados en el suero de los pacientes con EHNA (n=4) vs pacientes con HGNA (n=4) analizados por secuenciación de miRNAs (Pags 170 y 171)

**Tabla 3.9:** miRNAs alterados por los fármacos colestáticos en HU analizados mediante RNAseq (Pags 179-181)

**Tabla 3.10:** Fármacos específicos de las cohortes de estudio y validación de DILI (Pags 187y 188)

**Tabla 3.11:** Características basales de la cohorte de estudio DILI (Pags 189 y 190)

**Tabla 3.12:** Características basales de la cohorte de validación DILI (Pags 191 y 192)

**Tabla 4.1:** Genes diana relacionados con el metabolismo lipídico de algunos miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica (Pag 211)

## **LISTADO DE FIGURAS:**

**Figura 1.1:** Anatomía del hígado: vista anterior y posterior (Pag 31)

**Figura 1.2:** Representación del lobulillo hepático (Pag 33)

**Figura 1.3:** Funciones del hígado (Pag 35)

**Figura 1.4:** Transportadores hepatobiliares en el hepatocito (Pag 38)

**Figura 1.5:** Esquema de los principales mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de hepatotoxicidad (Pag 44)

**Figura 1.6:** Espectro de la EHGNA (Pag 47)

**Figura 1.7:** Teoría del “múltiple impacto” asociada a la patogénesis de la EHGNA (Pag 49)

**Figura 1.8:** Acciones dosis-dependiente de los AB (Pag 52)

**Figura 1.9:** Ratón de la cepa C57BL/6 para el estudio de la EHGNA (Pag 55)

**Figura 1.10:** Método RUCAM para el diagnóstico del DILI (Pag 59)

**Figura 1.11:** Criterios histopatológicos para el diagnóstico de EHGNA según el “*NAFLD activity score*” (Pag 63)

**Figura 1.12:** Criterios histopatológicos para el diagnóstico de EHGNA según el “*SAF score*” (Pag 64)

**Figura 1.13:** Biogénesis de los miRNAs: ruta canónica y no-canónica (Pag 68)

**Figura 2.1:** Células HepG2 tras 24 horas de cultivo (Pag 81)

**Figura 2.2:** Cultivos en sándwich de colágeno de HU 10-03 control (derecha) y tratadas con DMSO (izquierda) a cuatro días de la siembra (Pag 84)

**Figura 2.3:** Cultivos primarios de hepatocitos humanos tratados con DMSO (izquierda) y con VALP (derecha) durante 24h (Pag 85)

**Figura 2.4:** Esquema del proceso de purificación de RNA a partir de muestras celulares y suero humano (Pag 91)

**Figura 2.5:** Instrumento LightCycler 480 y detalle del *software* “LightCycler 480 SW 1.5” (Pag 95)

**Figura 2.6:** Esquema descriptivo del método de cuantificación de miRNAs por RT-qPCR (Pag 95)

**Figura 2.7:** Microarray GeneChip miRNA 3.0 de Affimetrix (Pag 100)

**Figura 2.8:** Bioanalizador 2100 (Agilent) y NextSeq 500 System (Illumina) (Pag 102)

**Figura 2.9:** Análisis de los productos de PCR en gel de agarosa al 2.5% (Pag 107)

**Figura 3.1:** PCA no supervisado del perfil de expresión global de miRNAs separó las células tratadas con CYCA de las células control (Pag 116)

**Figura 3.2:** El análisis de agrupamiento heatmap de los patrones de expresión de 35 miRNAs revela que los fármacos esteatósicos tienen una huella común (Pag 119)

**Figura 3.3:** Análisis de agrupamiento jerárquico de los diferentes tratamientos/condiciones basados en una selección de 10 miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica (Pag 121)

**Figura 3.4:** Nivel de expresión de miRNAs seleccionados en células tratadas con fármacos esteatósicos y no esteatósicos (Pags 122-124)

**Figura 3.5:** Nivel de expresión de algunos miRNAs en cultivos primarios de hepatocitos humanos tratados con fármacos esteatósicos y no esteatósicos (Pag 125)

**Figura 3.6:** Liberación de miRNAs biomarcadores al medio de cultivo por las HepG2 (Pag 127)

**Figura 3.7:** Curvas de citotoxicidad de algunos fármacos para SM en células HepG2 mediante el ensayo MTT (Pag 129)

**Figura 3.8:** Algunos fármacos comunes prescritos en pacientes con EHGNA y SM inducen los mismos miRNAs que los fármacos esteatósicos modelo (Pag 130)

**Figura 3.9:** Los miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica son inducidos por combinaciones de fármacos comúnmente prescritos en pacientes con EHGNA y SM (Pag 132)

**Figura 3.10:** Algunos fármacos comunes en pacientes con EHGNA y SM inducen la acumulación de lípidos en cultivos de células hepáticas humanas (Pags 134 y 135)

**Figura 3.11:** Acumulación principalmente de TG por parte de los fármacos del SM en células hepáticas humanas en cultivo (Pag 136)

**Figura 3.12:** Represión dosis-dependiente de mRNAs diana mediada por un RNAi *mimic* del miR-29a-3p (Pag 141)

**Figura 3.13:** Expresión de miRNAs asociados a EHGNA en sueros humanos (Pag 150)

**Figura 3.14:** Expresión de miRNAs asociados a EHGNA en hígados humanos (Pag 152)

**Figura 3.15:** miRNAs séricos alterados significativamente en pacientes de EHGNA con un SAF *score* elevado (Pags 153 y 154)

**Figura 3.16:** miRNAs séricos alterados significativamente en pacientes de EHGNA con un NAS *score* elevado (Pags 155 y 156)

**Figura 3.17:** Cambios en los miRNAs séricos de acuerdo con el estadio de fibrosis en pacientes con EHGNA (Pag 157)

**Figura 3.18:** Análisis de la curva ROC de los predictores de EHGNA grave en base al sistema SAF *score* (Pag 161)

**Figura 3.19:** Análisis de la curva ROC de los predictores de EHGNA grave en base al sistema NAS *score* (Pags 163 y 164)

**Figura 3.20:** Análisis de la curva ROC de los predictores de EHGNA grave en base al estadio de fibrosis (Pags 165 y 166)

**Figura 3.21:** Efecto de los fármacos colestásicos y no colestásicos en el nivel de expresión de los transportadores hepatobiliares (Pag 174)

**Figura 3.22:** Comparación entre cultivo de hepatocitos en sándwich de colágeno y en monocapa de colágeno (*coating*) (Pags 176 y 177)

**Figura 3.23:** Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de los niveles de expresión de los miRNAs en los hepatocitos humanos (Pag 178)

**Figura 3.24:** Nivel de expresión de los transportadores de AB en hepatocitos humanos expuestos a fármacos colestáticos y no colestáticos (Pag 183)

**Figura 3.25:** Nivel de expresión de miRNAs en hepatocitos humanos expuestos a fármacos colestáticos y no colestáticos (Pags 184-186)

**Figura 3.26:** Niveles séricos de ALT y FA en pacientes con DILI en el momento del ingreso y remisión (Pag 193)

**Figura 3.27:** Expresión de miRNAs alterados en suero y hepatocitos humanos (Pag 195)

**Figura 3.28:** miRNAs preferentemente alterados en el suero de pacientes con DILI hepatocelular (Pags 196 y 197)

**Figura 3.29:** miRNAs preferentemente alterados en el suero de pacientes con DILI colestático/mixto (Pag 198)

**Figura 3.30:** Evolución temporal de los miRNAs en suero de un paciente de DILI colestático y su relación con el perfil de FA (Pag 200)

**Figura 3.31:** Evolución temporal de los miRNAs en suero de un paciente seleccionado de DILI hepatocelular y su relación con el perfil de ALT (Pag 201)

**Figura 3.32:** Análisis de curvas ROC de nuevos biomarcadores de miRNAs para la clasificación del DILI (Pag 203)

**Figura 3.33:** Análisis de biomarcadores de miRNAs para la clasificación del DILI en una cohorte de validación (Pag 205)

**Figura 4.1:** miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica (Pag 213)

**Figura 4.2:** miRNAs biomarcadores de gravedad en el hígado graso no-alcohólico (Pag 218)

**Figura 4.3:** miRNAs biomarcadores para el diagnóstico y clasificación del DILI (Pags 226 y 227)

**Figura 4.4:** Esquema integrativo de los miRNAs biomarcadores identificados en ensayos *in vitro* (Pag 232)

**Figura 4.5:** Esquema integrativo de los miRNAs biomarcadores identificados en el suero de pacientes de las distintas cohortes de estudio (Pag 234)

## **ANEXO I:**

**Tabla 1:** Componentes y concentraciones de la mezcla de ácidos biliares empleada en los tratamientos celulares *in vitro* (Pag 265)

**Tabla 2:** Concentraciones terapéuticas y subcitotóxicas de los fármacos y compuestos utilizados en los distintos ensayos *in vitro* (Pags 266 y 267)

**Tabla 3:** miRNAs con una expresión alterada en células HepG2 tratadas con CYCA. Affymetrix GeneChip® miRNA 3.0 Arrays (Pags 268-270)

**Tabla 4:** Resumen de los estudios clínicos que evalúan miRNAs en suero como biomarcadores predictivos de EHGNA (Pags 272-274)

**Tabla 5:** Correlaciones entre los miRNAs séricos y las variables clínicas (Pag 275)

**Figura 1:** Algunos fármacos de SM no alteran la expresión de los miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica (Pag 271)

**Figura 2:** Citotoxicidad de algunas combinaciones de fármacos de SM en células HepG2 (Pag 271)

**Figura 3:** Modelos PLS-DA multivariados para la discriminación de pacientes con SAF  $A \geq 2$  (AC), NAS  $\geq 5$  (D-F) o  $F > 2$  (G - I) y evaluación del modelo mediante validación cruzada sin interrupciones (LOO-CV) (Pags 276-285)

## **ANEXO II:**

Publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral

**Lopez-Riera M**, Conde I, Tolosa L, Zaragoza A, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, et al. New microRNA Biomarkers for Drug-Induced Steatosis and Their Potential to Predict the Contribution of Drugs to Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in pharmacology*. 2017; 8:3.

**Lopez-Riera M**, Conde I, Quintas G, Pedrola L, Zaragoza A, Perez-Rojas J, et al. Non-invasive prediction of NAFLD severity: a comprehensive, independent validation of previously postulated serum microRNA biomarkers. *Scientific reports*. 2018;8 (1):10606.

**Lopez-Riera M**, Conde I, Castell JV, Jover R. A novel microRNA signature for cholestatic drugs in human hepatocytes and its translation into novel circulating biomarkers for drug-induced liver injury patients. *Toxicological Sciences*. 2019; pii: kfz138

Donato MT, **Lopez-Riera M**, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Jover R. Both cholestatic and steatotic drugs trigger extensive alterations in the mRNA level of biliary transporters in rat hepatocytes: Application to develop new predictive biomarkers for early drug development. *Toxicology letters*. 2016; 263:58-67.

Petrov PD, Fernandez-Murga ML, **Lopez-Riera M**, Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Jover R. Predicting drug-induced cholestasis: preclinical models. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2018;14(7):721-38.

Olcoz Goñi JL, Jorquera Plaza F. Fatty Liver Disease. A reality with many questions. 2018 EOLAS ediciones. 11<sup>st</sup> Chapter. **Lopez-Riera M**, Jover R: Transcription factors and microRNAs involved in liver lipid metabolism and their influence in non-alcoholic fatty liver disease.

## **RESUMEN**

La lesión hepática inducida por fármacos (DILI) es un problema de salud prioritario y la razón principal de la retirada del mercado de muchos medicamentos. Debido a su patogénesis multifactorial, el DILI puede presentar diversas manifestaciones. Una de ellas, la esteatosis, es la acumulación de triglicéridos en el hígado que, si se cronifica, da lugar a la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). Los fármacos pueden tener un papel etiológico directo o indirecto, aunque la EHGNA más prevalente es la asociada al síndrome metabólico. Otra manifestación del DILI, la colestasis, se define como la detención del flujo de bilis hacia el duodeno, con la acumulación de ácidos biliares en hepatocitos y torrente sanguíneo. El 42-52% de los pacientes con DILI cursan con colestasis. El diagnóstico actual del DILI se basa en parámetros bioquímicos tradicionales (alanino aminotransferasa, ALT; fosfatasa alcalina, FA...) poco específicos y sensibles. Además, la gravedad de la EHGNA sólo se puede estimar fiablemente en la biopsia hepática. Por ello, es necesaria la identificación y validación de nuevos biomarcadores no invasivos. Los miRNAs, por su papel esencial en multitud de procesos fisiológicos y patológicos y por su estabilidad en los fluidos biológicos, son considerados biomarcadores emergentes de numerosas enfermedades. Sin embargo, los estudios de miRNAs en DILI se han centrado en la hepatotoxicidad intrínseca por paracetamol, y sólo el miR-122 se acepta como biomarcador de diagnóstico y pronóstico en la EHGNA.

En la presente tesis, pretendemos profundizar en el estudio de los miRNAs como herramientas no invasivas y predictivas del DILI y sus distintas manifestaciones. Para ello, tratamos células hepáticas humanas

en cultivo con fármacos esteatósicos o colestásicos modelo, analizamos su miRNoma para identificar biofirmas singulares, y buscamos su reflejo en el suero de pacientes con EHGNA y DILI colestásico. Los resultados demuestran que, en hepatocitos en cultivo, los fármacos esteatósicos y colestásicos modelo producen alteraciones significativas en el perfil de miRNAs, que son trasladadas al medio de cultivo. Algunos fármacos comunes en pacientes con síndrome metabólico también inducen los miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica y podrían estar propiciando la EHGNA. Algunos de estos miRNAs, y otros postulados en trabajos previos, han podido ser validados como biomarcadores no invasivos para la predicción de la gravedad en la EHGNA (esteatohepatitis y fibrosis avanzada). Por otro lado, 4 miRNAs identificados *in vitro* se encontraron alterados en el suero de pacientes con DILI colestásico, y otros 4 fueron inducidos en pacientes con DILI hepatocelular. En general, estos nuevos biomarcadores no invasivos demostraron mejor rendimiento diagnóstico que los marcadores bioquímicos tradicionales, o permitieron mejorar algoritmos diagnósticos previos, pudiendo así ser postulados por primera vez como biomarcadores para el diagnóstico y clasificación de la hepatotoxicidad idiosincrásica.

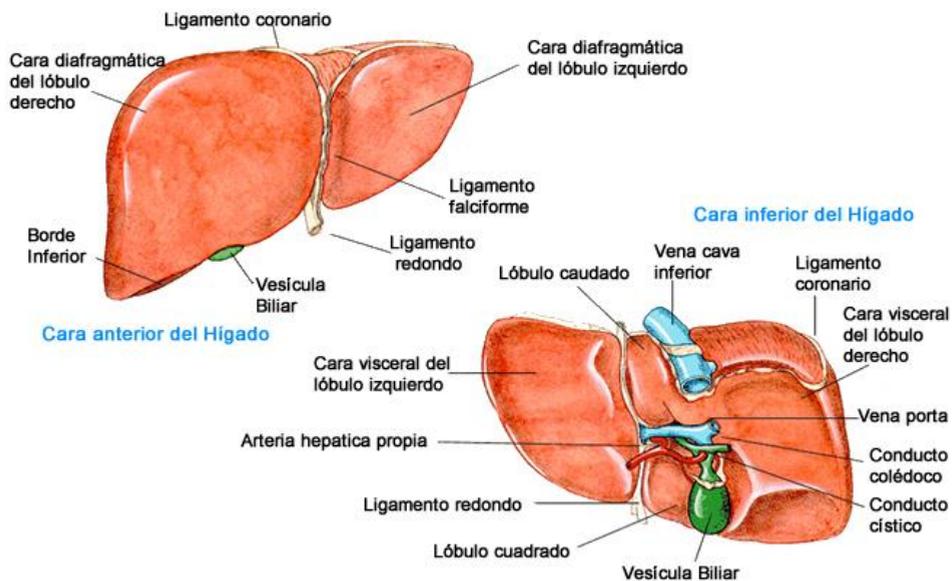
# **1-INTRODUCCIÓN**



## 1.1 El hígado

### 1.1.1 Anatomía hepática

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo, pesando en el adulto alrededor de 1,5kg. Se encuentra situado por debajo del diafragma y está dividido por el ligamento falciforme en dos lóbulos principales (un lóbulo derecho grande y un lóbulo izquierdo más pequeño), además de otros dos lóbulos (cuadrado y caudado) que también se sitúan en el lado izquierdo (Figura 1.1). La vesícula biliar (de unos 7-10cm de longitud), donde se almacena la bilis, se encuentra situada en el borde anteroinferior del hígado (1, 2).



**Figura 1.1: Anatomía del hígado: vista anterior y posterior.**

(Fuente: <https://amhigo.com/mi-higado/anatomia>)

La circulación hepática es dual, por un lado, el hígado recibe sangre principalmente a través de la vena porta. Esta sangre es rica en nutrientes, en fármacos, toxinas o microorganismos pues procede

## **1 Introducción**

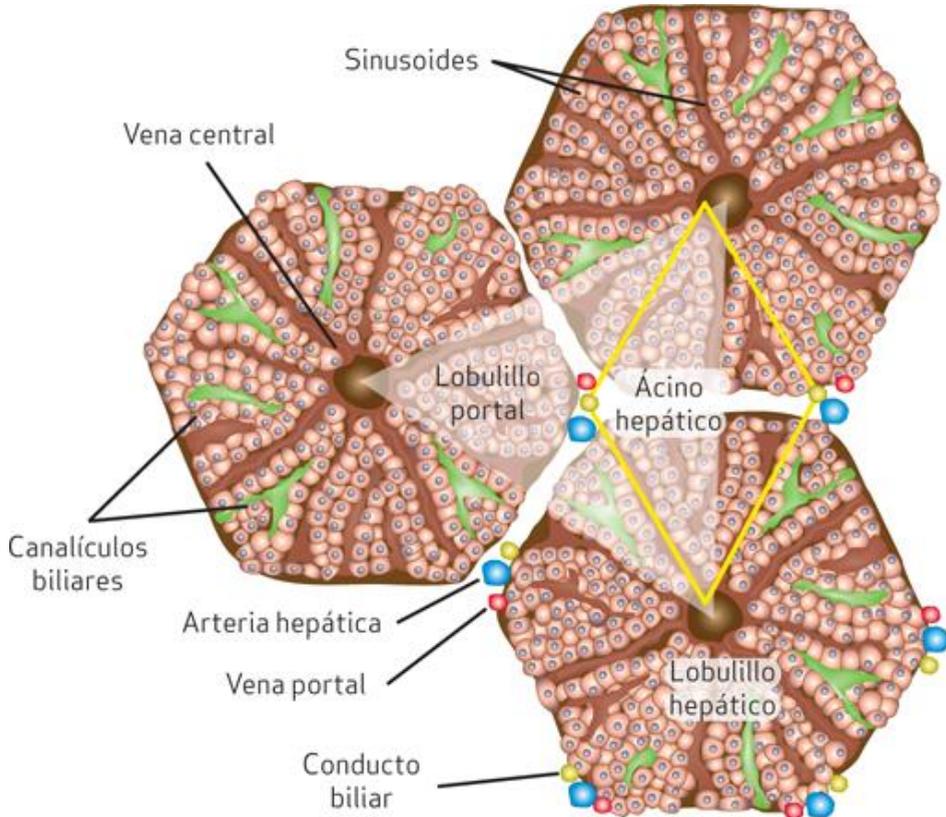
directamente de la absorción digestiva. A través de la arteria hepática, el hígado recibe la sangre oxigenada. Tanto la arteria hepática como la vena porta se ramifican hasta los sinusoides, donde los nutrientes y el resto de las sustancias son captados por los hepatocitos. Los productos que liberan los hepatocitos circulan a su vez por los sinusoides hasta la vena hepática (1, 2).

La unidad funcional del hígado es el lobulillo hepático (Figura 1.2). Un lobulillo presenta una estructura hexagonal constituida mayoritariamente por células epiteliales especializadas llamadas hepatocitos (constituyen alrededor del 80% de la población celular del hígado y son las que llevan a cabo la mayoría de las funciones hepáticas). Cada esquina del lobulillo está ocupada por una tríada portal, que incluye: arteria hepática, vía biliar y vena portal. En el centro de cada lóbulo hepático se encuentra la vena central. El área definida por este hexágono está ocupada por placas o cordones de hepatocitos que adoptan una distribución radial desde la vena central hacia el perímetro del lobulillo. Los cordones de hepatocitos están separados por los sinusoides hepáticos (los capilares del hígado, altamente permeables) y los canalículos biliares (3, 4).

El espacio perisinusoidal (o espacio de Disse) es el sitio de intercambio de materiales entre la sangre y los hepatocitos. En los sinusoides, encontramos a las células reticuloendoteliales de Kupffer que son los macrófagos con función inmunológica que fagocitan todo cuerpo extraño o microorganismo para evitar que lleguen al resto del organismo. Además, también se encargan de digerir hematíes viejos y metabolizar la

## 1 Introducción

hemoglobina (1, 5). Otras células no parenquimales del hígado son los colangiocitos (células epiteliales de los conductos biliares), las células endoteliales sinusoidales y las células estrelladas o células de Ito que se sitúan en el espacio de Disse.



**Figura 1.2: Representación del lobulillo hepático.** En la imagen también se muestran otras estructuras funcionales como son el acino hepático y el lobulillo portal (Fuente: Fortoul van der Goes, T. *Histología y biología celular*, 3ªe. [www.accessmedicina.com](http://www.accessmedicina.com))

### 1.1.2 Funciones del hígado

El hígado realiza numerosas funciones fisiológicas (Figura 1.3). En primer lugar, juega un papel fundamental en el metabolismo energético

## **1 Introducción**

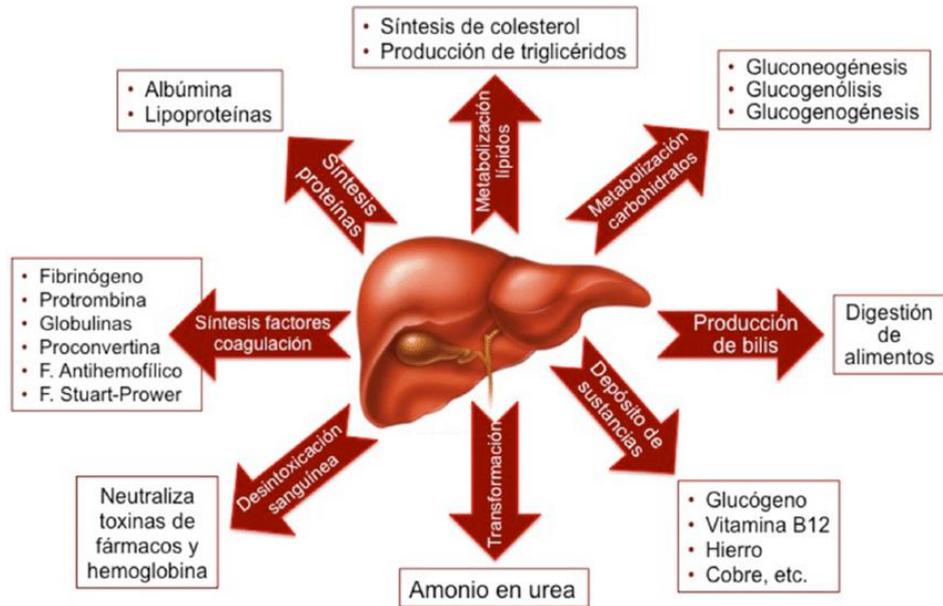
y en el mantenimiento de la glucemia durante el ayuno, realizando tanto la gluconeogénesis como la glucogenólisis (6-8). Tiene también un papel fundamental en el metabolismo lipídico pues puede hacer síntesis *de novo* de ácidos grasos (AG) y formar triglicéridos (TG), que pueden almacenarse dentro de los hepatocitos. También sintetiza colesterol (necesario para formar las sales biliares) y lipoproteínas, pero, además, los hepatocitos son capaces de realizar lipólisis, beta-oxidación de AG y síntesis de cuerpos cetónicos (9).

En cuanto al metabolismo proteico, los hepatocitos eliminan el grupo amino de los aminoácidos para que los esqueletos carbonados sean utilizados como fuente de ATP (adenosín trifosfato) o como precursores gluconeogénicos o cetogénicos (10). También transforma el amoníaco tóxico en urea y, además, los hepatocitos sintetizan la mayoría de las proteínas plasmáticas como la albumina y las alfa y beta globulinas (11). Por último, a excepción del factor VIII, todos los factores de la coagulación se producen exclusivamente en los hepatocitos. Su medición es la mejor medida aguda de la función sintética hepática, ya que sus vidas medias en suero son mucho más cortas que la de la albúmina.

Por otro lado, el hígado también tiene un papel fundamental como órgano metabólico y detoxificante de fármacos, hormonas y otras sustancias como el alcohol (12). Estas sustancias sufren un proceso de biotransformación hepática (reacciones de Fase I y II) que facilita posteriormente su excreción renal y biliar. Además, a través de la bilis, también elimina la bilirrubina.

## 1 Introducción

Finalmente, el hígado también es el encargado de almacenar no sólo glucógeno (y TG en determinadas circunstancias), sino, algunas vitaminas (A, B<sub>12</sub>, D, E y K) y minerales (hierro y cobre) (11). Y, además, participa en la síntesis de la forma activa de la vitamina D.



*Figura 1.3: Funciones del hígado. (Fuente: Manterola et al (13))*

### 1.1.3 Ácidos biliares, bilis y transportadores hepatobiliares

Los ácidos biliares (AB) son moléculas de carácter anfipático, solubles en agua y sintetizados a partir del colesterol en los hepatocitos. Su función principal como surfactantes permite la digestión y absorción de las grasas, vitaminas liposolubles y fármacos (14, 15). En condiciones fisiológicas suelen presentarse como sales de sodio y potasio de los AB (principalmente conjugados). El ácido cólico (*cholic acid*, CA) y el ácido quenodesoxicólico (*chenodeoxycholic acid*, CDCA) son los AB primarios.

## **1 Introducción**

La ruta mayoritaria de biosíntesis de los AB comienza con la enzima microsomal de la fase limitante CYP7A1 (colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa), que transforma el colesterol en 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol. A continuación, la enzima microsomal HSD3B7 (3 $\beta$ -hidroxi- $\Delta$ 5-C27-esteroide deshidrogenasa /isomerasa) lo transforma en 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (precursor del CDCA). La enzima CYP8B1 (esterol 12 $\alpha$ -hidroxilasa) hidroxila el compuesto anterior para dar lugar al precursor del CA, el 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholesten-3-one. Tras varias modificaciones enzimáticas más, el ácido carboxílico de la cadena terminal se conjuga con los aminoácidos glicina y taurina gracias a la enzima BAAT (aminoácido N-aciltransferasa), dando lugar a los AB primarios conjugados (16).

Finalmente, en el intestino delgado y en el colon, los AB primarios son desconjugados y transformados por acción de la microbiota (bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Lactobacillus* principalmente), en los AB secundarios: el ácido desoxicólico (*deoxycholic acid*, DCA) a partir del CA, y el ácido litocólico (*lithocholic acid*, LCA) a partir del CDCA. Los AB secundarios son más hidrofóbicos y citotóxicos, y son reabsorbidos y transportados de vuelta al hepatocito donde son conjugados de nuevo (17). En la circulación enterohepática, los AB se mantienen circulando entre el hígado, el sistema de conductos biliares, la vesícula biliar, el intestino y la vena porta, lo que permite el reciclado de los AB y la eliminación de moléculas de desecho como la bilirrubina (18, 19).

Los hepatocitos secretan diariamente entre 800 y 1000mL de bilis, un líquido de color pardoamarillento. Su composición principalmente es

## 1 Introducción

agua, sales biliares, colesterol, lecitina y bilirrubina y su pH oscila entre 7,6-8,6. Aunque es liberada desde los hepatocitos de forma continuada, se va almacenando en la vesícula biliar. Una vez secretada por los hepatocitos entra en los canalículos biliares para terminar en los conductos biliares (derecho e izquierdo), que se unen y forman el conducto hepático común, que finalmente forma el conducto colédoco, junto al conducto cístico de la vesícula biliar (1). Los hepatocitos son células polarizadas que poseen dos dominios de membrana: membrana canalicular y membrana sinusoidal (Figura 1.4) (20). En ambos lados se sitúan distintos transportadores hepatobiliares, que además de AB, también pueden transportar xenobióticos (21-23).

Los transportadores sinusoidales de entrada son: **NTCP** (*Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide*, que co-transporta AB conjugados junto con iones sodio desde la circulación portal al interior del hepatocito) y los **OATPs** (*Organic anion-transporting polypeptides*, que transportan AB conjugados y libres, bilirrubina y numerosos fármacos) (24-26).

En situaciones de acumulación excesiva de AB dentro del hepatocito, estos pueden ser devueltos a la circulación a través de los transportadores basolaterales de salida: **MRP4** (*Multidrug resistance protein 4*, que además de AB puede transportar numerosas moléculas endógenas y xenobióticos) (27), **MRP3** (*Multidrug resistance protein 3*, que transporta bilirrubina y AB conjugados) (28) y **OST $\alpha$ /OST $\beta$**  (*Organic solute transporter  $\alpha/\beta$* , que permite la salida de los AB desde el enterocito o el hepatocito a la circulación si el gradiente electroquímico es favorable) (29, 30).

## 1 Introducción

Finalmente, los transportadores canaliculares son: **BSEP** (*Bile salt export pump*, el encargado de secretar los AB conjugados al canalículo) (31, 32), **ABCG5/ABCG8** (*ATP-binding cassette sub-family G member 5/8*, que secretan colesterol principalmente) (33, 34), **MDR3** (*Multiple Drug Resistance 3*, que bombea fosfatidilcolina) (31), **BCRP** y **MDR1** (*Breast cancer resistance protein* y *Multidrug resistance protein 1*, encargados principalmente del transporte de xenobióticos) (35) y **MRP2** (*Multidrug resistance protein 2*, que exporta fármacos y aniones orgánicos, así como AB y bilirrubina) (28).

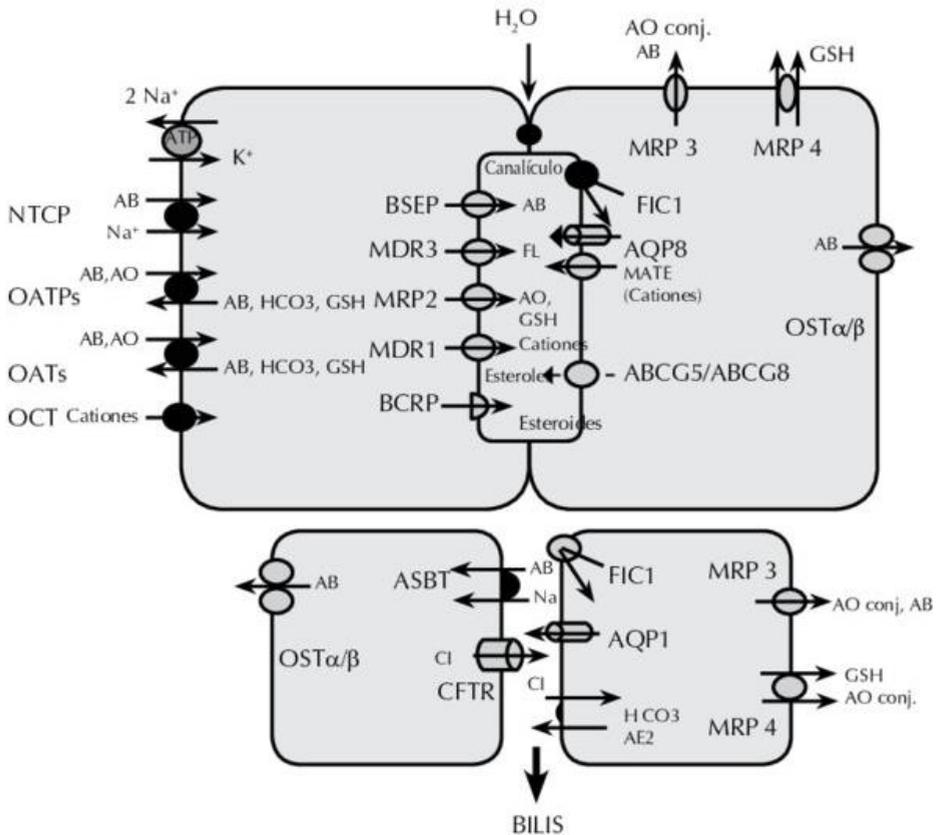


Figura 1.4: Transportadores hepatobiliares en el hepatocito. (Fuente: Arab et al (36)).

### **1.2 Hepatotoxicidad**

#### 1.2.1 Definición e incidencia

El hígado es un órgano sensible de sufrir numerosos daños de origen vírico, metabólico, inflamatorio, autoinmune y, cada vez más importantes y estudiados, daños por xenobióticos o toxicidad iatrogénica (37). La hepatotoxicidad (HTX) se define como la lesión o daño hepático que ha sido causada por la exposición a un fármaco o a un xenobiótico no farmacológico. Debido a su localización anatómica, a través de la vena porta, el hígado está expuesto directamente a todas las sustancias ingeridas, tanto nutrientes como fármacos y tóxicos (38, 39). Además, y siendo una de sus principales funciones, el hígado participa activamente como metabolizador y detoxificador de fármacos, pues los hepatocitos expresan las enzimas metabolizadoras (Fase I y II) y las proteínas transportadoras necesarias. Sin embargo, aunque el hígado evita que los xenobióticos lleguen sin modificar y a elevadas concentraciones al torrente circulatorio sistémico, su continua exposición a los mismos y a los posibles metabolitos reactivos derivados de su biotransformación hacen que este órgano sea especialmente propenso a la HTX (40, 41).

Aunque la HTX tiene baja incidencia dentro del grupo de reacciones adversas (4-10%), representa un problema de salud prioritario, dado su creciente incidencia (una sociedad polimedica y el uso cada vez más extendidos de productos no farmacológicos, como los de herboristería). Además, las lesiones hepáticas inducida por fármacos (*Drug-Induced Liver Injury*, DILI) pueden llegar a ser episodios clínicamente graves (5% de mortalidad) y causan aproximadamente el

## **1 Introducción**

50% de todos los fallos hepáticos agudos, el 10% de todos los casos de hepatitis aguda y el 5% de todas las admisiones hospitalarias (42, 43). Además, se calcula que el DILI se desarrolla en 1 de cada 100 pacientes durante la hospitalización (42, 44, 45). Por otra parte, el DILI es de gran interés para la industria farmacéutica ya que es la razón principal de la retirada del mercado y suspensión de comercialización de muchos medicamentos (46, 47). Algunos ejemplos son la troglitazona (antidiabético, retirado en el año 2000), nefazodona (antidepresivo, retirado en el año 2003), tetrabamato (compuesto utilizado en el tratamiento de la desintoxicación alcohólica, retirado en 2002) y lumiracoxib (antiinflamatorio no esteroideo (AINE), retirado en 2007). Actualmente, los medicamentos comercializados con mayor potencial hepatotóxico son la isoniazida, la clorpromacina y la tacrina (48, 49). Sin embargo, la mayoría de los casos que se diagnostican de HTX se deben a fármacos con un menor potencial tóxico, pero con un mayor número de prescripciones, como es el caso del antibiótico amoxicilina-clavulánico en España (49-51).

La incidencia real de la HTX es desconocida ya que la mayoría de los datos que se conocen son proporcionados por centros de farmacovigilancia o empresas farmacéuticas de modo retrospectivo. Estos estudios están orientados a determinar los fármacos hepatotóxicos más frecuentes, así como las características clínicas de la HTX. Además, también estiman la prevalencia de la HTX de un fármaco al comparar el número de informes reportados de DILI y los casos publicados con el fármaco como agente causal en una población en concreto (52, 53). Un estudio retrospectivo en Reino Unido mostró una incidencia del DILI de

## **1 Introducción**

2,4 casos por cada 100.000 habitantes (54). Pero estudios más recientes de carácter prospectivo revelan una incidencia mucho mayor. El seguimiento durante tres años de un área de Francia de menos de 100.000 habitantes mostró una incidencia de 14 casos por 100.000 habitantes (55) o el estudio poblacional que se realizó recientemente en Islandia y cuya incidencia de DILI resultó ser de 19/100.000 habitantes (56). Además, otra causa de la falta de datos actualizados es la infranotificación de nuevos casos de HTX por parte del personal sanitario, que puede deberse a la falta de marcadores específicos, lo que dificulta muchísimo un diagnóstico certero.

### **1.2.2 Clasificación de la hepatotoxicidad y factores de riesgo**

La HTX puede ser de dos tipos: intrínseca e idiosincrásica (37). La primera hace referencia a una HTX dosis-dependiente, predecible, reproducible y cuyos mecanismos de toxicidad están bien caracterizados. A este tipo de HTX pertenece la intoxicación por paracetamol (57). Sin embargo, la HTX idiosincrásica (que a su vez se divide en idiosincrasia metabólica o inmunoalérgica) aparece de forma impredecible en individuos susceptibles, no está relacionada con la dosis del compuesto y no puede ser reproducida en animales de experimentación (58). Además, el daño hepático también puede clasificarse en agudo o crónico (59). En el primer caso, las alteraciones hepáticas perduran un máximo de tres meses, mientras que en una HTX crónica las manifestaciones clínicas persisten mucho más tiempo. La lesión hepática aguda es la más común y prevalente (representa casi el 90% de los casos).

## 1 Introducción

En relación con la HTX idiosincrásica, existen una serie de factores de riesgo que pueden condicionar la susceptibilidad de cada individuo (37, 48, 52, 60):

- Factores genéticos: la predisposición genética como son los polimorfismos de los enzimas encargados de la metabolización y transporte de los fármacos es, sin duda, un factor de riesgo importante.
- Edad: a mayor edad parece ser más probable padecer HTX, debido a una menor capacidad metabolizadora y excretora, así como el uso concomitante de varios fármacos. Sin embargo, la incidencia de HTX por ácido valproico o por aspirina es más elevada en niños (61).
- Sexo: generalmente se atribuye mayor riesgo al sexo femenino, sin embargo, estudios recientes no demuestran diferencias significativas entre ambos sexos.
- Factores metabólicos y hormonales: la obesidad, la desnutrición, el embarazo o el hipo/hipertiroidismo... pueden incrementar el riesgo de HTX. Por ejemplo, en pacientes obesos en tratamiento con metotrexato aumenta la probabilidad de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (62, 63).
- Fármacos: las interacciones entre diferentes compuestos aumentan la predisposición a la HTX por inducción o inhibición competitiva de las enzimas del citocromo P-450 (CYP450).

## 1 Introducción

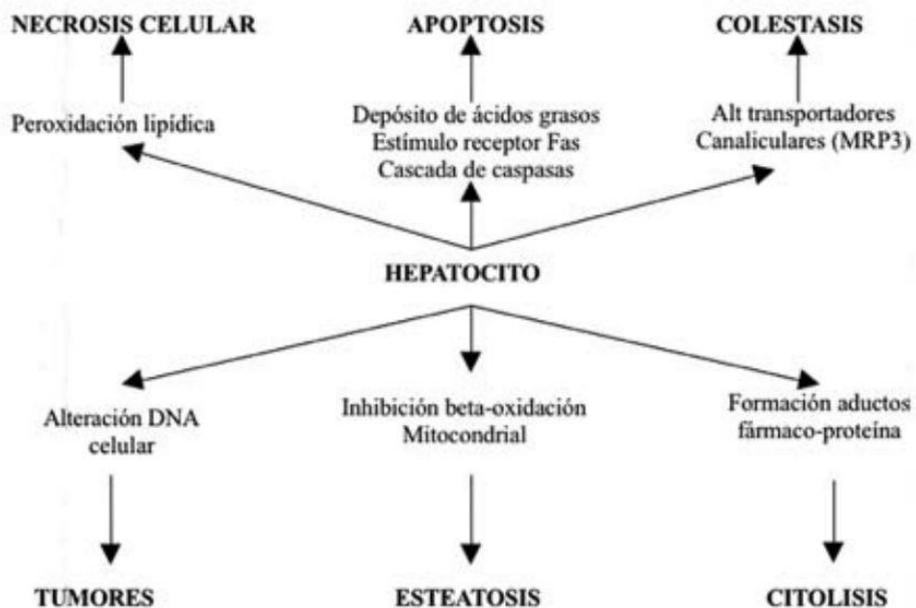
- Alcohol: el consumo de alcohol crónico potencia el efecto hepatotóxico de algunos medicamentos como consecuencia de la inducción del CYP2E1 y la depleción de las reservas intracelulares de glutatión.
- Enfermedades concomitantes: pacientes con VIH son más susceptibles al efecto de las sulfonamidas o pacientes con artritis reumatoide a la toxicidad por ácido acetilsalicílico (64). Sin embargo, una patología hepática de base no parece ser un factor de riesgo de HTX, pero siempre que se dé el episodio, éste será más grave pues la función hepática ya está disminuida.
- Dosis: algunos fármacos producen HTX dosis-dependiente (HTX intrínseca), y, por tanto, se puede reducir la dosis del tratamiento sin tener que suprimirlo por completo. Algunos ejemplos son el paracetamol, amiodarona o ciclosporina (65).

### 1.2.3 Mecanismos de hepatotoxicidad

El metabolismo hepático de los fármacos se divide en dos fases: las reacciones de Fase I, que consisten en reacciones de oxidación-reducción o hidrólisis llevadas a cabo principalmente por el CYP450, encaminadas a aumentar la hidrosolubilidad de los compuestos, y las reacciones de Fase II o de conjugación del fármaco con un compuesto endógeno para facilitar su eliminación (12). Todavía se desconocen los mecanismos celulares implicados en la HTX idiosincrásica, sin embargo, la aparición de metabolitos reactivos más tóxicos que el compuesto original a consecuencia de las reacciones de biotransformación hepática parece ser una hipótesis posible (53). La variabilidad genética del

## 1 Introducción

complejo del CYP450 es posiblemente el factor de riesgo más importante de HTX (66). Los metabolitos y radicales libres generados se concentran en el interior de la célula uniéndose a proteínas, ácidos nucleicos o lípidos, e induciendo peroxidación lipídica (67). Como resultado de los distintos mecanismos patogénicos implicados en el proceso, la HTX puede manifestarse con diferentes alteraciones celulares y cuadros clínicos (Figura 1.5).



*Figura 1.5: Esquema de los principales mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de hepatotoxicidad. (Fuente: Tejada, 2010 (37)).*

**Necrosis/Apoptosis:** la HTX conlleva a la muerte del hepatocito que puede ser apoptótica o necrótica, dependiendo de las rutas de señalización que se activen. La toxicidad y el estrés de los orgánulos intracelulares (retículo endoplasmático y mitocondria) pueden activar la vía intrínseca de la apoptosis, que involucra a caspasas y fragmentación de la cromatina,

## **1 Introducción**

o producir una necrosis con ruptura de la membrana plasmática y activación de respuestas inflamatorias. A este tipo pertenece la intoxicación por paracetamol (68, 69).

**Colestasis:** los fármacos afectan negativamente al flujo biliar al ser inhibidos los transportadores específicos de los componentes de la bilis, bien de modo directo, bien indirectamente al alterar su expresión. Esto provoca la acumulación de bilirrubina, que produce ictericia, y la de los propios AB, que son tóxicos a concentraciones elevadas. Es causada, entre otros, por los anabolizantes esteroideos y la amoxicilina-clavulánico (48, 51).

**Esteatosis:** cuando se alteran procesos mitocondriales como la  $\beta$ -oxidación de los AG y se produce una acumulación principalmente de TG que conlleva a hepatoesteatosis. La amiodarona, la tetraciclina o el metotrexato pueden causar esta acumulación de grasa hepática (40).

A continuación, se explican con más detalle las dos manifestaciones hepatotóxicas que se han estudiado en esta Tesis Doctoral.

### **1.3 Esteatosis hepática no alcohólica**

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) se define como la existencia de un hígado graso en individuos cuya ingesta diaria de alcohol no supere los 20g/día y en ausencia de daño hepático a causa de otras patologías como infecciones víricas, hepatitis autoinmunes, etc (70).

### **1.3.1 Epidemiología**

Aunque es difícil estimar la prevalencia real de la enfermedad debido a la ausencia de una sintomatología concreta y de biomarcadores específicos que faciliten su diagnóstico, se puede asegurar que su incidencia es cada vez mayor y que actualmente la EHGNA es reconocida como la enfermedad hepática más común en los países industrializados (71, 72).

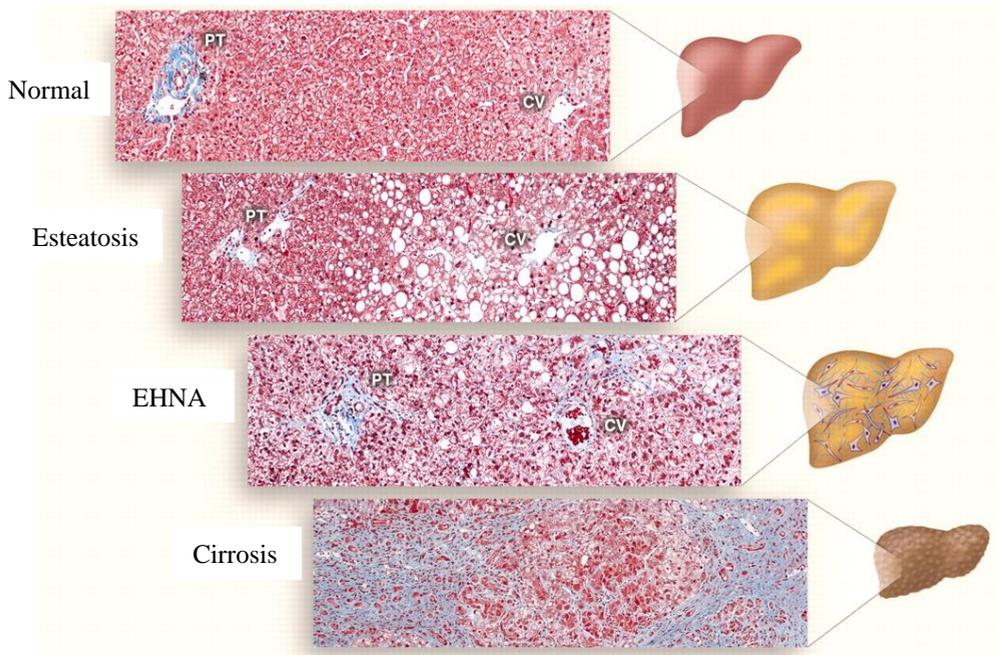
La prevalencia de la EHGNA se estima en valores cercanos al 30% en la población occidental (73). En España, se estima que el 26% de individuos de edades comprendidas entre los 15 y los 85 años están afectados por esta patología, siendo los individuos mayores de 45 años los más propensos a desarrollarla (74). Los factores de riesgo implicados en el desarrollo de la enfermedad son la edad, la obesidad y el síndrome metabólico (SM) (75). En los pacientes con SM la prevalencia de esteatosis aumenta hasta el 80-90% de los casos (76). Los pacientes con EHGNA a menudo presentan uno o más componentes propios del SM: resistencia a insulina, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), obesidad, dislipemias e hipertensión (77-79). Es por ello por lo que se ha sugerido que la EHGNA es la manifestación hepática del SM (80). Además, los pacientes de EHGNA presentan un riesgo elevado de mortalidad relacionada con enfermedades cardiovasculares (81).

### **1.3.2 Historia natural y progresión**

La EHGNA incluye un amplio espectro de lesiones hepáticas (Figura 1.6). La enfermedad se caracteriza por un depósito anormal de lípidos en el interior de los hepatocitos (principalmente TG). En este

## 1 Introducción

estadio hablamos de esteatosis simple. La esteatosis es una lesión reversible y con buen pronóstico. Sin embargo, un porcentaje de pacientes (30%) evolucionarán a la siguiente fase, y desarrollarán EHNA, que se caracteriza por una respuesta inflamatoria y fibrótica, de carácter irreversible y con mal pronóstico. A su vez, en un subgrupo de estos pacientes (20%) la lesión hepática evolucionará a cirrosis (82, 83). Finalmente, se estima que entre el 30-40% de los individuos con hígado cirrótico fallecerán de un fallo hepático por descompensación o por el desarrollo de un carcinoma hepatocelular (84). Aunque los factores de riesgo de progresión de la enfermedad no están claramente definidos, se ha establecido que la obesidad, la DM2 y un estadio inicial de fibrosis son factores determinantes para un peor pronóstico (85).



**Figura 1.6: Espectro de la EHGNA.** Se muestran la triada portal (PT: arteria hepática, vena portal y conducto biliar) y la vena central (CV) (Fuente: Cohen et al (71)).

### **1.3.3 Etiopatogenia**

La patogénesis de la EHGNA no se conoce con exactitud debido a que es una condición multifactorial, pero probablemente es el resultado de la interacción de factores ambientales (dieta, microbiota, patologías concomitantes, fármacos...) y de una predisposición genética (86-88). Aunque existen numerosas situaciones clínicas que se han relacionado con la aparición de la patología, sin duda la asociación más importante ocurre entre la EHGNA y el SM.

En 1998 Day y James propusieron una teoría patogénica para la EHGNA que se asociaba con la resistencia a la insulina y se explicaba como la teoría del “doble impacto” (89). La resistencia a la insulina (primer impacto) desencadena una acumulación de lípidos en los hepatocitos, principalmente de TG, promoviendo la aparición de la esteatosis. El segundo impacto deriva del estrés oxidativo en los hepatocitos y una liberación de citoquinas proinflamatorias que conducen a la progresión de la enfermedad a EHNA.

Actualmente, esta teoría ha sido reemplazada por la teoría del “múltiple impacto” (90). Según esta se producen numerosos impactos en paralelo (la resistencia a insulina, el estrés oxidativo, la microbiota, alteraciones del metabolismo lipídico e inflamación) lo que inicia el desarrollo de la enfermedad y contribuye a su progresión (Figura 1.7).

# 1 Introducción

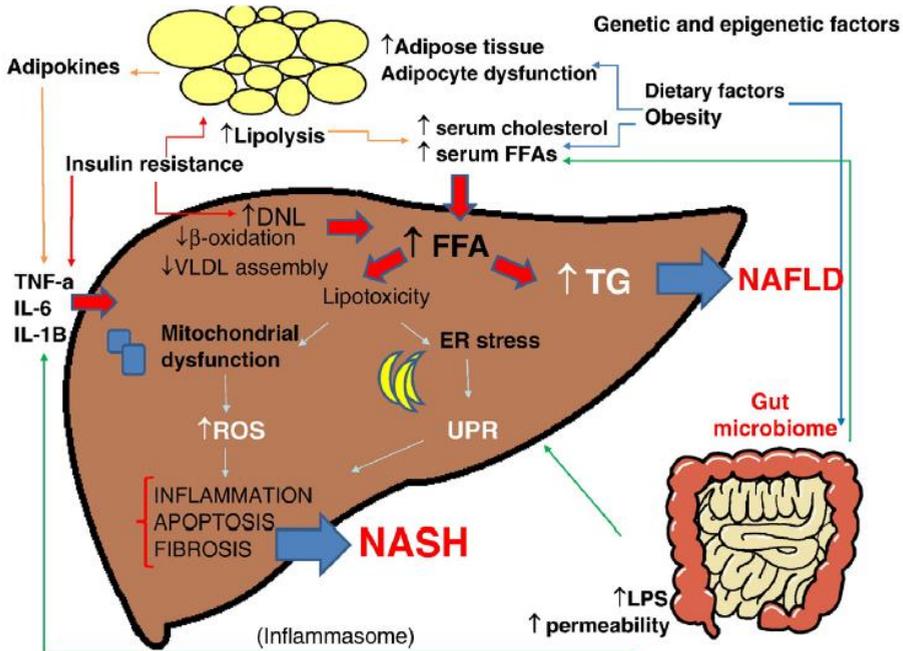


Figura 1.7: Teoría del "múltiple impacto" asociada a la patogénesis de la EHGNA. (Fuente: Buzzetti et al (90)).

## 1.3.4 Esteatosis hepática iatrogénica

A causa de su elevada prevalencia, la EHGNA más investigada es la asociada al SM, sin embargo, existe otra mucho menos estudiada y es la esteatosis causada por medicamentos o esteatosis iatrogénica.

La esteatosis hepática es una causa importante de fracaso en el desarrollo de nuevos medicamentos. Los estudios en fases pre-clínicas de la investigación no son suficientes para detectar el potencial esteatósico de un nuevo compuesto y actualmente, se estima que aproximadamente un 2% de los fármacos comercializados están directamente relacionados con el desarrollo de esteatosis (91, 92). Sin embargo, muchos otros

## 1 Introducción

medicamentos en presencia de otros factores de riesgo pueden promover o exacerbar la patología (93).

En la siguiente tabla (adaptada de (63)) se recogen algunos de los fármacos que han reportado casos de esteatosis hepática en humanos o en modelos experimentales.

**Tabla 1.1: Fármacos que inducen esteatosis hepática y los mecanismos de hepatotoxicidad propuestos.**

<b>Grupo farmacológico</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Mecanismo de toxicidad propuesto</b>
Antibiótico	Tetraciclina	Aumenta la síntesis de TG e inhibe la $\beta$ -oxidación mitocondrial
Antirretroviral	Estavudina	Inhibe la DNA polimerasa mitocondrial
Antiepiléptico	Ácido valproico	Disminuye la $\beta$ -oxidación e inhibe la CPT1A
Antiarrítmico	Amiodarona	Inhibe la $\beta$ -oxidación mitocondrial y la fosforilación oxidativa
Glucocorticoides	Dexametasona	Inhibe la secreción hepática de lípidos
Quimioterápicos	5-Fluorouracilo	Reduce la capacidad hepática de metabolizar lípidos
Medicinas alternativas	Aceite de marga	Desacopla la fosforilación oxidativa mitocondrial y disminuye el acetil-CoA libre
Artritis psoriática-reumatoide	Metotrexato	Inhibe la cadena de transporte de electrones mitocondrial
Moduladores del receptor de estrógenos	Tamoxifeno	Disminuye la secreción del TG, afecta a la $\beta$ -oxidación y deplecciona el DNA mitocondrial
AINE	Ácido acetilsalicílico	Secuestra el Co-A e inhibe la $\beta$ -oxidación

### 1.4 Colestasis iatrogénica

Otra forma de manifestación clínica del DILI es la colestasis. La colestasis se define como una reducción o el bloqueo en el flujo normal

## **1 Introducción**

de bilis con la consiguiente acumulación de AB en el hígado o en la circulación sistémica, a causa de una disfunción hepática o a la obstrucción del flujo a nivel del conducto biliar (94).

### **1.4.1 Epidemiología**

En estudios retrospectivos de DILI entre el 20-40% de pacientes presentaron un patrón colestásico, 12-20% un patrón mixto (colestásico/hepatocelular) y en un 48-58% de los casos se encontró un patrón hepatocelular. Pero si se considera juntos los patrones colestásico y mixto, la incidencia de DILI con afectación del flujo biliar representa entre el 40-60% del total de los casos (95). Además, en Estados Unidos, la prevalencia de colestasis iatrogénica alcanza un 20% de todos los casos que cursan con ictericia en la población anciana (96). Sin embargo, en muchas ocasiones la colestasis puede ser asintomática y no ser detectada.

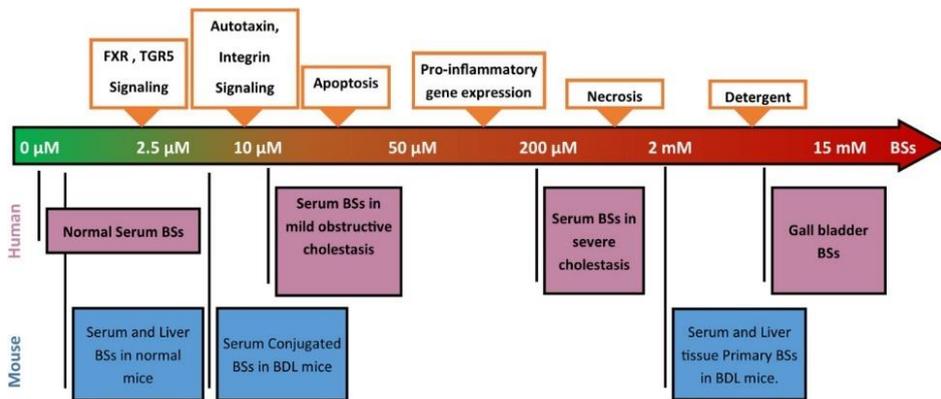
### **1.4.2 Etiopatogenia**

La acumulación excesiva de AB dentro del hepatocito puede desencadenar respuestas adversas como estrés oxidativo, apoptosis, inflamación e incluso, a concentraciones muy altas, necrosis por su efecto detergente (Figura 1.8). Sin embargo, también se pone en marcha una respuesta adaptativa que intenta disminuir el nivel de AB de los hepatocitos, que depende de receptores nucleares sensores de esta perturbación (97).

Los mecanismos patogénicos implicados en la aparición de colestasis inducida por fármacos todavía no están claros, sin embargo, una de las hipótesis más aceptadas es la alteración en la función o la expresión

## 1 Introducción

de los transportadores hepatobiliares (98). Algunos de los mecanismos postulados son la existencia de polimorfismos que predispongan al desarrollo de la patología, alteraciones transcripcionales o postranscripcionales por los fármacos que causen pérdida de función en los transportadores, y el efecto directo inhibitorio de los fármacos sobre la actividad de dichos transportadores (99, 100).



*Figura 1.8: Acciones dosis dependiente de los AB. (Fuente: Jensen et al (101)).*

Sin embargo, estos mecanismos no explican por sí solos todos los casos de colestasis iatrogénica. No todos los fármacos que demuestran *in vitro* capacidad directa de inhibición de los transportadores son capaces de reproducir la patología *in vivo*. Además, los polimorfismos de susceptibilidad son frecuentes en la población general y no pueden explicar la baja frecuencia de respuestas del DILI idiosincrático. Por lo tanto, la patogénesis de la colestasis iatrogénica es probablemente multifactorial y en ella están implicados varios mecanismos aún por descifrar (102).

## 1.4.3 Fármacos asociados a colestasis

Los grupos terapéuticos que más se asocian con la colestasis iatrogénica son los antibióticos (principalmente la amoxicilina-clavulánico), los antiinflamatorios (especialmente los AINEs), ciertos inmunomoduladores, los agentes psicótropos (antidepresivos y algunas benzodiazepinas), los esteroides anabolizantes y otros grupos como agentes cardiovasculares, antidiabéticos, anticonceptivos orales o quimioterápicos (102-104).

En la siguiente tabla (adaptada de (98, 102)) se recogen algunos de los fármacos que han reportado casos de colestasis iatrogénica en humanos:

**Tabla 1.2: Fármacos que causan colestasis y los mecanismos de hepatotoxicidad propuestos.**

<b>Grupo farmacológico</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Mecanismo de toxicidad propuesto</b>
Antibiótico	Amoxicilina-clavulánico	Inmunoalérgico
Esteroides e inhibidores de esteroides	Danazol Estradiol	Desprendimiento de microfilamentos en las membranas canaliculares biliares y déficit en la excreción de AB por la internalización de BSEP
Antihipertensivo	Bosentan	Inhibición competitiva de BSEP y trans-inhibición de MRP2
Agentes psicótropos	Clorpromacina	Los metabolitos interfieren en la secreción de los AB al desorganizar la fluidez de la membrana canalicular
Inmunosupresor	Ciclosporina	Inhibición competitiva de BSEP
Antibiótico + Antituberculoso	Rifampicina e isoniacida (co-tratamiento)	Acumulación de protoporfirina IX, una hepatotoxina endógena.
AINE	Ibuprofeno	Inmunoalérgico

### 1.5 Modelos para el estudio del DILI

#### 1.5.1 Modelos *in vivo*

Los modelos *in vivo* siguen siendo los escogidos para evaluar los efectos sistémicos de un fármaco en las fases pre-clínicas. Estos modelos también se utilizan para estudiar los mecanismos subyacentes a la toxicidad de un compuesto (105).

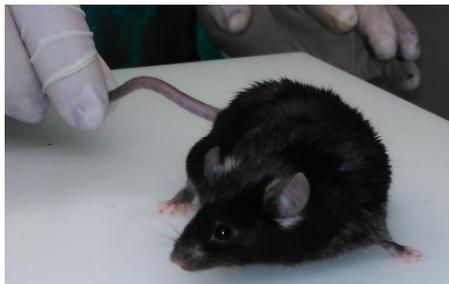
En cuanto a modelos *in vivo* para el estudio de la colestasis iatrogénica, hay que destacar que existen diferencias significativas entre especies en los perfiles y regulación de los AB, en la sensibilidad de los transportadores hepatobiliares a los fármacos, así como en el metabolismo de los propios fármacos (106). Por otra parte, los modelos animales son casi idénticos en términos genéticos y viven en un ambiente aislado y controlado, lo que dificulta la aparición de fenómenos idiosincráticos (59).

El modelo murino de colestasis inducida por  $\alpha$ -naftilisotiocianato (ANIT) es el más utilizado, pero se basa en un DILI intrínseco, por lo que no sirve para estudiar las bases del DILI idiosincrático (107). Además, aunque existen modelos murinos transgénicos en el metabolismo de los AB o de los transportadores (Bsep-KO, Mdr2-KO o CYP7A1), no han sido utilizados en estudios de HTX (106).

En cuanto a modelos *in vivo* para el estudio de la esteatosis iatrogénica, los ratones de la cepa C57BL/6 (Figura 1.9) y las ratas *Winstar* y *Sprague Dawley* son los más utilizados por su tendencia a desarrollar obesidad, diabetes y EHGNA según la dieta suministrada: deficiente en colina y metionina (MCD), fructosa, alta en calorías (*High-*

## 1 Introducción

*Fat*), etc. (108). Por último, también existen algunos modelos murinos transgénicos para el estudio de la EHNA, como son los ratones deficientes para el receptor de lipoproteínas de baja densidad (Ldlr  $-/-$ ) o para la apolipoproteína E (ApoE  $-/-$ ) en los que captación de colesterol está disminuida y las características propias de la enfermedad se potencian con dietas ricas en grasa, lo que permite el estudio de la contribución del colesterol dietético a la enfermedad. Además, existen dos modelos de ratones genéticamente definidos muy empleados: los ratones ob/ob (mutación en el gen de la leptina) y los db/db (mutación en el gen del receptor de la leptina). Como consecuencia estos ratones son hiperfágicos, obesos y desarrollan resistencia a la insulina e hiperlipidemia. Sin embargo, no progresan más allá de los estadios iniciales de la enfermedad a menos que se potencien los efectos mediante dieta o químicos (109, 110).



*Figura 1.9: Ratón de la cepa C57BL/6 para el estudio de la EHNA.*

### 1.5.2 Modelos *in vitro*

1) **Hepatocitos en cultivo primario:** Han de aislarse del tejido hepático y se consideran el *gold-standard* para los ensayos de toxicidad *in vitro* puesto que no han sufrido ninguna modificación genética y mantienen las funciones propias del hígado (111, 112). En un formato de cultivo en

## **1 Introducción**

sándwich de colágeno los hepatocitos están correctamente polarizados y transportan los AB de un modo vectorial, lo que permite estudiar el efecto de los fármacos en el balance entre la entrada-acumulación-excreción de los AB, así como en su regulación (102). Sin embargo, los hepatocitos primarios humanos no son fáciles de conseguir y su funcionalidad y viabilidad disminuyen en un corto periodo de tiempo. En busca de alternativas, ha surgido recientemente una nueva técnica de expansión de hepatocitos humanos con capacidad de proliferación limitada (Human Upcyte® Hepatocytes), que permite mantener muchas de las características propias del fenotipo de los hepatocitos adultos, como son la producción y excreción de AB y la actividad enzimática del complejo CYP450 (113-115).

2) **Líneas celulares de hepatoma**, inmortalizadas y provenientes de un solo donante. Entre las cuales destacan:

- **Línea celular HepG2**: es una de las más utilizadas en estudios de toxicidad. Proviene de un hepatocarcinoma de un varón de 15 años. Mantienen algunas funciones hepáticas como la síntesis de proteínas plasmáticas y el metabolismo y transporte de TG, colesterol y lipoproteínas (116). Sin embargo, en estudios de colestasis iatrogénica no han proporcionado resultados concluyentes (106). Pero en otros formatos de cultivo, como los esferoides en 3D, las células HepG2 mejoran el fenotipo celular y su capacidad de predecir la HTX (117).
- **Línea celular HepaRG**: son células derivadas de un tumor hepático de una mujer con hepatitis C (118). Es una línea muy empleada en estudios pre-clínicos que requieren periodos de

## **1 Introducción**

tratamiento prolongados (112). Sus niveles basales de transportadores de AB son más elevados que en las HepG2, lo que las convierte en mejores modelos para los estudios de DILI colestásico (119).

3) **Vesículas de membrana invertida que expresan BSEP:** son estructuras de tipo liposomal formadas por fragmentos de membrana celular invertida. Las aisladas de células de insecto S9 infectadas con baculovirus, se utilizan para estudios cinéticos y de variantes polimórficas de BSEP (102).

4) **Vesículas de membrana canalicular:** son vesículas aisladas del hígado que contienen los transportadores canaliculares de salida y que, al orientarse con una disposición de flujo invertido hacia adentro, permiten realizar ensayos de captación de fármacos y AB. Pero es técnicamente complejo obtener vesículas de calidad óptima, lo que dificulta su utilidad como modelo *in vitro* de rutina en ensayos de toxicidad (102).

5) **Células madre pluripotentes inducidas (IPSCs):** son fuentes emergentes de hepatocitos ilimitados con elevado potencial para estudios de toxicidad. Las IPSCs son reprogramadas a partir de células somáticas mediante factores de transcripción y diferenciadas en numerosos tipos celulares (112). Mediante esta técnica se pueden aislar células propias de un paciente y diferenciarlas al tipo celular afectado para poder investigar mejor los mecanismos de la patología (120).

6) **Co-cultivos en 3D:** en estos cultivos tridimensionales, las células se cultivan con *scaffolds* que imitan la matriz extracelular (112). En este tipo de cultivos, las células mantienen una expresión mayor de los genes

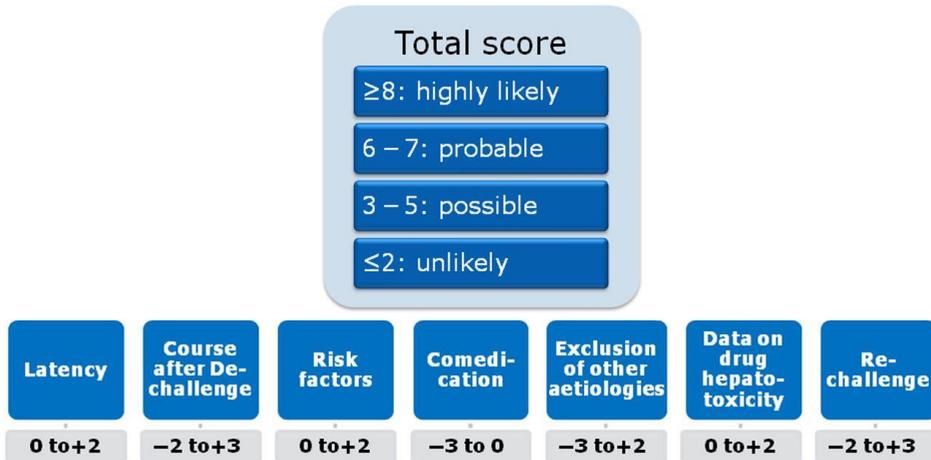
## **1 Introducción**

metabolizadores y transportadores de fármacos y AB, además de conservar mejor la polaridad celular y la comunicación intercelular (121, 122).

### **1.6 Diagnóstico actual del DILI y nuevos biomarcadores**

El diagnóstico del DILI requiere en primer lugar la exclusión de otras causas alternativas. Para ello, es necesaria la evaluación exhaustiva de las características clínicas y bioquímicas del paciente por parte del facultativo (123).

El primer objetivo del personal clínico es asegurarse de que se trata de una reacción adversa hepatotóxica e identificar el fármaco causal, con la finalidad de poder prevenir la progresión a cronicidad y evitar las recurrencias. Para ello, el facultativo debe tener en cuenta: 1) la cronología entre exposición y aparición de los efectos adversos, 2) el curso de la patología tras la retirada del medicamento, 3) los factores de riesgo individuales, 4) la comedicación, 5) la exclusión de otras causas etiológicas, 6) los posibles signos y síntomas, aunque sean inespecíficos, así como los criterios positivos en pruebas serológicas tradicionales y 7) la respuesta positiva tras la reexposición al fármaco. La valoración de estos criterios, siguiendo una escala de puntuación, que se conoce como el método RUCAM (“*Roussel-Uclaf Causality Assessment Method*”) (124, 125), permite determinar la probabilidad de causalidad del DILI (Figura 1.10).



*Figura 1.10: Método RUCAM para el diagnóstico del DILI. (Fuente: Kullak-Ublick et al (126)).*

Sin embargo, este método presenta una serie de limitaciones. Por ejemplo, requiere entrenamiento y una buena interpretación del caso clínico por parte del especialista, y en el cálculo del *score* no se define con precisión el consumo de alcohol. Además, el método RUCAM es adecuado para fármacos con un perfil de causalidad clásico, pero no se adapta bien a todos los fármacos.

### 1.6.1 Biomarcadores clásicos para el diagnóstico y clasificación del DILI

Actualmente, los parámetros bioquímicos séricos tradicionales tienen un peso importante en el diagnóstico del DILI. Hablamos de DILI si al menos en la analítica se observa una de las siguientes alteraciones hepáticas: 1) elevación de la alanina aminotransferasa (ALT) cinco veces su límite superior de normalidad (LSN), 2) aumento de la concentración sérica de la fosfatasa alcalina (FA) dos veces por encima de su LSN, 3) aumento de la bilirrubina total dos veces por encima de su LSN, junto con un aumento de la ALT tres veces por encima de su LSN (127). Esta tercera

## **1 Introducción**

manifestación bioquímica del DILI, que fue descrita por Hyman Zimmerman, sirvió para postular la ley pronóstica de Hy, que señala que el aumento de 3 veces de la ALT (como marcadores de lesión) y de 2 veces de la bilirrubina total (como marcador de la función) se asocia a un 10% de desarrollo de insuficiencia hepática con resultado de muerte o trasplante, cuando otras causas son excluidas (128).

Los mismos marcadores bioquímicos que tienen un peso importante en el diagnóstico del DILI sirven también para su clasificación en tres fenotipos distintos, que fueron definidos en el “*International Consensus Meeting*” en 1989 (129). La clasificación se realiza según el valor R, que se define como la relación  $[(ALT/LSN) / (FA/LSN)]$ . Los pacientes se clasifican en patrón hepatocelular si la  $R \geq 5$ , colestásicos cuando el valor de  $R \leq 2$ , o patrón mixto cuando el valor de R está comprendido entre 2 y 5 (60).

La correcta clasificación del paciente es importante porque cada fenotipo de DILI difiere en el periodo de latencia, la gravedad, duración y pronóstico de la enfermedad, así como los tratamientos considerados en cada caso. Pero en la actualidad el diagnóstico se basa en estas dos enzimas séricas (ALT y FA) cuya actividad puede verse interferida por otros tejidos y su alteración es muy frecuente en otras patologías, tanto hepáticas como extrahepáticas. Además, tampoco aportan información sobre la gravedad de la patología (130).

Otros biomarcadores séricos de DILI asociados al fenotipo colestásico son 1) la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa ( $\gamma$ -GT); 2) la 5'-nucleotidasa (5'-NT) y 3) la bilirrubina conjugada. Pero tampoco ninguno

## **1 Introducción**

de estos marcadores es específico y pueden verse alterados en otras condiciones, como patología óseas o intestinales u otras enfermedades hepáticas como cirrosis o EHGNA (102).

En la actualidad, el diagnóstico y clasificación del DILI no contempla la esteatosis iatrogénica. Ni siquiera los marcadores bioquímicos tradicionales tienen aquí mucha utilidad porque hasta un 80% de estos pacientes presentan una función hepática normal o casi normal. La elevación de transaminasas no suele ser significativa y la bilirrubina y la albúmina suelen permanecer normales (85). Algunos marcadores más recientes, aún en estudio, son: la proteína C reactiva (PCR), la pentraxina plasmática 3 (PTX3), el factor de necrosis tumoral Alpha (TNF- $\alpha$ ) y la citoqueratina 18 (Ck18) (131). Por todo ello, el diagnóstico de la EHGNA, tanto por medicamentos como por causas metabólicas, se basa principalmente en pruebas de imagen y en métodos más invasivos como la biopsia hepática.

### **1.6.2 Diagnóstico de EHGNA mediante pruebas de imagen**

La evaluación inicial de un paciente sospechoso de esteatosis se realiza mediante la combinación de técnicas no invasivas de imagen junto a parámetros serológicos o índices de fibrosis utilizados comúnmente en la clínica (132, 133).

La ecografía abdominal es la técnica de imagen más empleada para diagnosticar la EHGNA, ya que es un método no invasivo con un coste ajustado que permite una detección de la esteatosis aceptable (sensibilidad entre el 60-94% y especificidad próxima al 90%), aunque no informa del pronóstico de la enfermedad, especialmente cuando la fibrosis está

## **1 Introducción**

avanzada o hay EHNA (85). Se puede incrementar la precisión y la sensibilidad diagnóstica mediante la tomografía axial computerizada o la resonancia magnética nuclear, pero su elevado coste dificulta su utilización rutinaria (134).

Por último, para evaluar el estadio de fibrosis se utiliza la elastografía transitoria (FibroScan®), un método no invasivo que evalúa la fibrosis avanzada y la cirrosis. Aunque es poco fiable en pacientes obesos (IMC>28), en presencia de ascitis o si los espacios intercostales son estrechos (132). Como alternativa, se utiliza la Fuerza de radiación acústica de impulsos (ARFI) o elastosonografía que puede integrarse en una ecografía convencional (135).

### **1.6.3 Diagnóstico de EHGNA mediante biopsia hepática**

Actualmente, la biopsia hepática es la única forma de evaluar, sin margen de error, la lesión hepática y el pronóstico de un paciente con EHGNA, ya que las pruebas alternativas no ofrecen una valoración correcta de la inflamación, la balonización y/o la necrosis del hepatocito, así como del grado de fibrosis (131, 136). No es un método de cribado para la EHGNA y sólo debe realizarse en pacientes con un diagnóstico previo altamente probable basado en técnicas no invasivas (biomarcadores circulantes y pruebas de imagen). La biopsia hepática también se recomienda como último paso en el diagnóstico diferencial de las hepatopatías, en proyectos de investigación y en ensayos clínicos (137, 138). Es una técnica invasiva que presenta una serie de limitaciones: la interpretación histológica es subjetiva, es una técnica costosa y no está

## 1 Introducción

exenta de riesgos para el paciente (dolor, riesgo de complicaciones, lesiones a otros órganos y en raros casos, la muerte del paciente) (139).

La biopsia establece el diagnóstico de EHGNA evaluando el grado de esteatosis, de inflamación lobular y de balonización de los hepatocitos, además del grado de fibrosis (85). Recientemente ha sido propuesto el criterio mínimo para el diagnóstico de EHNA: presencia de más del 5% de esteatosis macrovesicular, inflamación lobular y balonización con distribución predominantemente centrilobular (140). Actualmente se utilizan dos sistemas de puntuación histológica semicuantitativa.

El primero (Figura 1.11) fue propuesto por la *NASH Clinical Research Network* y califica las tres características histológicas requeridas para el diagnóstico. El rango del *NAFLD activity score* (NAS) va de 0 a 8 siendo un  $NAS \geq 5$  diagnóstico de EHNA (136, 141). Sin embargo, su uso se recomienda sólo en ensayos clínicos ya que pueden darse falsos negativos.

<b>Steatosis</b>	<b>S score</b>
<5%	0
5–33%	1
34–66%	2
>66%	3
<b>Lobular inflammation</b>	<b>L score</b>
None	0
<2 foci/200 x	1
2–4 foci/200 x	2
>4 foci/200 x	3
<b>Hepatocyte ballooning</b>	<b>B score</b>
None	0
Few ballooned cells	1
Many ballooned cells	2

NAS components: Grade = Total score: S+L+B. Range, 0–8.

**Figura 1.11: Criterios histopatológicos para el diagnóstico de EHGNA según el “NAFLD activity score”. (Fuente: Vizuete et al (142)).**

## 1 Introducción

Recientemente, Bedossa *et al.* (143) ha desarrollado de acuerdo con la *American Association for the Study of Liver Disease* un algoritmo diagnóstico que evalúa la esteatosis, la actividad y la fibrosis (*SAF score*, Figura 1.12) en pacientes con obesidad mórbida, siendo el grado de actividad la suma de la inflamación lobular y la balonización (ambas con una puntuación de al menos 1 para el diagnóstico de EHNA). Los pacientes con un grado de actividad  $\geq 2$  correlacionan con un diagnóstico positivo de EHNA (143).

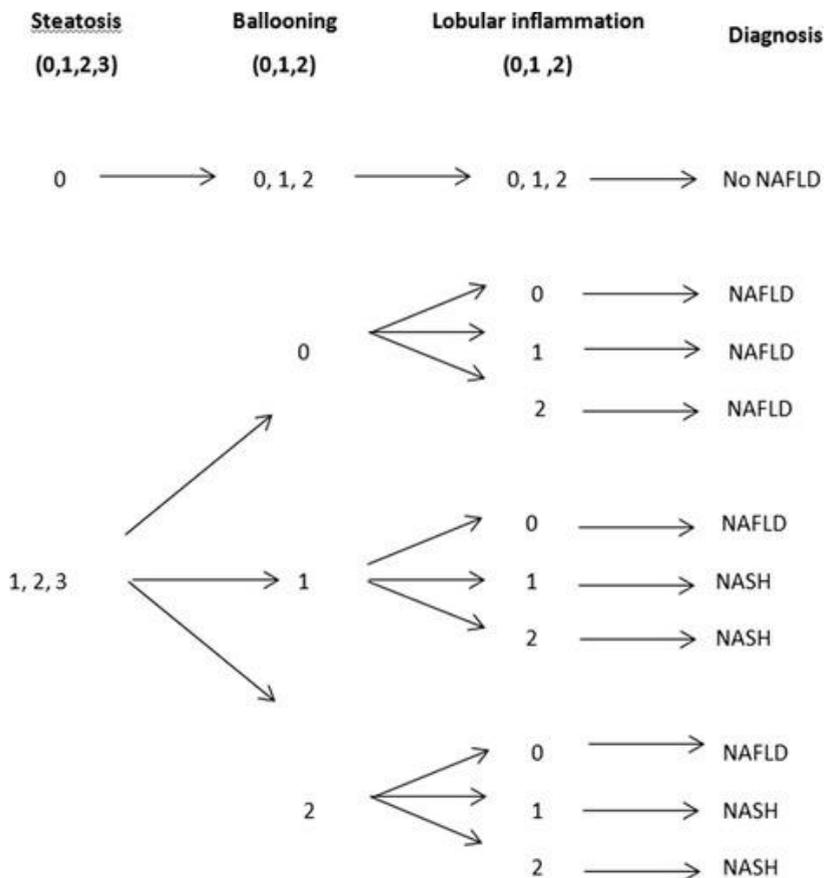


Figura 1.12: Criterios histopatológicos para el diagnóstico de EHNA según el "SAF score". (Fuente: Bedossa *et al* (143)).

## **1 Introducción**

Más recientemente, Bedossa consigue reducir la variabilidad interobservador del patólogo aplicando el SAF *score* junto al algoritmo FLIP (*fatty liver inhibition of progression*), que además puede ser aplicado en pacientes con características típicas del SM, pero sin presentar obesidad mórbida (144).

Por último, el estadio de fibrosis no se considera un requerimiento para el diagnóstico de EHGNA para la mayoría de los patólogos, sin embargo, el grado de fibrosis es el mejor predictor de la progresión, del fallo hepático y del carcinoma hepatocelular. Su puntuación se evalúa fuera de los algoritmos semicuantitativos y comprende valores de F0 (no hay fibrosis) hasta F4 (cirrosis) (143).

### **1.6.4 Nuevos biomarcadores**

Teniendo en cuenta las limitaciones de las técnicas diagnósticas descritas anteriormente, es necesario implementar y validar nuevos biomarcadores que apoyen y complementen en la clínica a las pruebas actuales empleadas en el diagnóstico y clasificación del DILI. Recientemente, se ha descubierto que los microRNAs (miRNAs) tienen un papel fundamental en la patogénesis de numerosas enfermedades, además su estabilidad en los fluidos biológicos ha hecho que sean considerados por muchos investigadores como biomarcadores emergentes no invasivos para el diagnóstico y el pronóstico de numerosas enfermedades incluido el DILI.

### 1.7 microRNAs

El primer miRNA, *lin-4*, fue descubierto en 1993 en *Caenorhabditis elegans* por los grupos de Ambros y Ruvkun (145). Desde entonces, las investigaciones sobre su biogénesis y regulación, así como sus funciones han progresado muchísimo. Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA monocatenario no codificantes, de una longitud promedio de 22 nucleótidos, cuya función es la regulación post-transcripcional de la expresión génica (146). En la actualidad se han registrado 2.675 miRNAs humanos maduros en la base de datos miRBase (actualización de marzo del 2018) (147), aunque solamente 519 de ellos cumplen con los criterios exigentes de los miRNA canónicos bien conservados evolutivamente (148).

#### 1.7.1 Biogénesis y función de los miRNAs

La biogénesis de los miRNAs se clasifica en ruta canónica y ruta no canónica (Figura 1.13).

La ruta canónica es la vía dominante de procesamiento de los miRNAs. En primer lugar, los genes con miRNAs canónicos se transcriben por la RNA polimerasa II (149) generando RNAs largos que se denominan pri-miRNAs, que presentan regiones complementarias plegadas en forma de horquilla. Posteriormente, en el núcleo, estos se procesan a pre-miRNAs (de unos 60-70 nucleótidos) mediante el complejo microprocesador, que contiene una molécula de la endonucleasa Drosha (con dos dominios RNasa III que escindirán el dúplex del pri-miRNA) y dos moléculas de su cofactor *DiGeorge Syndrome Critical Region 8* (DGCR8, que contienen dominios de unión a RNA) (150). Cada

## **1 Introducción**

horquilla del pri-miRNA incluye un bucle terminal y dos regiones complementarias de 33 pares de bases. Probablemente, DGCR8 se une a la región más próxima al bucle terminal y sitúa correctamente a Drosha (151). A continuación, Drosha escinde los últimos 11 pares de bases de la horquilla del pri-miRNA (152, 153) liberando el pre-miRNA. En el siguiente paso, los pre-miRNAs son exportados al citoplasma mediante un complejo Exportin 5 (XPO5) / RanGTP para ser procesados y madurados (154) por Dicer, que al igual que Drosha es una endonucleasa con dos dominios RNasa III, y que también se asocia a proteínas cofactoras, como las proteínas de unión a RNA Tar (TRBP) y el activador de proteínas PKR (PACT) (155). La endonucleasa elimina el bucle terminal del pre-miRNA, generando un dúplex de miRNA maduro (de unos 21-24 pares de bases) (150). Tras esto, Dicer y sus cofactores se disocian del dúplex de miRNA.

En cuanto a las rutas de biogénesis no canónicas de los miRNAs se agrupan en vías independientes de Drosha / DGCR8 e independientes de Dicer. Los pre-miRNAs producidos por la primera vía se exportan directamente al citoplasma, siendo los mirtrones un ejemplo bien conocido de esta ruta. Por otra parte, los independientes de Dicer son procesados por Drosha a partir de transcripciones endógenas que resultan en RNA de horquilla corta (shRNA) y requieren de una maduración posterior por parte de las proteínas Argonauta (AGO1-4) (147, 153).

# 1 Introducción

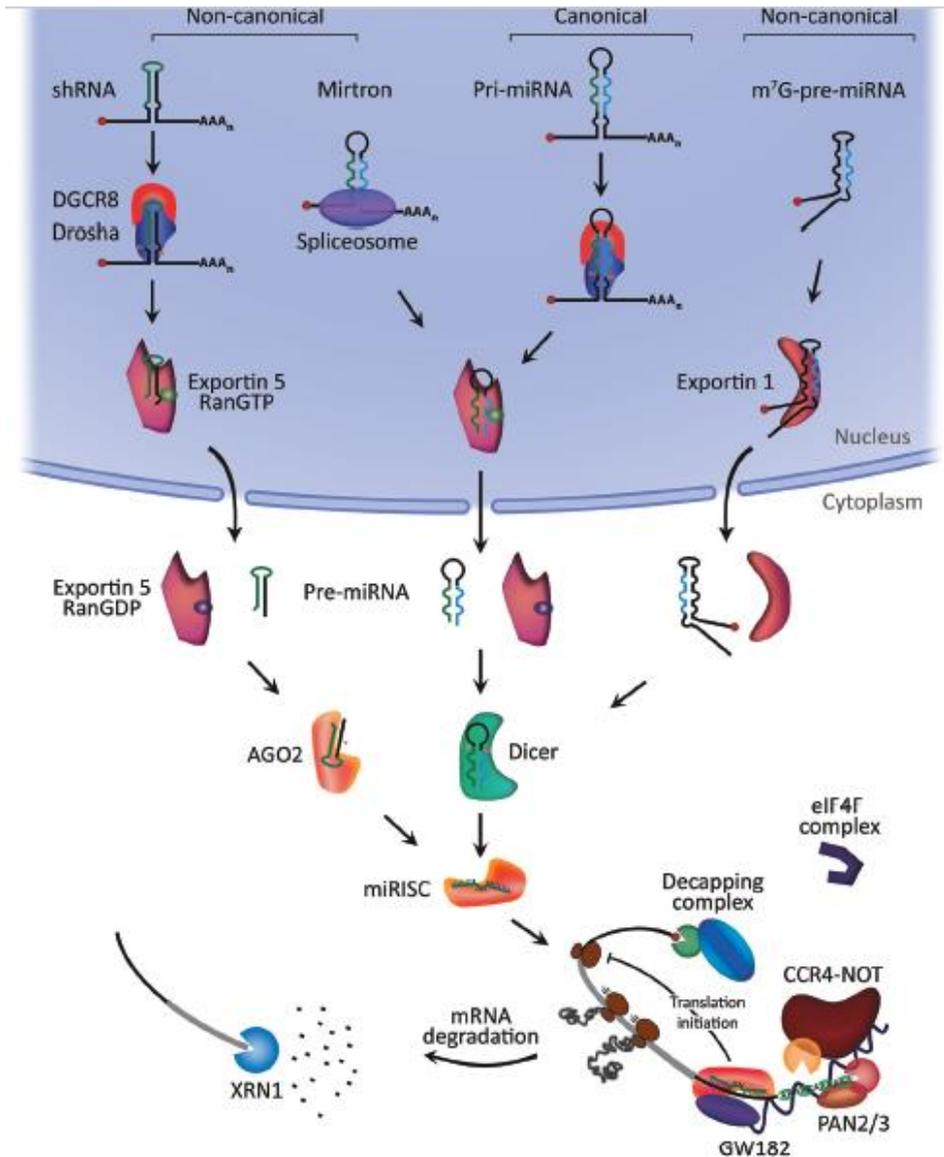


Figura 1.13: Biogénesis de los miRNAs: ruta canónica y no-canónica. (Fuente O'Brien et al (153)).

Por último, la biogénesis del miR-451, cuya expresión es muy abundante en los eritrocitos, sigue una ruta no canónica especial independiente de Dicer. Después de la escisión de Drosha, la horquilla

## **1 Introducción**

pre-miR-451 es muy corta y entra directamente a AGO2, que corta la parte 3' de la horquilla. Finalmente, el miRNA maduro se produce por la exonucleasa PARN (148).

Independientemente de si la biogénesis es canónica o no, el miRNA dúplex maduro se incorpora a una proteína AGO con la ayuda de proteínas chaperonas (HSC70 / HSP90), que usan ATP para ayudar a AGO a asumir una conformación abierta de alta energía adecuada para unirse al miRNA rígido. Tras la unión, la relajación de AGO a su conformación original promueve la expulsión de una de las dos cadenas del miRNA dúplex para formar así el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*) maduro (148, 156). La dirección de la hebra de la horquilla del pre-miRNA determina el nombre de la forma monocatenaria del miRNA, así la hebra 5p surge del extremo 5' mientras que la 3p se origina a partir del extremo 3'. Ambas cadenas pueden quedar unidas a las proteínas AGO, sin embargo, la hebra con una estabilidad termodinámica menor en el extremo 5' se quedará preferentemente y se considera la hebra guía. La otra hebra madura no seleccionada se llama hebra pasajera y será degradada y expulsada del complejo (157, 158).

El complejo RISC maduro interactúa con secuencias complementarias en el RNA mensajero (mRNA) diana, llamadas elementos de respuesta de miRNA (ERM). Generalmente, los miRNAs maduros interactúan con la región 3'UTR de sus mRNA diana, sin embargo, también pueden interactuar con la región 5'UTR y la secuencia codificante. La mayoría de las interacciones miRNA-ERM no son completamente complementarias, y se produce una interacción funcional mediante la región *seed* en 5' del miRNA (2-8 nucleótidos). El complejo

## **1 Introducción**

RISC recluta otras proteínas: GW182 (facilita el reclutamiento de otras proteínas), PAN2-PAN3 y CCR4-NOT (participan en la desestabilización del mRNA tras la interacción con el miRNA), DCP2 (eliminación de la estructura Cap del mRNA) y XRN1 (exoribonucleasa que degrada el mRNA) (150, 159, 160).

Aunque generalmente, los estudios se centran en su papel como inhibidores de la traducción, también existen datos, para casos específicos, que demuestran un papel inhibitorio de la transcripción y potenciador del silenciamiento epigenético, ya que también modulan la metilación del DNA y las modificaciones en las histonas. A su vez, los genes de los miRNAs pueden ser dianas de modificaciones epigenéticas (147). Por último, algún estudio sugiere incluso que los miRNAs pueden ser activadores directos de la expresión génica, pero en casos muy particulares (161).

### **1.7.2 Regulación en la producción de los miRNAs**

Para garantizar la correcta expresión del miRNA, el proceso de biogénesis es regulado a varios niveles: transcripcional, Drosha, Dicer y RISC (162).

A nivel transcripcional, la mayoría de las secuencias de miRNA son intragénicas y se transcriben a partir de intrones de RNA no codificante. El resto son intergénicos y están regulados por su propio promotor. En ocasiones se procesan como un transcripto largo con varias horquillas, en un *cluster*, cuyos miRNAs pueden tener una región *seed* similar por lo que se consideran una familia de miRNAs (163). A este

## **1 Introducción**

nivel transcripcional, la expresión de los miRNAs está regulada por factores de transcripción, como c-Myc o p53 (164, 165).

En cuanto al microprocesador, ambos componentes se auto-regulan entre sí. DGCR8 estabiliza a Drosha mediante interacciones proteína-proteína y Drosha escinde dos estructuras, horquilla y secuencia codificante del mRNA de DGCR8, en un bucle de retroalimentación negativa (146). Además, otras proteínas asociadas con el microprocesador, como las helicasas p68 y p72 y las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs), pueden ayudar a facilitar el procesamiento co-transcripcional (166).

El regulador mejor estudiado del procesamiento del pre-miRNA por Dicer es la proteína LIN28, que interactúa mediante una secuencia muy conservada con la región terminal de la familia de miRNAs Let-7 (167). Además, también interactúa con las uridilil transferasa terminales 4 y 7, en el citoplasma, que conducen a la inhibición del procesamiento y finalmente a la degradación del pre-miRNA (162).

El último nivel de regulación de la producción de los miRNAs se centra en la estabilidad del complejo RISC, las proteínas AGO y la degradación del propio miRNA. La sobreexpresión de las proteínas AGO conduce a un aumento global de los miRNAs maduros (166). En *C.elegans* se ha demostrado que las exonucleasas XRN-1 y XRN-2 degradan los miRNAs no unidos a la secuencia de mRNA diana (168). Aun se estudia si sus homólogos en humanos tienen la misma función.

En resumen, tanto el proceso de biogénesis de los miRNAs como su regulación han demostrado ser redes muy complejas que necesitan ser

estudiadas más en detalle para comprender el impacto que tienen los miRNAs en el desarrollo de enfermedades y como posibles dianas terapéuticas.

### **1.7.3 miRNAs como agentes o dianas terapéuticas**

Están involucrados en multitud de procesos biológicos (desarrollo y embriogénesis, la diferenciación celular, la organogénesis, el metabolismo y la apoptosis) y la alteración del patrón de su expresión se asocia con numerosas enfermedades (cáncer, enfermedades cardiovasculares, metabólicas, diabetes...). Debido a su relevancia biológica muchos miRNAs han sido considerados agentes o dianas terapéuticas para el tratamiento de algunas enfermedades (169). Por ejemplo, la inhibición dirigida de miR-122 en modelos animales conduce a una reducción en los niveles de colesterol y TG. También se ha observado la sobreexpresión de la familia del miR-29 en el hígado, riñón y páncreas de pacientes con diabetes. El miR-34a es un supresor tumoral y actualmente los miR-34a *mimics* (MRX34) están siendo probados en ensayos clínicos como terapia en hepatocarcinoma (170).

### **1.7.4 miRNAs circulantes como biomarcadores**

Numerosos estudios han demostrado que los miRNAs son liberados por las células a distintos fluidos biológicos (plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, saliva, orina, leche materna...) (171-173). Su liberación cambia en condiciones fisiopatológicas por lo que estos miRNAs extracelulares pueden ser utilizados como biomarcadores de estos procesos (174, 175). En los fluidos corporales, los miRNAs son protegidos de las nucleasas viajando en vesículas (exosomas,

## **1 Introducción**

microvesículas o cuerpos apoptóticos) o asociados a proteínas (especialmente AGO2, pero también lipoproteínas de alta densidad, HDL) (153, 176). Como consecuencia, son resistentes a la degradación mantenidos a temperatura ambiente durante cuatro días, e incluso en condiciones extremas de temperatura o pH.

Muchos de los estudios publicados hasta la fecha del potencial de los miRNAs como biomarcadores de DILI se centran en la HTX por sobredosis de paracetamol, ya que es la causa más común de DILI intrínseco en humanos (177, 178). Además, entre los estudios que analizan el potencial de los miRNAs como biomarcadores de EHGNA sólo el miR-122 está aceptado como biomarcador circulante para diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (174, 179, 180). Todavía queda mucho por conocer y explotar de los miRNAs como herramientas útiles, como biomarcadores o dianas terapéuticas.

Por último, estudios recientes han demostrado que los miRNAs circulantes pueden regular la actividad de las células que los incorporan, actuando como moléculas de señalización intercelular. Los mecanismos de entrada de los miRNAs a la célula receptora no se conocen con exactitud, pero varios estudios afirman que los que viajan dentro de vesículas son captados por endocitosis o fagocitosis, mientras que los que viajan asociados a proteínas son captados por receptores específicos en la membrana plasmática (147). Thomou y colaboradores (181) demuestran un ejemplo de este comportamiento en el miRNA circulante miR-99b, que es liberado en exosomas desde el tejido adiposo para regular la expresión génica en tejidos distantes como el hígado. Uno de los mRNA diana reprimidos por este miRNA en el hígado fue Fgf21 (factor de crecimiento

## **1 Introducción**

de fibroblastos 21) que es un importante regulador del metabolismo asociado con lipodistrofias.

### **1.8 Hipótesis del trabajo y objetivos**

Estudios previos y evidencias preliminares del grupo, demuestran que muchos fármacos tienen un efecto directo y significativo en el hepatocito alterando la expresión de numerosos factores de transcripción; por lo que anticipamos que el efecto transcriptómico global de estos fármacos será muy significativo e implicará tanto a genes codificantes de proteínas como a genes de miRNAs.

En base a estos antecedentes hipotetizamos que entre las alteraciones transcripcionales que generan los fármacos en las células hepáticas, existirá una huella identificativa y una respuesta celular asociada, que se traducirá en la producción y liberación de miRNAs circulantes que podrán ser utilizados como biomarcadores para identificar la HTX iatrogénica en pacientes. El tratamiento con fármacos cuyo mecanismo de acción sea distinto, generará diferentes huellas de miRNAs que nos permitan discriminar entre las distintas manifestaciones del DILI (esteatosis y colestasis). Pretendemos profundizar en las bases moleculares del DILI para poder identificar nuevas estrategias diagnósticas basadas en miRNAs circulantes que puedan ser aplicadas en la clínica.

Para ello, proponemos los siguientes OBJETIVOS:

- 1- Caracterizar el impacto de los fármacos hepatotóxicos modelo (esteatósicos y colestásicos) sobre el miRNoma de células HepG2 y hepatocitos humanos en cultivo, y sobre los miRNAs liberados al medio de cultivo.

## **1 Introducción**

- 2- Elucidar, mediante técnicas de análisis estadístico multivariante, una biofirma de esteatosis y colestasis iatrogénica *in vitro* discriminadora a nivel transcripcional (miRNAs).
- 3- Validar si los marcadores de esteatosis iatrogénica son también alterados por fármacos comunes prescritos a pacientes con SM y EHGNA (esteatosis metabólica) y determinar los medicamentos más esteatósicos.
- 4- Identificar los mRNA diana de los miRNAs biomarcadores alterados por los fármacos esteatósicos modelo e investigar los mecanismos reguladores y las rutas alteradas.
- 5- Analizar las biofirmas predictivas de hepatotoxicidad en el suero de pacientes de dos cohortes distintas: 1) sujetos de EHGNA y SM para la esteatosis iatrogénica y 2) sujetos de DILI para el estudio de la colestasis iatrogénica.
- 6- Reexaminar el valor predictivo de los miRNAs postulados como biomarcadores hasta la fecha y compararlo con el rendimiento de los biomarcadores séricos convencionales.
- 7- Postular, mediante algoritmos predictivos y análisis estadísticos multivariante, miRNAs biomarcadores séricos que permitan diagnosticar y clasificar a pacientes de DILI.

## **2- MATERIALES Y MÉTODOS**



### 2.1 Compuestos y fármacos

Los compuestos y los fármacos utilizados se adquirieron de Sigma (Madrid, España), Selleckchem (Madrid, España) y Merck (Barcelona, España). Los compuestos no esteatósicos empleados como controles (citrato (CITR), amitriptilina (AMIT) y ketotifeno (KETO)) y los fármacos esteatósicos modelo (valproato (VALP), doxiciclina (DOXY), ciclosporina (CYCA), amiodarona (AMIO) y tamoxifeno (TAMO)) se escogieron en base a datos bibliográficos previos del grupo (182-184). Además, las células fueron tratadas con oleato:palmitato (2:1, 0,6mM) como control de esteatosis metabólica por acumulación lipídica (TG principalmente). El resto de compuestos utilizados en el estudio de esteatosis son fármacos comúnmente prescritos a pacientes diagnosticados de SM, entre los que se escogieron 3 antihipertensivos (irbesartan (IRBE), hidroclorotiazida (HDCT) y amlodipino (AMLO)), 2 antidiabéticos orales (sitagliptina (SITA) y metformina (METF)), 3 hipolipemiantes (fenofibrato (FENO), simvastatina (SIMV) y atorvastatina (ATOR)), 1 inhibidor de la bomba de protones (omeprazol (OMEP)), 3 analgésicos (tramadol (TRAM), paracetamol (PARA) y ácido acetilsalicílico (ASPI)), 2 ansiolíticos (lorazepam (LORA) y diazepam (DIAZ)) y 2 antidepresivos (paroxetina (PARO) y venlafaxina (VENL)). Por último, para los tratamientos en el estudio de colestasis iatrogénica se incluyeron como controles dos compuestos no colestásicos (maprotilina (MAPR) y amikacina (AMIK)) y tres compuestos colestásicos modelo (clorpromazina (CHLO),  $\alpha$ -naftilisotiocianato (ANIT) y etinilestradiol (ETHY)), que fueron escogidos también en base a la bibliografía previa descrita por el grupo (185). También se incluyeron células expuestas a una

## **2 Materiales y Métodos**

mezcla de ácidos biliares (Cf: 150µM) preparada tal como específica la Tabla 1 del Anexo I, y que nos permitió discriminar entre los efectos causados por los fármacos colestásicos y aquellos consecuencia de la acumulación posterior de AB. Las concentraciones seleccionadas para los compuestos variaron entre 100 y 200 veces el pico máximo de concentración plasmática terapéutica (Cmax), que es un límite que actualmente se usa para la evaluación de la seguridad de los medicamentos en la industria farmacéutica y se considera un límite de dosificación aguda fisiológicamente relevante. Toda esta información se detalla en la Tabla 2 del Anexo I.

### **2.2 Cultivos celulares, incubación con compuestos y ensayos de citotoxicidad.**

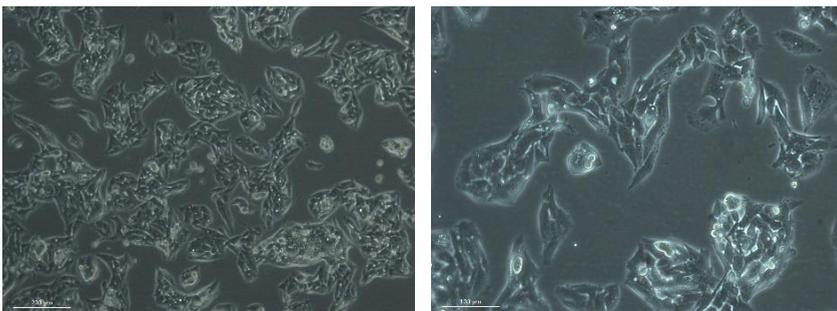
#### **2.2.1 Células HepG2**

Las células HepG2 son una línea celular inmortalizada que provienen de células de un carcinoma hepatocelular bien diferenciado de un varón caucásico de 15 años. Como podemos observar en las imágenes de contraste de fases (Figura 2.1) realizadas con el microscopio invertido Leica DMI400B (Leica Microsistemas, Barcelona, España), las HepG2 son células adherentes, de morfología epitelial que crecen en monocapa o en pequeños agregados. Además, son capaces de sintetizar y secretar muchas de las proteínas plasmáticas que produce el hígado como la transferrina, el fibrinógeno, el plasminógeno y la albúmina (116).

Las células HepG2 (ATCC HB-8065, Rockville, MD) se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub>-95% de aire, en frascos de cultivo con medio Ham F-12:Leibovitz L-15 (1:1, v/v) (Gibco BRL, Invitrogen, Barcelona, España) suplementado con L-

## 2 Materiales y Métodos

glutamina 2mM, glucosa 5mM, suero bovino fetal (SBF) al 7%, *Bovine serum albumin* (BSA 100mg/mL), bicarbonato 1M y 5µg/mL de plasmocin como antibiótico. El medio de cultivo se renovaba cada 2 días hasta que los cultivos alcanzaban aproximadamente el 80% de confluencia. El subcultivo de las células se realizó mediante tratamiento con tripsina 0,25%/EDTA 0,01% (Gibco BRL, Paisley, Escocia) en tampón fosfato salino pH 7,4 durante 2-4 minutos a 37°C. Se determinó la viabilidad celular de la suspensión obtenida mediante la prueba de exclusión con azul tripán (sólo los cultivos con una viabilidad superior al 90% fueron considerados aptos para los ensayos) y se calculó el número de células mediante conteo en una cámara de Neubauer. Para la mayoría de los ensayos de hepatotoxicidad *in vitro*, las células HepG2 se sembraron en placas individuales de 3.5 cm de diámetro a razón de 200.000 células/cm<sup>2</sup>. Al día siguiente los cultivos fueron expuestos a los distintos tratamientos seleccionados durante 24 horas, tras las cuales se retiró el medio de cultivo por aspiración y las placas se lavaron con tampón fosfato salino frío (PBS), se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta que fueron procesadas.



**Figura 2.1:** Células HepG2 tras 24 horas de cultivo. Detalle del crecimiento en pequeños agregados (izquierda) y de su morfología epitelial (derecha).

## 2 Materiales y Métodos

### 2.2.2 Hepatocitos humanos Upcyte®

Los hepatocitos Upcyte (HU) son células primarias humanas que han sido modificadas genéticamente mediante una tecnología de transferencia viral. Para la obtención de los HU, los hepatocitos primarios son transfectados con dosis bajas de los oncogenes E6 y E7 del papilomavirus humano, lo que induce los niveles del receptor de citoquinas gp130 y permite una proliferación limitada en presencia de oncostatina M, pero sin inducir la inmortalización o el crecimiento celular descontrolado (186). Estas células poseen la ventaja de mantener la mayoría de las características fenotípicas de los hepatocitos primarios. La expresión y función específica de los hepatocitos Upcyte es evaluada en cada estadio de crecimiento, siendo positivas para los marcadores hepáticos:  $\alpha$ -1-antitripsina (AAT), citoqueratina-18 (Ck18), albúmina sérica humana (HSA) y glucógeno (113).

En la siguiente tabla se detallan las características específicas de los HU que se emplearon en los ensayos (donante 10-03), en cuanto a la actividad enzimática basal y la respuesta a la inducción de cuatro isoenzimas del CYP450 implicadas en el metabolismo de xenobióticos (datos proporcionados por la empresa Upcyte Technologies GmbH).

**Tabla 2.1: Valores basales e inducidos de la actividad enzimática del CYP450 para los HU del donante 10-03.**

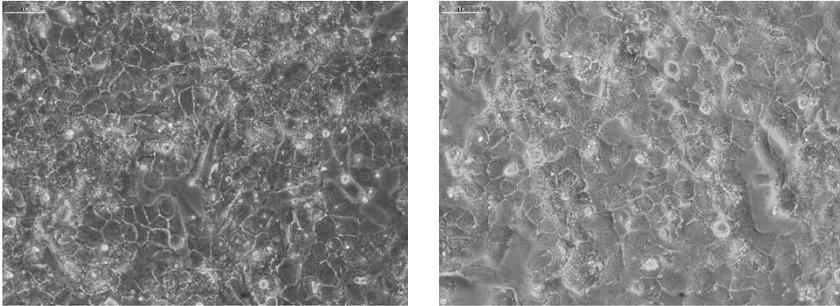
<b>CYP450</b>	<b>Método</b>	<b>Actividad basal (pmol/min/mg)</b>	<b>Inductor</b>	<b>Respuesta a la inducción (<i>fold</i>)</b>
<b>CYP1A2</b>	HPLC	3.3	Omeprazol	7.3
<b>CYP2B6</b>	HPLC	40.3	Fenobarbitona	5.1
<b>CYP2C9</b>	HPLC	91.8	Rifampicina	2.8
<b>CYP3A4</b>	HPLC	21.4	Rifampicina	8.2

## **2 Materiales y Métodos**

Los HU de segunda generación del donante 10-03 (mujer caucásica, 48 años) se descongelaron en medio William's E 1X (Gibco BRL) y se sembraron en medio de crecimiento libre de suero (*Hepatocyte Culture Medium*) suplementado con L-glutamina 2mM, 100U/mL de penicilina y 100µg/mL de estreptomicina, a una densidad de 5000 células/cm<sup>2</sup> en frascos T75 pre-cubiertos con colágeno tipo I (Corning, Nueva York, EE.UU). Se mantuvieron en medio de cultivo (donde proliferan) hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. El medio se reemplazó cada 2-3 días. Tanto los HU como los distintos medios de cultivo y los suplementos específicos se obtuvieron de Upcyte Technologies GmbH, (Hamburgo, Alemania). El subcultivo de las células se realizó mediante tratamiento con tripsina 0,25%/EDTA 0,01% y tras determinar la viabilidad celular y el conteo de la suspensión resultante (tal como se indica en el apartado 2.2.1), los hepatocitos se sembraron en placas de 12 pocillos pre-cubiertas con colágeno tipo I a una densidad de 280.000 células/pocillo en medio de crecimiento, éste se reemplazó a las 4-5h de la siembra por medio de diferenciación libre de suero (*Hepatocyte high-performance medium*), suplementado también con L-Glutamina, penicilina y estreptomicina a las mismas concentraciones ya descritas. Después de 24h las células se cubrieron con una segunda capa de solución de colágeno tipo I (Roche, Alemania) recién preparada, tal como se describe en la Tabla 2.2 (40µL/pocillo) (187). Cuatro días después del sándwich de colágeno (ver imágenes inferiores de contraste de fase tomadas con el microscopio invertido Leica, Figura 2.2) se incubaron las células con los compuestos seleccionados. Tras los tratamientos, las

## 2 Materiales y Métodos

placas se lavaron con PBS frío, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.



*Figura 2.2: Cultivos en sándwich de colágeno de HU 10-03 control (derecha) y tratadas con DMSO (izquierda) a cuatro días de la siembra. Detalle del crecimiento en monocapa y su morfología poligonal, semejante a un hepatocito humano.*

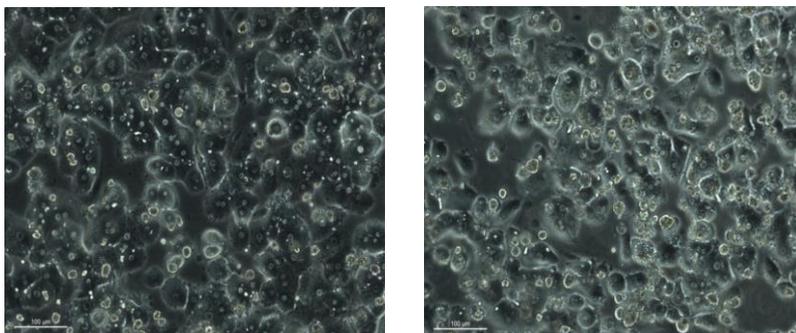
**Tabla 2.2: Protocolo específico para el cultivo de hepatocitos en sándwich de colágeno**

Para preparar <b>500<math>\mu\text{L}</math></b> de mezcla de colágeno (1,5 mg/mL) neutralizado:	
<b>400<math>\mu\text{L}</math></b>	Colágeno (Roche) a 1,87 mg/mL en ácido acético 0,1%
<b>50<math>\mu\text{L}</math></b>	Medio DMEM 10X (1000 mg/L Glucosa + Piruvato/ $\text{NaHCO}_3$ , Gibco BRL)
<b>50<math>\mu\text{L}</math></b>	Solución neutralizadora ( $\text{NaOH}$ 0,7N- $\text{NaHCO}_3$ 0,26N). Añadir gota a gota hasta pH 7,4. Muy importante controlar el pH para la viabilidad de los hepatocitos.
<u>Procedimiento:</u> Retirar el medio de cultivo de los pocillos con cuidado de no levantar la monocapa celular y repartir 40 $\mu\text{L}$ /pocillo de la solución (siempre trabajando en frío para evitar que gelifique el colágeno). Dejar gelificar en estufa a $37^{\circ}\text{C}$ durante 60-90 minutos. Retirar el sobrante y añadir medio de diferenciación ( <i>Hepatocyte High Performance medium</i> ) sobre el sándwich.	

## 2 Materiales y Métodos

### 2.2.3 Hepatocitos humanos y hepatocitos de rata

En ocasiones puntuales se recurrió a los cultivos primarios de hepatocitos humanos, a partir de biopsias hepáticas de donantes cadáver no aptos para trasplante, o de hepatocitos de rata, como modelos *gold-standard* para el estudio de la HTX *in vitro*. Sin embargo, la escasez para obtener tejido humano sano y la importante variabilidad interindividual limitan su uso y aplicabilidad. El aislamiento y cultivo de estas células están ampliamente detallados en trabajos previos del grupo (188, 189). En las siguientes imágenes (Figura 2.3) se puede apreciar la morfología de las células y el efecto de los tratamientos tras la incubación de 24 horas.



*Figura 2.3: Cultivos primarios de hepatocitos humanos tratados con DMSO (izquierda) y con VALP (derecha) durante 24h. Detalle de la monocapa celular de morfología poligonal y de los hepatocitos mono y binucleares.*

### 2.2.4 Incubaciones *in vitro* y ensayo de citotoxicidad

Dependiendo de su solubilidad, los compuestos se disolvieron en un solvente orgánico (dimetilsulfóxido (DMSO)), en agua o en solución salina tamponada, y se incorporaron a los cultivos celulares, diluidos en el propio medio de cultivo. La concentración final del DMSO nunca excedió 0,5% (v/v).

## **2 Materiales y Métodos**

La citotoxicidad de los compuestos en los distintos cultivos celulares se analizó mediante el ensayo MTT, que consiste en la reducción mitocondrial por parte de la enzima succinato deshidrogenasa de una sal de tetrazolio soluble y de color amarillo, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Sigma, Madrid), en un producto de color púrpura e insoluble en agua, el formazán. Los cultivos se sembraron a una densidad de 15.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Las células fueron expuestas a diluciones seriadas de los compuestos durante 24 horas. Posteriormente, se lavó los pocillos una vez con PBS atemperado y se añadió 100 µL/pocillo de reactivo MTT disuelto en medio de cultivo (0,5 mg/mL medio) y se incubaron las placas a 37°C durante 2 horas. A continuación, se retiró el medio y se añadió 100 µL/pocillo de DMSO para resuspender el precipitado y se incubaron las placas durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió a la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro de placas, Halo LED 96 (Dynamica Scientific Ltd, Livingston, UK), a 550nm. Las concentraciones subcitotóxicas ( $\leq$ IC10) se calcularon a partir de las curvas dosis-respuesta.

### **2.3 Pacientes y sujetos control**

#### **2.3.1 Cohorte del estudio “EHGNA”**

Para este estudio se reclutaron 75 pacientes con EHGNA, diagnosticados por biopsia, y 17 controles no EHGNA sometidos a una colecistectomía laparoscópica. Las características de esta cohorte del estudio se detallan en la Tabla 3.3 de la Sección 3.10 de “Resultados”. Los sujetos incluidos (pacientes de EHGNA y controles) bebían menos de

## **2 Materiales y Métodos**

20g/día de alcohol. Los pacientes con otras posibles causas de enfermedad hepática (viral, autoinmune, fármacos tóxicos, sobrecarga de hierro, enfermedad de Wilson, etc.) fueron excluidos. Además, los pacientes pertenecientes al grupo control tenían el hígado normal por análisis laparoscópico y niveles normales de glucosa en ayunas, colesterol, TG y enzimas hepáticas.

La EHGNA se diagnosticó por biopsia hepática percutánea y ultrasonografía. Las secciones de biopsia embebidas en parafina con tinciones de tricrómico de Masson y hematoxilina-eosina fueron examinadas e interpretadas por el mismo facultativo especialista, con demostrada experiencia en hepatopatología, que además desconocía los datos clínicos. La esteatosis se evaluó según la escala descrita por Brunt *et al.* (141) de acuerdo con el porcentaje de hepatocitos esteatóticos en: grado 0, <5%; grado 1, 5-33%; grado 2, >33-66%; y grado 3, >66%. Los criterios mínimos para el diagnóstico histológico de EHNA incluyen la presencia combinada de esteatosis de grado 1, más lesión hepatocelular (balonización) e inflamación lobular, con o sin fibrosis. La gravedad de la enfermedad se diagnosticó de acuerdo con los dos sistemas de puntuación utilizados en la actualidad: el primero, el NAS *score*, propuesto por la “*NASH Clinical Research Network*” (136, 141) y más recientemente el SAF *score*, un algoritmo que ha sido propuesto por Bedossa *et al.* (143, 144). El grado de fibrosis se categorizó en: 1, centrilobular/perisinusoidal; 2, centrilobular más periportal; 3, fibrosis de puente; y 4, cirrosis.

### **2.3.2 Cohortes del estudio “DILI”**

Para este estudio se utilizaron dos cohortes distintas: una cohorte de estudio y una cohorte de validación. Para la cohorte de estudio, se reclutaron 31 pacientes diagnosticados de DILI, 18 de ellos con DILI colestático/mixto y 13 con DILI tipo hepatocelular (las características de cada grupo se detallan en la Tabla 3.11 de la Sección 3.20 de “Resultados”). También se incluyeron como grupo control los 17 pacientes con un hígado sano sometidos a una colecistectomía laparoscópica, del estudio de EHGNA.

En cuanto a la cohorte de validación independiente, se reclutaron un total de 18 pacientes (9 de ellos con DILI colestático y 9 con DILI hepatocelular). Las características basales de esta cohorte se recogen en la Tabla 3.12 de la Sección 3.20 de “Resultados”.

En los pacientes del estudio DILI el historial alcohólico no fue excluyente (a diferencia del estudio en EHGNA) pero si se excluyeron los pacientes con otras causas de enfermedad hepática (hepatitis virales, hepatitis autoinmune, EHGNA y enfermedades hepáticas genéticas o metabólicas). Además, en todos los pacientes de DILI incluidos, se cumplió la relación temporal entre el inicio de los síntomas y el tratamiento farmacológico, así como la normalización del individuo tras la retirada del fármaco, que son manifestaciones características del DILI. Según la clasificación por el RUCAM (190), el diagnóstico de DILI en estos pacientes era altamente probable (RUCAM *score* > 6 puntos).

### **2.3.3 Obtención y procesamiento de muestras**

Todas las muestras se obtuvieron de pacientes ayunados. Se extrajo una muestra de sangre venosa justo en el momento de la biopsia

## **2 Materiales y Métodos**

hepática (en los pacientes de EHGNA), antes de la colecistectomía (en los pacientes control) o entre las 8 y las 10 de la mañana (en los pacientes de DILI). La sangre se recogió en tubos de vidrio seco y se centrifugó durante 10 minutos a 2500xg para obtener el suero. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su uso. Ambos estudios se realizaron de acuerdo con las leyes nacionales y locales vigentes y con la Declaración de Helsinki de 1975. El Comité Ético de Investigación Clínica (CEICC) del Hospital Universitario La Fe de Valencia los autorizó (n° 2013/0232 y 2012/0452) y se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes.

### **2.4 Purificación de RNA y cuantificación de miRNAs y mRNAs por RT-qPCR**

#### **2.4.1 Purificación de RNA total de células en cultivo y suero**

El RNA total de las células se purificó con el miRNeasy Mini Kit de Qiagen (Madrid, España). En primer lugar, sobre la placa aún congelada, se añadía 700µL de QIazol como agente para lisar las células y se rascaba la monocapa celular hasta que se obtenía un homogeneizado (si el lisado era muy denso se pasaba por una jeringa con aguja 30G). El homogeneizado se traspasaba a un tubo y se incubaba durante 5 minutos a temperatura ambiente (este paso promueve la disociación de los complejos núcleo-proteicos). A continuación, se añadía 140µL de cloroformo y se agitaba vigorosamente durante 15 segundos. De nuevo, se incubaba el homogeneizado a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaban en frío (4°C) durante 15 minutos a 12000xg, lo que separaba las muestras en tres fases: la fase acuosa transparente (superior) contiene el RNA, la interfase blanca y la

## **2 Materiales y Métodos**

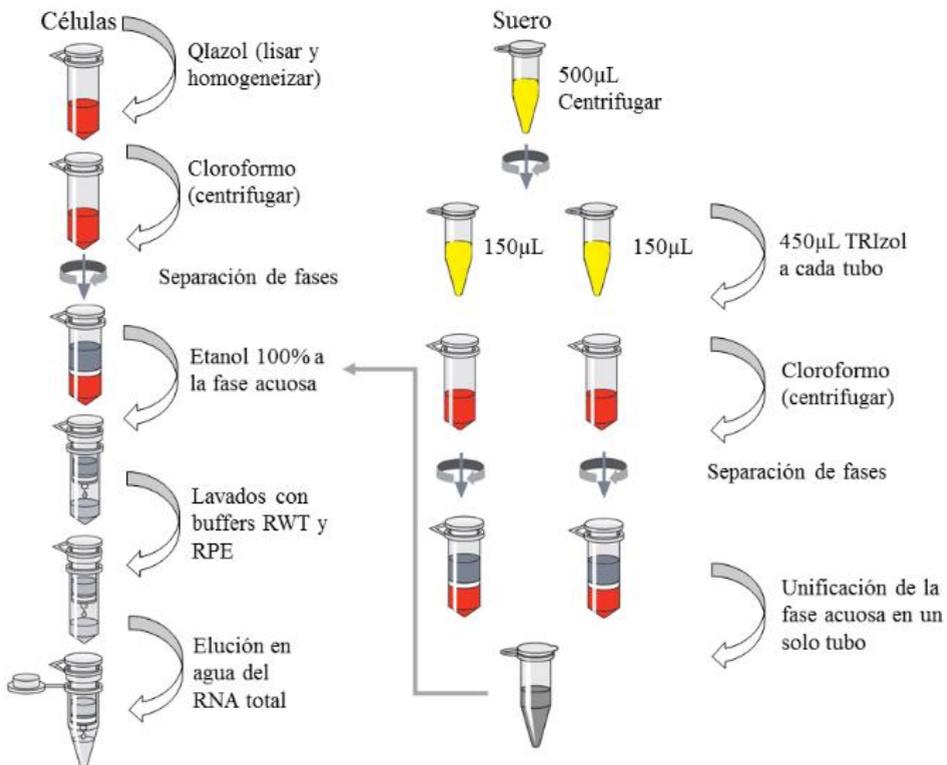
fase orgánica (inferior). Rápidamente, se transfería la fase acuosa (volumen aproximado: 350 $\mu$ L) a un nuevo tubo y se añadían 1.5 volúmenes de etanol 100% (525 $\mu$ L) y se mezclaba suavemente. A continuación, se procedía a la extracción y purificación del RNA por columnas. El homogeneizado se añadía a la columna y tras una centrifugación de 10000xg durante 15 segundos a temperatura ambiente se descartaba el filtrado (el RNA quedaba atrapado en la membrana de la columna). Se lavaba la columna una vez con 700 $\mu$ L de buffer RWT y se centrifugaba a 10000xg durante 15 segundos a temperatura ambiente, descartándose de nuevo el filtrado. Posteriormente se lavaba dos veces con 500 $\mu$ L de buffer RPE y tras la centrifugación (10000xg durante 2 minutos a temperatura ambiente), se transfería la columna a un nuevo tubo de colección. Finalmente, se añadían 30-40 $\mu$ L (según la cantidad de células de partida) de agua libre de RNasas sobre la membrana de la columna y se centrifugaba durante 1 minuto a 10000xg a temperatura ambiente para eluir el RNA. Como paso adicional (sobre todo si partíamos de muestras de suero humano), se repetía la elución con la misma agua empleada en el último paso, para obtener una mayor concentración en el RNA eluido.

Para la extracción de RNA de suero humano se utilizó el mismo kit, pero con un procesamiento previo de la muestra. Las alícuotas de 500 $\mu$ L de suero se descongelaban en frío y se centrifugaban a 15000xg durante 5 minutos a 4°C para eliminar posibles restos celulares. Posteriormente, se realizaba una doble extracción. Para ello, se separaban 300 $\mu$ L del sobrenadante en dos alícuotas de 150 $\mu$ L, y a cada una se le añadían 450 $\mu$ L de TRIZOL LS (volumen equivalente según el fabricante)

## 2 Materiales y Métodos

(Invitrogen, Barcelona, España). Tras la extracción con cloroformo se unificaban las fases acuosas en un mismo tubo al que se le añadía glucógeno libre de RNAsas 25ng/ $\mu$ L (Roche Applied Sciences, Barcelona, España) para mejorar la precipitación del RNA (191).

Posteriormente, la purificación continuaba con los mismos pasos descritos para el protocolo de muestras celulares. La cuantificación del RNA obtenido y su integridad se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). El procedimiento de extracción y purificación del RNA queda esquematizado en la Figura 2.4.



*Figura 2.4: Esquema del proceso de purificación de RNA a partir de muestras celulares y suero humano.*

## **2 Materiales y Métodos**

### **2.4.2 Cuantificación de miRNAs en muestras celulares y séricas**

La transcripción reversa para la cuantificación de los miRNAs consta de dos etapas. Con un volumen final de reacción por muestra de 30 $\mu$ L, en primer lugar, para la etapa de la poliadenilación, 1 $\mu$ g del RNA total se diluyó con agua libre de nucleasas hasta un volumen de 12,3 $\mu$ L. En el caso de las muestras de suero la dilución se realizó con un volumen fijo de 2 $\mu$ L de RNA sérico y 10,3 $\mu$ L de agua, para evitar interferencias con otros componentes presentes en el suero que haya podido arrastrar la purificación. A esta dilución se le incorporaba una mezcla de 0,75 $\mu$ L ATP 10mM (Cf: 0,5mM), 1,5 $\mu$ L del Buffer PolyA 10X (Cf: 1X), 0,25 $\mu$ L de inhibidor de RNAsas 40U/ $\mu$ L (Cf: 10U/reacción) y 0,2 $\mu$ L de Poly(A) polimerasa de *E.coli* 5U/ $\mu$ L (Cf: 1U/reacción) (New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, UK) y se incubó la reacción durante 30 minutos en un baño atemperado a 37°C. En esta etapa (vol reacción= 15 $\mu$ L), la polimerasa cataliza la adición de adeninas a partir del ATP al extremo 3' de la secuencia del miRNA.

A continuación, se incorporaba una solución de 1,5 $\mu$ L de *primer* universal-RT 16 $\mu$ M (Cf: 0,8 $\mu$ M) (Tabla 2.3) y 1,5 $\mu$ L de una mezcla de dNTPs 10mM (Cf: 0,5mM) y se incubaba de nuevo la reacción a 65°C durante 5 minutos, tras los cuales las muestras se pasan rápidamente a hielo. Este paso de choque térmico promueve la alineación del *primer* RT. En la segunda etapa, el RNA se retrotranscribe. A la mezcla resultante de los pasos anteriores (vol reacción: 18 $\mu$ L) se le incorporó 12 $\mu$ L de una mezcla de 3 $\mu$ L de DTT 100mM (Cf: 10mM), 6 $\mu$ L de 5X First Strand Buffer (Cf: 1X), 0,25 $\mu$ L de inhibidor de RNAsas 40U/ $\mu$ L (Cf:

## 2 Materiales y Métodos

10U/reacción), 1μL de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney, M-MLV 200U/μL (Invitrogen, Barcelona, España) y se completaba hasta los 12μL con agua libre de nucleasas. La reacción final (vol final: 30μL) se incubó durante 50 minutos en un baño a temperado a 37°C y posteriormente se inactivó durante 15 minutos a 70°C en un Thermomixer (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El cDNA resultante se conservó a -40°C hasta su procesamiento.

Para el diseño de los *primers forward* de PCR específicos para cada miRNA (Tabla 2.3) se siguieron los siguientes criterios (192):

- Descartar “A” en el extremo 3’
- Si es posible, el extremo 3’: las 5 últimas bases (2 o 3 “A” o “T”), las 3 últimas bases (1 o 2 “A” o “T”) y las 2 últimas bases (1 “A” o “T”).
- Si la temperatura de *melting* resultaba ser <59°C, se añadían las siguientes bases al extremo 5’ en este orden: G, A, C, G, C. Pero si la temperatura era mayor de 59°C se eliminaban bases del extremo 5’.

El cDNA diluido (dilución 1/20 en muestras celulares y 1/30 en muestras séricas) se amplificó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) en un instrumento LightCycler 480 (Figura 2.5) (Roche Applied Sciences, Barcelona, España). Las reacciones para muestras celulares y séricas difieren en el volumen final de la reacción y en la enzima polimerasa. Para las muestras celulares, con un volumen final de reacción de 10μL, los componentes específicos fueron: 2μL del cDNA diluido, 1μL de *primer forward* (5μM) específico de cada miRNA (Cf:

## **2 Materiales y Métodos**

0,5 $\mu$ M), 1 $\mu$ L de *primer* reverso universal 5 $\mu$ M (Cf: 0,5 $\mu$ M) (las secuencias de cada *primer* pueden consultarse en la Tabla 2.3), 0,5 $\mu$ L de Sonda TaqMan universal 5 $\mu$ M (Sigma) diseñada contra la parte central del *primer* universal-RT (Cf: 0,25 $\mu$ M), 5 $\mu$ L de LightCycler 480 Probes Master 2X (Roche) (Cf: 1X) y se ajustó a los 10 $\mu$ L finales con 0,5 $\mu$ L de agua libre de nucleasas. En cuanto a las muestras de suero, los componentes específicos para cada reacción de PCR fueron: 3,6 $\mu$ L de cDNA diluido, 1,2 $\mu$ L de *primer forward* específico de cada miRNA (Cf: 0,5 $\mu$ M), 1,2 $\mu$ L de *primer* reverso universal (Cf: 0,5 $\mu$ M) y 5 $\mu$ L de LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) (Cf: 0,8X), ajustándose la reacción a un volumen final de 12 $\mu$ L con agua libre de nucleasas (193).

En cuanto a las condiciones generales de la PCR, tras una etapa de desnaturalización del cDNA y activación de la Taq polimerasa (8 min a 95°C), se amplificó con 36-45 ciclos de 15s de desnaturalización a 95°C, 10s a la temperatura de anidamiento (*annealing*) (60°C) y 20s de extensión a 72°C. El seguimiento de la PCR, así como la cuantificación y análisis posterior de los productos amplificados se llevaron a cabo según el *software* “LightCycler 480 SW 1.5” (Figura 2.5).

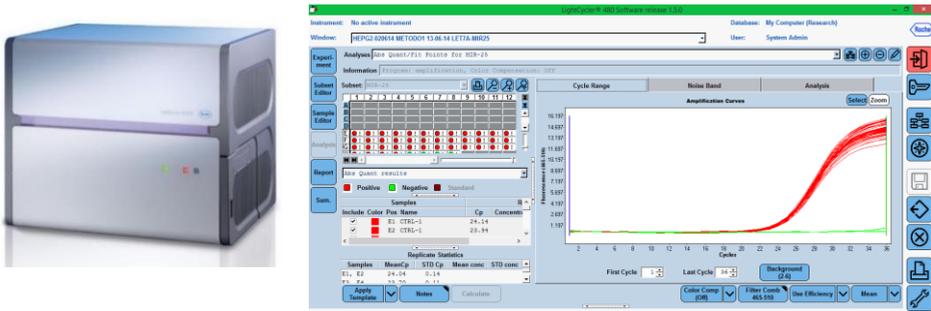


Figura 2.5: Instrumento LightCycler 480 y detalle del software “LightCycler 480 SW 1.5”. (Fuente: <https://lifescience.roche.com>)

El método de amplificación de miRNAs utilizado se esquematiza en la Figura 2.6. Cada reacción de PCR se realizó por duplicado y la concentración de los miRNAs en las muestras se calculó con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (194).

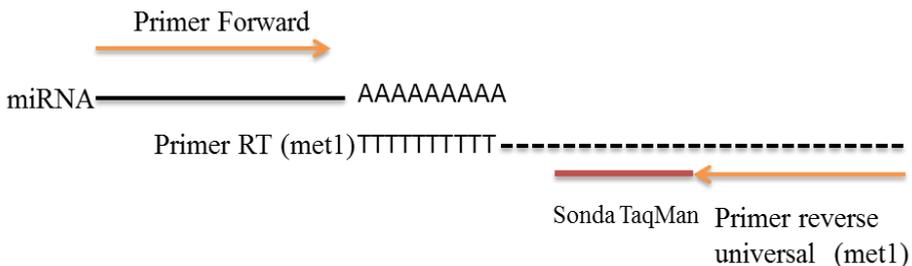


Figura 2.6: Esquema descriptivo del método de cuantificación de miRNAs por RT-qPCR. El primer reverse universal está diseñado contra el extremo 5' del primer universal de la RT y el primer forward está diseñado específicamente para cada miRNA. Además, la sonda TaqMan también es universal y está diseñada contra la parte central del primer de la RT. Este diseño experimental obliga a que el primer RT sea muy largo.

Las variaciones entre las muestras se normalizaron con la media geométrica de dos miRNAs normalizadores: Let-7a y miR-25-5p (en el caso de los cultivos celulares) y miR-15a-5p y miR-25-5p (para las muestras de suero). Estos miRNAs muestran niveles adecuados en células

humanas y en suero, su variabilidad es moderada y demuestran los mejores *scores* de estabilidad según los algoritmos NormFinder (195) y geNorm (196).

**Tabla 2.3: Secuencias de los *primers* para las cuantificaciones de miRNAs por RT-qPCR.**

<b>miRNA ID</b>	<b>Secuencia <i>primer</i> (5'-- 3')</b>
miR-let7a	GCAGTGAGGTAGTAGGTTGT
miR-25-5p	GCATTGCACTTGTCTCGGT
miR-122-5p	ACAGTGGAGTGTGACAATG
miR-21-5p	AGACTAGCTTATCAGACTGATG
miR-21-3p	AACACCAGTCGATGGGCTGT
miR-22-3p	GGCTGCCAGTTGAAGAACT
miR-22-5p	GAGTTCCTCAGTGGCAAGC
miR-23a-5p	GGGTTCCCTGGGGATGGGAT
miR-24-2-5p	GCCTACTGAGCTGAAACACA
miR-27a-5p	AGGGCTTAGCTGCTTGTGAG
miR-27b-3p	CAGTTCACAGTGGCTAAGTTCT
miR-29a-3p	GCAGTAGCACCATCTGAAATC
miR-29b-1-5p	CTGGTTTCATATGGTGGTTTAG
miR-30c-5p	AGTGTA AACATCCTACACTCTCA
miR-33a-5p	GCCAGGTGCATTGTAGTTG
miR-34a-5p	TCAGTGGCAGTGTCTTAGCT
miR-548a/ac-3p	GAAAACTGGCAATTACTTTTG
miR-628-5p	ATGCTGACATATTTACTAGAG
miR-628-3p	GTCTAGTAAGAGTGGCAGT
miR-663b	TACCCGGCCGTGCCTGA
miR-663a	AGGGGCGCCGCGGGAC
miR-15a-5p	AGCAGCACATAATGGTTTGT
miR-15b-5p	ACAGCACATCATGGTTTAC
miR-16-5p	GTAGCAGCACGTAAATATTG
miR-16-2-3p	CCAATATTACTGTGCTGCTT
miR-92b-5p	AGGGACGGGACGCGGTGCA
miR-98-5p	AGTGAGGTAGTAAGTTGTATTGT
miR-181c-5p	GACATTCAACCTGTCCGGTGAG
miR-197-3p	TTCACCACCTTCTCCACCCA
miR-126-5p	GCATTATTACTTTTGGTACG
miR-126-3p	TCGTACCGTGAGTAATAATG
miR-146a/b-5p	CCAGTGAGAACTGAATTCCATAG

## 2 Materiales y Métodos

miR-192-5p	CAGCTGACCTATGAATTGACAG
miR-200a-5p	CATCTTACCGGACAGTGCTG
miR-202-3p	AAGGTATAGGGCATGGGA
miR-331-3p	CCCCTGGGCCTATCCTAGA
miR-335-5p	CAAGAGCAATAACGAAAAATG
miR-346	TGCCCGCATGCCTGCCTCT
miR-375	GTTCGTTTCGGCTCGCGTGA
miR-376c/b-5p	GGTGGATATTCCTTCTATGT
miR-451a	AGAAACCGTTACCATTACTGAGT
miR-424-5p	AGCAGCAGCAATTCATGTTTTG
miR-1298-5p	ATTCGGCTGTCCAGATGT
miR-3613-5p	GTTGTACTTTTTTTTTTTGTTT
miR-3613-3p	ACAAAAAAAAAAGCCCAACC
miR-3929	GGCTGATGTGAGTAGACCACT
miR-1231	GTGTCTGGGCGGACAGCT
miR-1260a	ATCCACCTCTGCCACCA
miR-1260b	GATCCACCACTGCCACCA
miR-1244	GTAGTTGGTTTGTATGAGATGGTT
<i>Primer</i> RT universal	CGACTCGATCCAGTCTCAGGGTCCGA GGTATTCGATCCTAACCCCTCTCCTCGG TATCGAGT CGCACTTTTTTTTTTTTTVN
<i>Primer</i> reverso universal PCR	CCAGTCTCAGGGTCCGAGGTATTC
Sonda TaqMan universal	FAM-TCTCCTCGGTATCGAGTCGCACT- TAMRA

### 2.4.3 Cuantificación de mRNAs en muestras celulares

En cuanto a la transcripción reversa para mRNAs, consta únicamente de una etapa. En primer lugar, 1µg de RNA total se diluyó en agua libre de nucleasas hasta un volumen de 10µL, a los cuales se le incorporaban 20µL de una mezcla que contenía: 3,75µL de una mezcla de dNTPs 4mM (Cf: 0,5mM), 6µL de 5X First Strand Buffer (Cf: 1X), 3µL de DTT 100mM (Cf: 10mM), 0,75µL de un *primer* universal, un oligo dT<sub>14</sub> 120µM (Cf: 3µM) (Tabla 2.4), 0,25µL de inhibidor de RNasas 40U/µL (Cf: 10U/reacción) y 1µL de la transcriptasa reversa del virus de

## **2 Materiales y Métodos**

la leucemia murina de Moloney, M-MLV 200U/ $\mu$ L (Invitrogen, Barcelona, España) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 $\mu$ L por reacción. La reacción final de transcripción (vol final: 30 $\mu$ L) se incubó durante 60 minutos en un baño atemperado a 42°C y posteriormente se inactivó durante 15 minutos a 70°C en un Thermomixer (Eppendorf). El cDNA resultante se conservó a -40°C hasta su procesamiento.

El cDNA obtenido se amplificó mediante RT-qPCR en un instrumento LightCycler 480 (Roche Applied Sciences). Los componentes específicos para cada reacción de PCR fueron: 2 $\mu$ L de cDNA diluido (1/20), 0,5 $\mu$ L de cada pareja de *primers* específicas de cada gen (*forward* y reverso, ver secuencias en la Tabla 2.4) 6 $\mu$ M (Cf de cada uno: 0,3 $\mu$ M), y 5 $\mu$ L de LightCycler 480 SYBR Green I Master 2X (Cf: 1X) (Roche), ajustándose la reacción a un volumen final de 10 $\mu$ L con agua libre de nucleasas.

La concentración de los mRNAs en las muestras se calculó refiriendo cada valor obtenido en la PCR a una muestra “calibrador” (un pool de hígados humanos retrotranscritos de igual manera que el resto de las muestras) a la que se le asigna un valor de 1. Además, las posibles variaciones experimentales entre las muestras se normalizaron con el promedio de dos genes *housekeeping*, GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y  $\beta$ -actina (en los ensayos de HepG2) o con el gen PBGD (porfobilinógeno deaminasa) (en las muestras de hepatocitos humanos).

**Tabla 2.4: Secuencias (5'—3') de los *primers* para las cuantificaciones de mRNAs por RT-qPCR.**

<b>GAPDH</b>	
FW: ATGCTGGCGCTGAGTACGTC	RV: GGGCAGAGATGATGACCCTT
<b><math>\beta</math>-ACTINA</b>	
FW: CGTACCACTGGCATCGTGAT	RV: GTGTTGGCGTACAGGTCTTTG
<b>PBGD</b>	
FW: CGGAAGAAAACAGCCCAAAGA	RV: TGAAGCCAGGAGGAAGCACAGT
<b>BSEP</b>	
FW: GGGCTCCATTTTCAGCTATGT	RV: ACTTGCAGATCAGGTCGAG
<b>NTCP</b>	
FW: TGCCAAAATGTCCA ACTCT	RV: GTTGTGGCAGCTGTGTAGAT
<b>SIRT-1</b>	
FW: CTGGAACAGGTTGCGGGAAT	RV: TTCATGATAGCAAGCGGTTCA
<b>HMGCS2</b>	
FW: GCAGCATCGCCGAAAGTA	RV: CCTAGTCCATAGCACCATAAGCC
<b>SREBP1c</b>	
FW: GGAGGGGTAGGGCCAACGGCCT	RV: CATGTCTTCGAAAGTGCAATCC
<b>PIK3R1</b>	
FW: GATACAGCAGACGGGACCTT	RV: AGATTCATTCCGGTAGTGGTT
<b>INSIG1</b>	
FW: GGGAACATAGGACGACAGTTAG	RV: TGCCACCTGCCTGAACCCA
<b>HNF4<math>\gamma</math></b>	
FW: TATGTTATTCACCGCAACAG	RV: GCCGATCATTGATGTAGTCCT
<b>GSTA4</b>	
FW: GTTGGTACAGACCCGAAGCA	RV: GCTTTGTCCGTGACCCCTTA
<b>EIF4E2</b>	
FW: TGTGGTGTCTGTCCGCTTTC	RV: CATAATGGTGTGGGAGGTAGGT
<b>Oligo dT14</b>	
TTTTTTTTTTTTTTT	

### 2.5 Array de miRNAs (Affymetrix)

Se purificó el RNA de tres experimentos independientes de células HepG2 incubadas durante 24h con CYCA (25 $\mu$ M) o solvente (0,05% DMSO) con el miRNeasy Mini Kit de Qiagen (Madrid, España) según el

## 2 Materiales y Métodos

protocolo descrito en el apartado 2.4.1. Los perfiles globales de RNA pequeños no codificantes asociados a cada condición se determinaron con *microarrays* GeneChip miRNA 3.0 de Affimetrix (Thermo Scientific) (Figura 2.7), lo que permitió valorar los niveles de expresión de 1789 miRNAs, 1693 pre-miRNAs, y 2336 scaRNAs y snoRNA humanos, conforme a miRBase.



**Figura 2.7:** *Microarray GeneChip miRNA 3.0 de Affimetrix.* (Fuente: <https://www.thermofisher.com>).

La preparación de las muestras, la hibridación con el *microarray* y el escaneado de los mismos se realizó en la Plataforma de Genómica del IIS-LaFe (IIS-LaFe, Valencia, España). Los miRNAs se marcaron directamente sin ningún proceso de amplificación por lo que se asumió que los resultados obtenidos reflejaban las cantidades relativas de cada miRNA con una correlación directa. Los valores de fluorescencia de los *arrays* se evaluaron para determinar su calidad y se normalizaron utilizando los algoritmos RMA (*Robust Multichip Average*) y DABG (*Detected Above Background*) mediante el *software Expression Console* de Affymetrix. Para el análisis estadístico se utilizó el *software* específico para análisis de *arrays Partek Genomics Suite*, aplicando los parámetros

## **2 Materiales y Métodos**

recomendados por Affymetrix y Partek para el análisis de este tipo de *arrays*. Los análisis multivariantes incluyeron: análisis de componentes principales (PCA), ANOVA, filtrado de las diferencias de expresión por *p*-valor y *fold-change* y agrupamiento jerárquico de las variables con los niveles de expresión normalizados.

### **2.6 Secuenciación masiva miRNAs**

#### **2.6.1 Secuenciación de miRNAs de hepatocitos humanos Upcyte.**

Se purificó el RNA de tres experimentos independientes de hepatocitos humanos cultivados en sándwich de colágeno con el miRNeasy Mini Kit de Qiagen (Madrid, España) según el protocolo descrito por el fabricante y las especificaciones descritas en el apartado 2.4.1. Los HU fueron expuestos durante 24 horas a dos fármacos colestáticos modelo, CYCA (12,5 $\mu$ M) y CHLO (25 $\mu$ M) *versus* un compuesto control no colestático, KETO (37,5 $\mu$ M).

La secuenciación de los miRNAs se realizó en la Sección Genómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia. Las librerías de los miRNAs se prepararon a partir de 1  $\mu$ g de RNA del total purificado mediante el *TruSeq Small RNA Library Preparation Kit* de Illumina.

La calidad y la concentración obtenida de cada una de las nueve muestras se analizó en un Bioanalizador 2100 (Figura 2.8) (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE.UU) con un *High Sensitivity DNA chip* (Agilent). La secuenciación se realizó en la plataforma NextSeq 500 System (Fig. 2.8) (Illumina, San Diego, CA, EE.UU), obteniéndose

## 2 Materiales y Métodos

aproximadamente un total de 75 millones de lecturas de secuencias de 50 nucleótidos de longitud.



*Figura 2.8: Bioanalizador 2100 (Agilent) y NextSeq 500 System (Illumina). (Fuente: <https://www.agilent.com> y <https://emea.illumina.com>).*

### 2.6.2 Secuenciación de miRNAs de suero humano.

Se purificó el RNA a partir de 300  $\mu$ L de suero de ocho pacientes (cuatro con EHGNA *versus* cuatro con EHNA) con el miRNeasy Mini Kit de Qiagen (Madrid, España) según el protocolo descrito por el fabricante y las especificaciones descritas en el apartado 2.4.1 de la sección “Materiales y Métodos”.

El RNA obtenido fue examinado en el Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Inc.) (Fig. 2.8) usando el RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Inc.) para conocer la calidad (RIN) y concentración del material de partida. Todas las librerías fueron preparadas usando el *NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina* (New England BioLabs, Inc) según el protocolo del fabricante. Con este kit se produce la conversión de los *small* RNAs en librerías indexadas para secuenciación masiva en la plataforma Illumina. Debido a la baja concentración de RNA de partida, los adaptadores en 3' y 5', así como el *primer* RT, se añadieron a una dilución 1/2 y se realizaron 15

## **2 Materiales y Métodos**

ciclos de amplificación por PCR. Las librerías indexadas fueron purificadas mediante el *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany) para la limpieza de *primers*, nucleótidos, enzimas y sales de las reacciones enzimáticas previas. Posteriormente, se realizó un control de calidad de las mismas. A continuación, se realizó la selección de tamaño para la obtención de la fracción de miRNAs en un rango de tamaño de 120-200 pb. Finalmente, la secuenciación de los miRNAs se llevó a cabo en la plataforma NextSeq 500 System (Illumina, Inc., San Diego, CA, EE.UU) (Fig. 2.8) con el Kit MID Output 150 ciclos de Illumina. Las muestras de suero tuvieron una mediana de 237554 lecturas de miRNAs (de 68364 la que menos hasta 512598 lecturas la muestras que más). Los conjuntos de datos y la información adicional de la secuenciación se depositaron en la base de datos de expresión de genes Omnibus (GEO) con un número de depósito, GSE114923.

Los análisis bioinformáticos de los datos derivados de la secuenciación de miRNAs y su procesamiento estadístico se realizaron por CAP-miRSeq, una plataforma de análisis integral para datos de secuenciación de miRNAs que integra el preprocesamiento de las lecturas, la alineación, la detección y cuantificación de miRNA maduros/ precursores/ nuevos, y el análisis de expresión diferencial entre las condiciones experimentales.

### **2.7 Cuantificación de lípidos intracelulares**

#### **2.7.1 Cuantificación de lípidos intracelulares mediante *High Content Screening* (HCS)**

Las células HepG2 se sembraron a una densidad de 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. A las 24 horas de la siembra, los

## 2 Materiales y Métodos

células fueron pre-incubadas con una mezcla de ácidos grasos libres 62 $\mu$ M (oleato:palmitato 2:1) recién preparada antes de cada ensayo en medio de cultivo. Las células se incubaron durante 14 horas a 37°C. Posteriormente, los cultivos fueron tratados con fármacos comúnmente prescritos a pacientes con EHGNA (detallados en el apartado 2.1 de esta sección). Los compuestos se añadieron individualmente, así como en combinaciones de dos o tres compuestos a la vez. Además, las células también se expusieron a una mezcla de oleato:palmitato 0,6mM (2:1), como control positivo de acumulación lipídica metabólica, y a DOXY, como fármaco modelo que produce acumulación lipídica iatrogénica. Las soluciones trabajo de cada compuesto se prepararon mediante una dilución 1/200 de cada solución stock en medio de cultivo, de esta forma la concentración final de DMSO nunca excedió el 0,5% (v/v). Las células estuvieron expuestas a los tratamientos durante 24 horas.

A continuación, se analizó el contenido de lípidos neutros y el potencial de membrana mitocondrial (MMP) mediante el detector de imágenes *High Content Screening* (HCS) ScanR de Olympus (Alemania), utilizando las sondas fluorescentes específicas: 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BODIPY 493/503 3,75ng/mL) que tiñe los lípidos neutros y “*tetramethylrhodamine methy ester*” (TMRM 75 $\mu$ g/mL) que se une a la membrana mitocondrial (Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona). Además, se añadió la sonda Hoechst 33342 1,5 $\mu$ g/mL (Sigma Aldrich) que tiñe los núcleos celulares y nos permitió analizar el número total de células. Las sondas se incorporan directamente en el medio de cultivo, según el protocolo descrito anteriormente por el grupo (197, 198). Primero se retiró el medio de

## **2 Materiales y Métodos**

cultivos con los compuestos y se añadió 100µL/pocillo de la mezcla recién preparada de las sondas en medio de cultivo, y se incubó las placas durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se retiró el medio con las sondas fluorescentes, se añadió 100µL/pocillo de medio de cultivo fresco y las placas se analizaron en el detector ScanR para adquirir las imágenes.

### **2.7.2 Cuantificación de triglicéridos intracelulares mediante ensayos colorimétricos**

Las células HepG2 se sembraron en placas individuales de 6 cm de diámetro a razón de 1.200.000 células/placa. Los cultivos fueron tratados con los mismos compuestos y las mismas combinaciones que en los ensayos del punto anterior. Los tratamientos se incorporaron a las células en medio de cultivo que contenía una mezcla de AG libres 62µM (oleato:palmitato 2:1). Las células estuvieron expuestas a los tratamientos durante 24 horas. Las placas se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80° hasta la posterior extracción de lípidos y proteínas.

El contenido intracelular de TG se cuantificó en el residuo lipídico seco. Este residuo seco se obtiene tras una extracción de metanol-cloroformo a partir del homogeneizado celular. En primer lugar, la monocapa celular se rascó en frío con 300µL de agua por placa. A continuación, se añadió el metanol (500µL/muestra) y el cloroformo (1mL/muestra) conservados a -20°C y se dejaron los tubos en agitación durante 20 minutos a 60 rpm. Tras 10 minutos en hielo, los tubos se centrifugaron en frío a 10000xg durante 15 minutos y se traspasó a un nuevo tubo la fase inferior (cloroformo) donde están los lípidos. Después de una nueva centrifugación a 10000xg a 4°C durante 5 minutos para

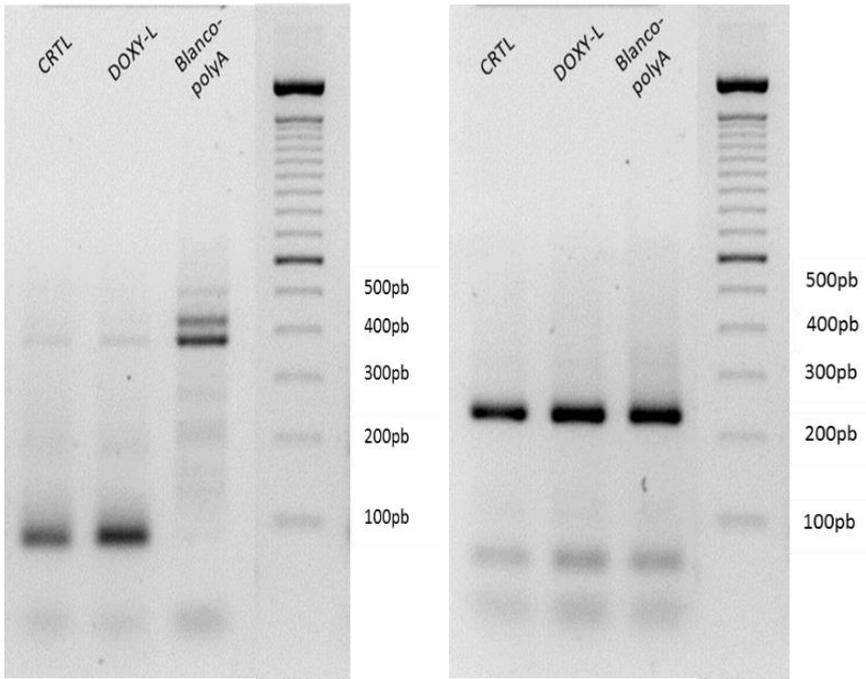
## **2 Materiales y Métodos**

asegurarse que no quedaran restos celulares, se pasó de nuevo a un tubo limpio sobre el que se aplicaba vacío con un concentrador *miVac Duo Centrifugal Vacuum Concentrator* (Genevac, Thermo Fisher Scientific). La valoración de los TG se realizó sobre el residuo seco resuspendido en butanol usando un kit colorimétrico (SPINREACT Triclycerides, Barcelona, España) (182). Las variaciones de las muestras se normalizaron con su correspondiente contenido en proteínas celulares, cuya valoración se realizó por el método Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EE.UU).

### **2.8 Electroforesis**

Esta técnica se empleó para comprobar los tamaños de los fragmentos amplificados en las reacciones de PCR y su integridad. Además, queríamos asegurarnos de que estábamos detectando específicamente el miRNA maduro, por ello, en todos los ensayos se realizó un “blanco polyA” (no lleva la polimerasa que poliadenila al miRNA, pero si lleva la transcriptasa). Se realizaron geles de agarosa al 2,5% (que es un porcentaje adecuado para la resolución de pequeños fragmentos de DNA) utilizando SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) como fluoróforo intercalador del DNA. Los geles se prepararon en tampón TBE (Tris 100mM, ácido bórico 90mM y EDTA 2mM) y posteriormente se observaron los fragmentos mediante transiluminación con luz UV (Figura 2.9).

## 2 Materiales y Métodos



**Figura 2.9:** Análisis de los productos de PCR en gel de agarosa al 2,5%. En el miR-22 (izquierda) la banda de las dos primeras carreras de 100pb pertenece al miRNA maduro (suma del miRNA maduro y el primer RT), mientras que en el blanco la banda sitúa un producto de 400pb que pertenece al pri-miRNA posiblemente. Este patrón de bandas lo encontramos en la mayoría de miRNAs analizados, sin embargo, en algún caso se detectó casos como el miR-1244 (derecha), cuyo producto de PCR en las tres muestras, inespecífico, se situaba a una altura de 250pb, posiblemente el pri-miRNA.

### **2.9 Transfección de RNA de interferencia**

La función específica de algunos miRNAs se investigó realizando experimentos de ganancia de función mediante la transfección de RNA de interferencia (RNAi) *mimic* (mirVana® miRNA *mimic*, ThermoFisher Scientific) o un control negativo (Anti-miR™ miRNA *Inhibitor Negative Control* #1, ThermoFisher Scientific). Las células HepG2 se sembraron en medio DMEM (Gibco BRL, Invitrogen) suplementado con un 7% de

## **2 Materiales y Métodos**

SBF sin antibiótico en placas de 24 pocillos a una densidad de 80.000 células/pocillo.

Para el protocolo de transfección, en primer lugar, se reemplazó el medio de cultivo por medio DMEM fresco sin antibiótico ni SBF (para evitar la interferencia de las lipasas del SBF), lavando las células previamente con PBS a 37°C. En segundo lugar, se diluyeron por separado en medio Opti-MEM I reducido en suero (ThermoFisher Scientific) el RNAi y el lípido de transfección elegido; en nuestro caso se realizaron ensayos tanto con Lipofectamina RNAiMAX Reagent (Invitrogen) como con X-TremeGENE HP Reagent (Roche). Además, en todos los ensayos los cultivos fueron expuesto a un plásmido (pIRES2-GFP) cuya propiedad fluorescente nos sirvió como control positivo del proceso de transfección. Los volúmenes de cada reactivo y las concentraciones finales se detallan en las Tablas 2.5 (A y B). A continuación, se añadió la dilución del RNAi (100µL) sobre la del lípido (100µL), se homogenizó pipeteando y se incubó la reacción durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las condiciones de ensayo se realizaron por duplicado en las placas.

Por último, se añadió el complejo RNA-lípido gota a gota sobre los cultivos celulares (100µL en 500µL de medio/pocillo) y se incubaron las placas a 37°C toda la noche. El volumen final de transfección fue de 600µL por pocillo. Por la mañana se reemplazó el medio de transfección por medio DMEM fresco sin antibiótico suplementado con un 7% SBF y pasadas 48 horas desde la transfección se congelaron las placas en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

**Tablas 2.5: Volúmenes y concentraciones de los reactivos necesarios para la transfección.**

### A-Reacción 1

Tubos	Plásmido (μL)	RNAi 4μM (μL)	Opti-MEM (μL)	Volumen final	Concentración final
1 y 5	20		80	100	0,1μg/μL
2 y 6		3	97	100	6pmol (10nM)
3 y 7		9	91	100	18pmol (30nM)
4 y 8		27	73	100	54pmol (90nM)

### B-Reacción 2

Tubos	Lipofect-RNAiMAX (μL)	X-TREME GENE (μL)	Opti-MEM (μL)	Volumen final
1	4*		96	100
2	3		97	100
3	3		97	100
4	4		96	100
5		4	96	100
6		3	97	100
7		3	97	100
8		4	96	100

\* El volumen del reactivo de transfección utilizado dependía de la cantidad de ácido nucleico que se transfectaba.

## 2.10 Tratamiento de los datos y análisis estadísticos

Los experimentos con células en cultivo se realizaron por cuadruplicado y las determinaciones analíticas (PCR) por duplicado. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM y las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron mediante t-test o *one-way* ANOVA y Tukey HSD *post hoc test*. Las diferencias fueron consideradas significativas si  $p < 0,05$ . El análisis multivariante de los niveles de expresión de miRNAs en cultivos celulares se realizó con el *software* MetaboAnalyst 4.0 (199).

## **2 Materiales y Métodos**

En los tratamientos de datos de cohortes de pacientes, las variables cualitativas se presentan como frecuencias absolutas (número, n) y relativas (porcentaje, %) y en cuanto a las variables cuantitativas se expresan como medidas de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar). Para evaluar las diferencias entre dos grupos, las variables cualitativas se analizaron mediante la prueba chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y las variables cuantitativas mediante un t-test para variables con distribución normal y varianzas iguales o la prueba de Mann-Whitney U si las variables no seguían una distribución normal o las varianzas eran heteroscedásticas. Para el análisis de más de dos grupos de pacientes, la significación estadística de las diferencias se evaluó mediante *one-way ANOVA* y *Tukey HSD post hoc test*. La correlación entre dos variables se estudió con la prueba de Pearson o Spearman, dependiendo si las variables tenían una distribución normal (paramétrica) o no.

La precisión de los biomarcadores predictivos de EHNA y de fibrosis avanzada, así como la exactitud en la discriminación entre los distintos fenotipos de DILI se investigó mediante la determinación del área bajo la curva (AUROC) del análisis de características operativas del receptor (ROC). El valor que permite la separación de los grupos con la mejor sensibilidad y especificidad se calculó con el método de Youden. La interrelación entre los múltiples miRNAs se evaluó mediante modelos de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para superar los problemas relacionados con la multicolinealidad entre variables independientes, y con el gran número de variables en comparación con el pequeño tamaño muestral. PLS-DA es un método de clasificación multivariable ampliamente utilizado que tiene como objetivo

## **2 Materiales y Métodos**

modelar la relación lineal entre una matriz de datos y un vector de respuestas (es decir, clases), extrayendo un conjunto de variables latentes (LV) que explican la variación en los datos correlacionados con la clase vector (200). El número de LV extraídas determina la complejidad del modelo. La selección de un número alto o bajo de LV podría dar lugar a un ajuste excesivo o insuficiente, respectivamente, por lo que debe seleccionarse cuidadosamente. En nuestro caso, se utilizaron cifras de mérito con validación cruzada para seleccionar el número óptimo de LV y, utilizando datos autoescalados, el número de LV que proporcionó el error más bajo de clasificación fue seleccionado, siendo estimado mediante validación cruzada *leave-one out* (LOO-CV). Asimismo, se utilizó la LOO-CV para evaluar el rendimiento de generalización de los clasificadores desarrollados utilizando AUROC, sensibilidad (Se), especificidad (Sp), valores predictivos positivos y negativos (VPP y VPN, respectivamente), las razones de verosimilitud negativas y positivas (NLR y PLR, respectivamente) y la precisión general como estimaciones de rendimiento.

El tratamiento de datos y la estadística de los microarrays y la secuenciación de los miRNAs se describió en sus apartados correspondientes de la sección Materiales y Métodos: apartado “2.5 Array de miRNAs (Affymetrix)” y apartado “2.6 Secuenciación masiva miRNAs”



## **3-RESULTADOS**



## **Capítulo 1: Búsqueda de biomarcadores predictores de esteatosis iatrogénica**

En la actualidad, la EHGNA es la causa más común de hepatopatía crónica en los países occidentales. El mecanismo patogénico más frecuente en la población es la disfunción de la homeostasis metabólica, sin embargo, la esteatosis iatrogénica, es decir, la esteatosis causada, promovida o exacerbada por medicamentos es menos frecuente y está menos estudiada. Evidencias preliminares del grupo (184, 201, 202) sugieren que los fármacos esteatósicos alteran vías de regulación transcripcional en el hígado, por lo que podrían generar una firma o huella singular, que podría ser útil para entender mejor el mecanismo patogénico de estos fármacos así como para detectar nuevos compuestos con potencial pro-esteatósico. Entre los genes afectados por estos fármacos es muy probable que se encuentren genes de microRNAs, que tienen el valor añadido de poder convertirse en biomarcadores circulantes no invasivos. Por ello, los objetivos que pretendemos abordar en esta primera parte son determinar el efecto de los medicamentos esteatósicos en el perfil de expresión de los miRNAs en células hepáticas en cultivo y realizar análisis multivariante para encontrar una firma predictiva del potencial esteatósico iatrogénico.

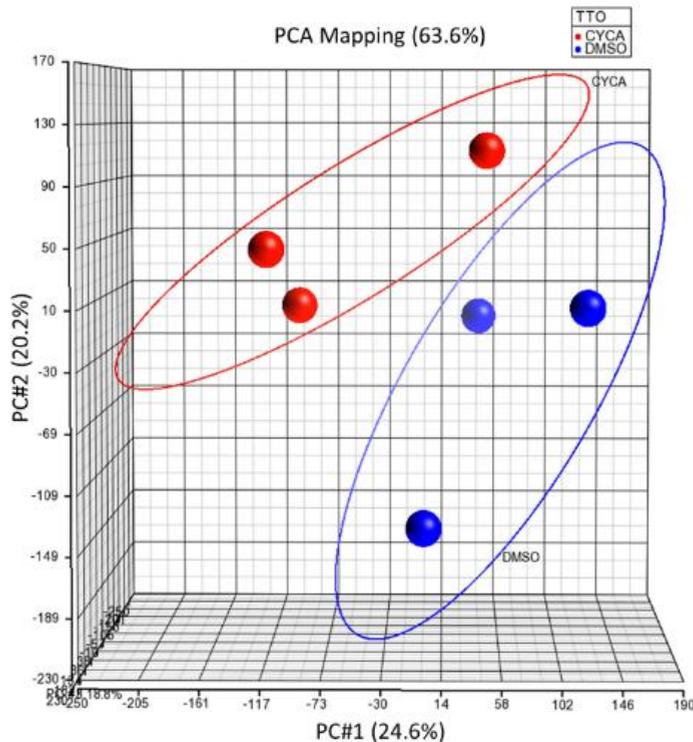
### **3.1 Efectos de la Ciclosporina (CYCA) en el miRNoma de células HepG2**

Nuestro primer objetivo fue caracterizar el impacto de los fármacos esteatósicos en el miRNoma de células hepáticas humanas, en este caso trabajamos con la línea celular HepG2.

### 3 Resultados

Investigamos el efecto global de un compuesto esteatóxico (y también colestásico) ampliamente estudiado como modelo: la CYCA (183). Expusimos las células HepG2 a CYCA (25  $\mu$ M) o al solvente DMSO (0,05 %), durante 24 horas. Después, purificamos el RNA total de 3 experimentos independientes, y analizamos el miRNoma mediante *Arrays Affymetrix GeneChip® miRNA 3.0*.

El análisis por PCA no supervisado (Figura 3.1) separó las muestras en dos grupos conforme al tratamiento empleado: CYCA (rojo) vs DMSO (azul).



**Figura 3.1:** PCA no supervisado del perfil de expresión global de miRNAs separó las células tratadas con CYCA de las células control. Los cultivos de HepG2 se incubaron durante 24h con CYCA (25 $\mu$ M) o DMSO (0,05%). Los perfiles de expresión de los miRNAs se analizaron mediante *Arrays Affymetrix GeneChip miRNA*. El análisis PCA se realizó con el "Partek Genomics Suite".

### **3 Resultados**

Del total de miRNAs analizados, 79 mostraron una expresión diferencial significativa ( $p$ -valor  $<0.05$ ) en las células HepG2 tratadas con el compuesto esteatósico. Cincuenta y cuatro de ellos fueron inducidos con el tratamiento y veinticinco reprimidos (Tablas 3 A y B del Anexo I). De entre los miRNAs inducidos destacaron, con una mayor significación estadística, los miR-21, -22, -23, -24, -27 y -29.

Nuestro siguiente objetivo fue investigar si los efectos observados se deben sólo a mecanismos particulares de la CYCA o si por el contrario son efectos compartidos con otros compuestos esteatósicos que nos permitan identificar firmas comunes de miRNAs que, además, podrían tener una relación causal con la hepatotoxicidad esteatósica. Para ello, de la Tablas 3 A, B y C del Anexo I, seleccionamos 35 miRNAs (resaltados en negrita) para su validación posterior por RT-qPCR en células nuevamente tratadas con CYCA y, en paralelo con una batería nueva de compuestos. La selección de miRNAs se basó tanto en las diferencias significativas según el *microarray* como en estudios previos que respaldan su papel en el metabolismo lipídico del hígado. En cuanto a los nuevos compuestos esteatósicos y no esteatósicos, la selección se hizo en base a información contrastada en la literatura (182, 183).

#### **3.2 Los fármacos esteatósicos modelo presentan una huella común en el perfil de expresión de miRNAs en células HepG2**

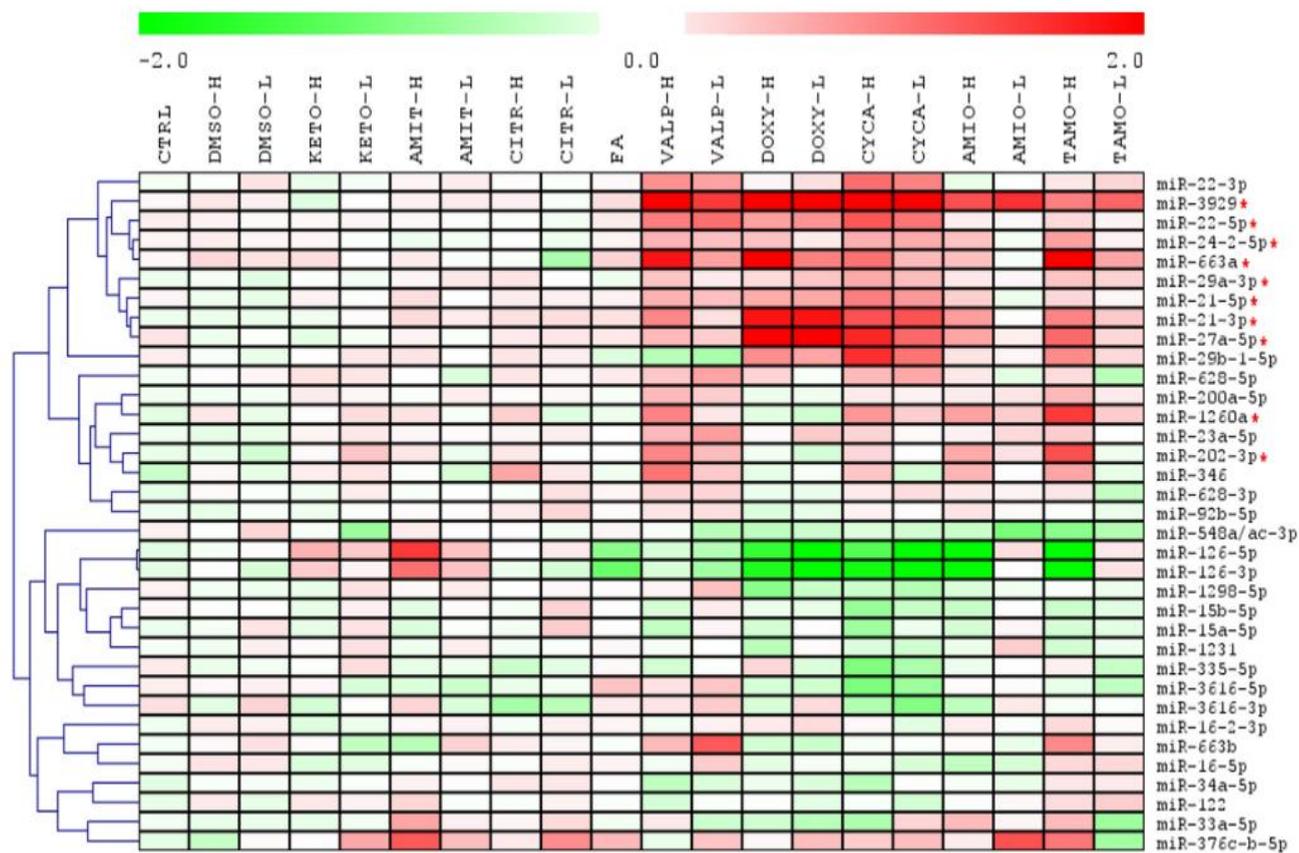
De nuevo, las células HepG2 se incubaron con un grupo de fármacos esteatósicos modelo (VALP, DOXY, CYCA, AMIO y TAMO) *versus* compuestos no esteatósicos como controles (DMSO, CITR, AMIT y KETO). Los experimentos *in vitro* independientes se realizaron por

### **3 Resultados**

cuadruplicado y para cada compuesto se testaron dos dosis: *high* (H) y *low* (L). Además, las células se expusieron a una mezcla de ácidos grasos, oleato-palmitato (AG 0,6mM) (una condición que causa esteatosis metabólica *in vitro* y nos permitirá distinguir entre miRNAs que alteren su expresión a causa de los tratamientos *vs* aquellos que se alteren por la consecuente acumulación de grasa (182)).

El análisis por *heatmap* (Figura 3.2) de los 35 miRNAs seleccionados mostró que muchos de los miRNA alterados por CYCA también eran alterados, en el mismo sentido, por los otros fármacos esteatósicos; por lo que podemos decir que los compuestos esteatósicos presentan una huella común en el perfil de estos miRNAs. La mayoría de los tratamientos indujeron (color rojo) los miR-22-5p, -3929, -24-2-5p, -663a, -29a-3p, -21 (5p y 3p), -27a-5p, -1260 y -202-3p. Además, ninguno de ellos se vio afectado por los compuestos control o los AG (FA, *fatty acid*, en la figura). También se observó que la expresión de una pareja de miRNAs (miR-126 (5p y 3p)) fue inhibida (celdas en verde) por los tratamientos esteatósicos, frente a los controles, pero también se vio efecto con los AG (sobre estos miRNAs se incidirá de nuevo más adelante).

### 3 Resultados



### **3 Resultados**

*Figura 3.2: El análisis de agrupamiento heatmap de los patrones de expresión de 35 miRNAs revela que los fármacos esteatósicos tienen una huella común. Las células HepG2 se trataron con dos dosis (H y L) de los compuestos seleccionados. FA: ácidos grasos 0,6mM (2:1 oleato:palmitato). Los niveles de miRNAs se analizaron por RT-qPCR en 4 experimentos independientes y se normalizaron con la media geométrica de miR-Let-7a y miR-25. Los análisis Heatmap y el agrupamiento se llevaron a cabo con MeV: MultiExperiment Viewer.*

Basándonos en los miRNAs que mostraron una mayor inducción en prácticamente todos los tratamientos esteatósicos, seleccionamos 10 candidatos (identificados en la Figura 3.2 con un asterisco rojo) para realizar los siguientes estudios.

Un agrupamiento jerárquico de las diferentes condiciones experimentales basado en estos 10 miRNAs demostró que TAMO, VALP, DOXY y CYCA se agrupan juntos, sobre todo a la concentración “H” (Figura 3.3). AMIO sería el compuesto esteatósico más distinto de este grupo de fármacos modelo, y en un subgrupo claramente separado encontramos a los compuestos control (KETO, AMIT y CITR) y a los AG. Estos primeros resultados indican que los compuestos esteatósicos modelo presentan una huella particular en el miRNoma de las células HepG2, lo que podría ser útil como una biofirma predictiva del potencial esteatósico que pueda tener un compuesto antes de ser comercializado.

### 3 Resultados

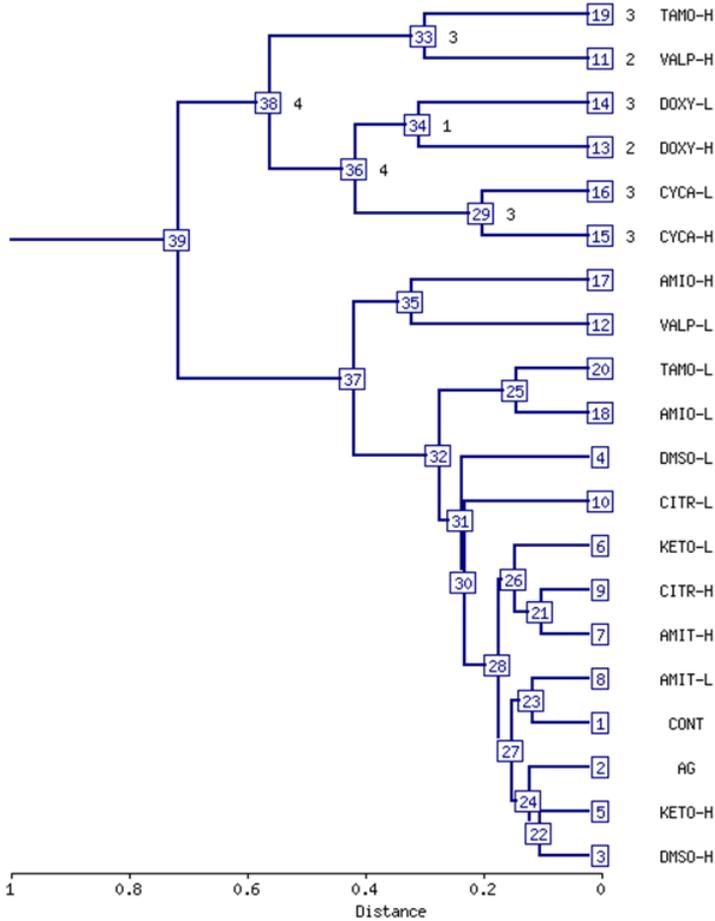
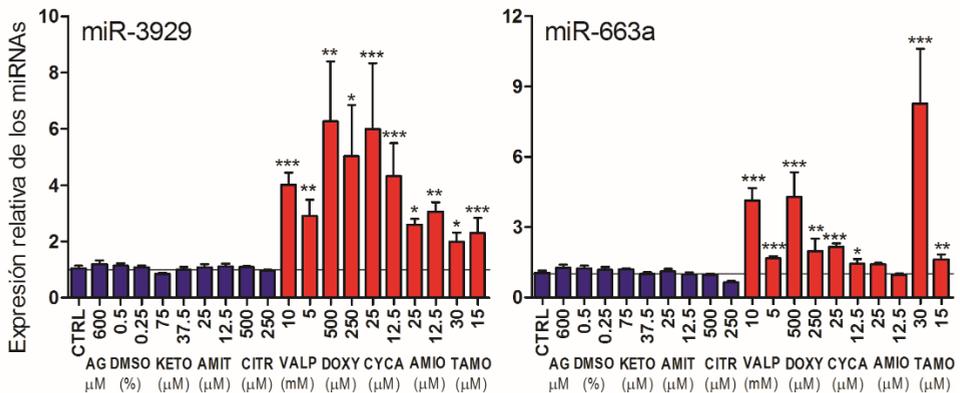


Figura 3.3: Análisis de agrupamiento jerárquico de los diferentes tratamientos/condiciones basados en una selección de 10 miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica. (H: High, concentración alta; L: Low, concentración baja; AG: ácidos grasos)

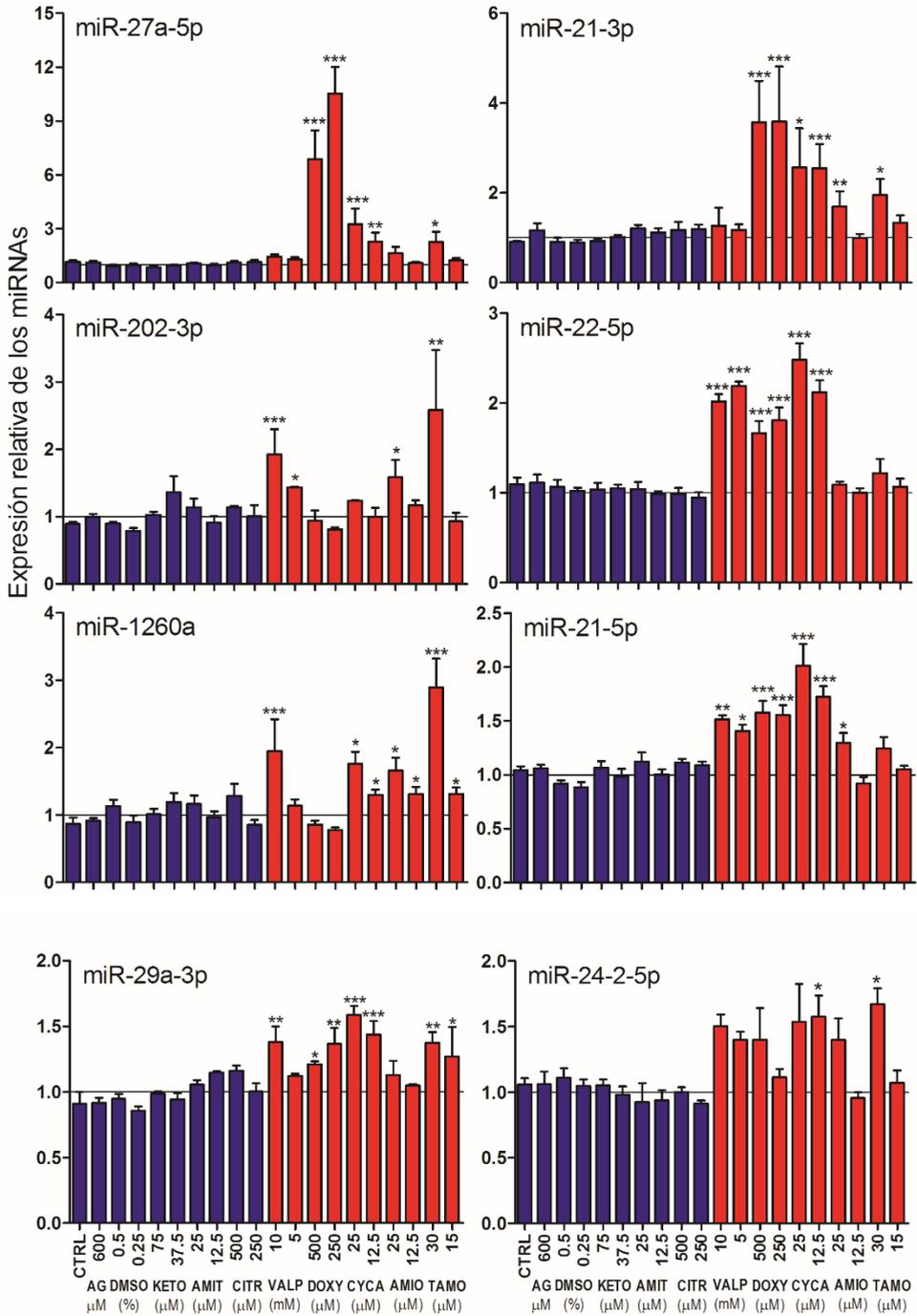
Los miRNAs que se seleccionaron por su inducción significativamente diferencial en los *microarrays* de expresión se validaron también por RT-qPCR. Tras este análisis de validación (Figura 3.4), se observó que CYCA, VALP, TAMO y DOXY inducen significativamente la mayoría de los miRNAs seleccionados (8-9 de 10), a ambas dosis de cada compuesto, mientras que AMIO tuvo un efecto

### 3 Resultados

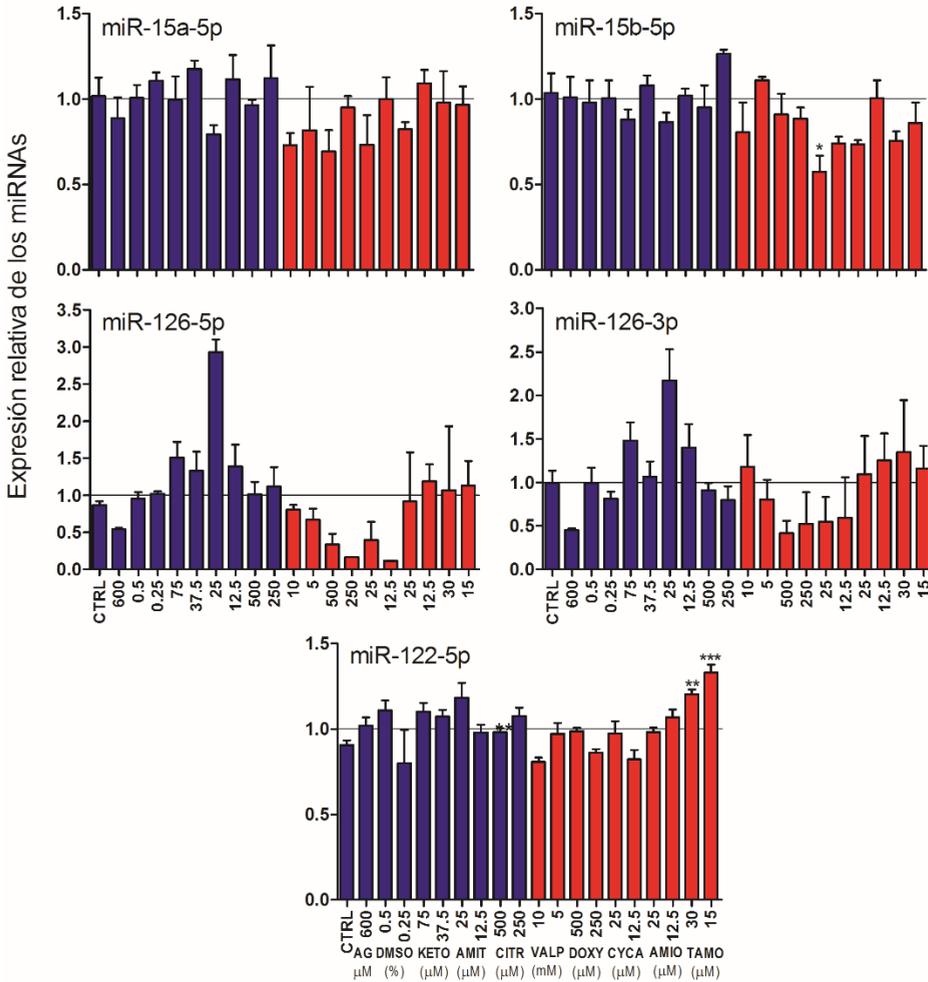
significativo en sólo 5-6 miRNAs (Fig. 3.4). Esto indica que dentro del grupo de fármacos esteatósicos, AMIO es el más diferente del resto (por un posible mecanismo esteatósico distinto). Otra observación interesante para destacar es que los fármacos esteatósicos provocan preferentemente la inducción de los miRNAs. Se intentó validar alguno de los pocos miRNAs cuya expresión estaba reprimida según los análisis por *microarray* (por ejemplo, miR-15a-5p y miR-15b-5p), pero sólo se observó un pequeño efecto de represión en el análisis por RT-qPCR (aproximadamente del 20-30%, Fig. 3.4). En cuanto a la pareja del miR-126 (5p y 3p), como ya se había comentado, observamos que también los AG reprimían la expresión del miRNA, por lo que no se podría considerar un biomarcador específico de la esteatosis iatrogénica (Fig. 3.4). Por último, ninguna de las condiciones ensayadas causó un efecto significativo en el miR-122, un reconocido marcador hepático muy estudiado y asociado a la toxicidad hepática más grave, que posiblemente no tenga lugar a las concentraciones subcitotóxicas utilizadas en nuestro estudio. (Fig. 3.4).



### 3 Resultados



### 3 Resultados



**Figura 3.4:** Nivel de expresión de miRNAs seleccionados en células tratadas con fármacos esteatóticos y no esteatóticos. Los fármacos esteatóticos, pero no los AG, preferentemente inducen los miRNAs. Las parejas de miRNAs, miR-15 y miR-126 fueron inhibidas por los fármacos esteatóticos, pero el miR-126 también se vio alterado por los AG. El miR-122 no se vio alterado por ningún tratamiento. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=4). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ANOVA, Tukey post hoc.

#### 3.3 Confirmación del efecto de los fármacos esteatósicos modelo sobre los miRNAs en hepatocitos humanos en cultivo

Actualmente, el modelo celular *gold-standard* para los estudios de HTX *in vitro* es el cultivo primario de hepatocitos humanos, sin embargo, esta técnica presenta algunas desventajas siendo las más destacadas la variabilidad interindividual y la limitación para obtener tejido hepático humano sano con el que realizar los cultivos. Los hepatocitos de cuatro biopsias hepáticas de hígados de donantes que no fueron aptos para trasplante se aislaron y cultivaron de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 2.2.3 de la Sección “Materiales y Métodos”. Las células se expusieron durante 24 horas a los fármacos esteatósicos en las mismas condiciones que las células HepG2. Se analizó el nivel de expresión de los miRNAs por RT-qPCR y se observó que los miRNAs cuya expresión había sido alterada por los tratamientos esteatósicos en los cultivos de células HepG2 también resultaron inducidos en los hepatocitos humanos (Figura 3.5). Los compuestos DOXY y CYCA fueron los más efectivos induciendo los miRNAs.

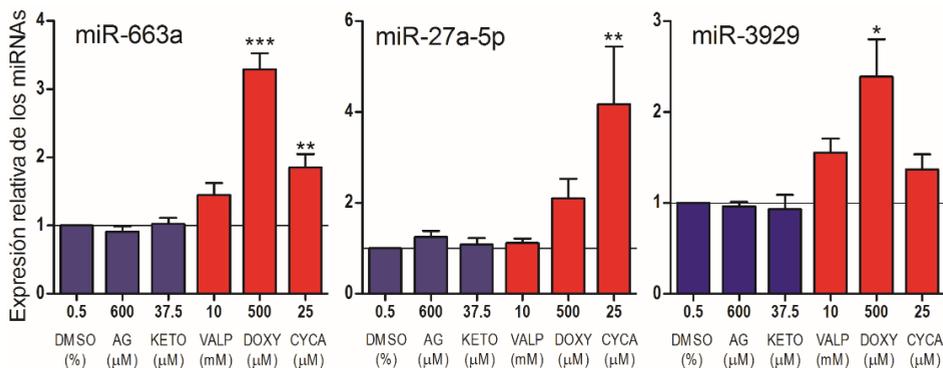


Figura 3.5: Nivel de expresión de algunos miRNAs en cultivos primarios de hepatocitos humanos tratados con fármacos esteatósicos y no esteatósicos. Los

### **3 Resultados**

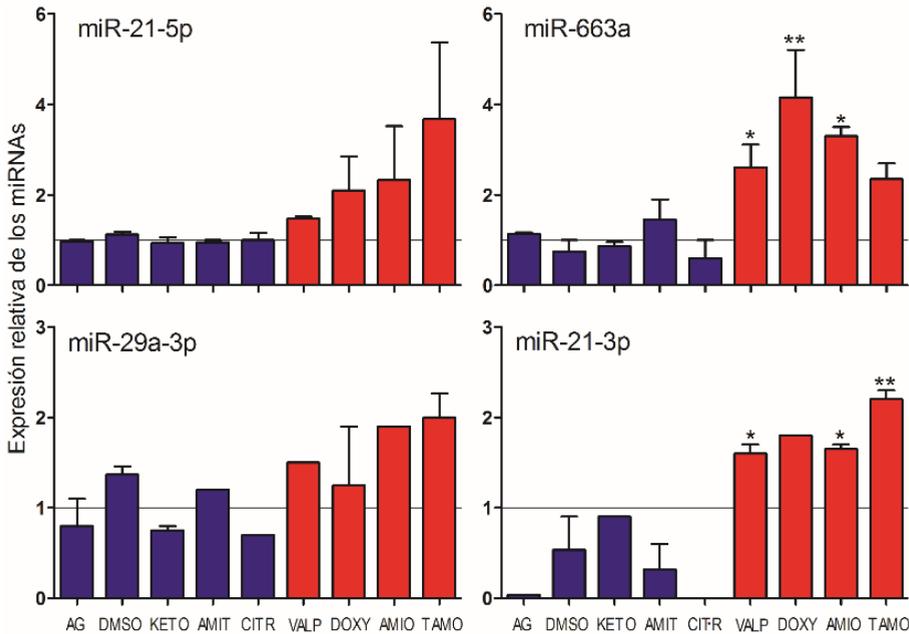
*hepatocitos humanos se incubaron durante 24h con los compuestos seleccionados y la expresión de los miRNAs se determinó por RT-qPCR. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=4). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ANOVA, Tukey post hoc.*

#### **3.4 Los fármacos esteatósicos modelo incrementan la liberación de miRNAs al medio de cultivo**

Una de las razones de enfocar nuestro estudio en los miRNAs hepáticos fue la ventaja que supone que estas moléculas sean activamente liberadas al medio extracelular, por ello, nuestro siguiente objetivo fue estudiar esos miRNAs alterados como posibles biomarcadores circulantes. Los miRNAs pueden viajar por el torrente sanguíneo protegidos en exosomas, microvesículas, cuerpos apoptóticos asociados a AGO o en lipoproteínas HDL. Por lo tanto, podríamos pensar que el incremento intracelular de miRNAs inducidos por los fármacos esteatósicos que se ha observado, podría resultar en un aumento en la liberación de estos miRNAs al medio extracelular.

Se midió el nivel extracelular de miRNAs en cultivos de HepG2 tras 24h de incubación con los compuestos y se observó que sólo los compuestos esteatósicos producen un incremento en la liberación de los mismos (Figura 3.6). Sin embargo, el nivel extracelular de estos miRNAs fue varios ordenes de magnitud inferior al nivel intracelular, lo que no permitiría una detección fiable para los miRNAs menos abundantes.

### 3 Resultados



**Figura 3.6:** Liberación de miRNAs biomarcadores al medio de cultivo por las HepG2. El medio de cultivo se recogió a las 24h post-tratamientos y se centrifugó a 7500xg durante 10min. El RNA extracelular se purificó de 300µL de medio y los miRNAs se cuantificaron según lo descrito en la Fig.3.2. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ANOVA, Tukey post hoc.

### 3.5 Algunos fármacos comúnmente prescritos para el síndrome metabólico también inducen los miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica.

La esteatosis hepática es una causa importante de fracaso en el desarrollo de un nuevo medicamento. En el contexto de la EHGNA la posible contribución de los medicamentos es desconocida. La EHGNA se considera la manifestación hepática de otra enfermedad también ampliamente extendida actualmente, el SM, donde la prevalencia de la EHGNA alcanza el 90%. Estos pacientes tan heterogéneos están polimedicados y estos fármacos podrían contribuir a la EHGNA. Ya

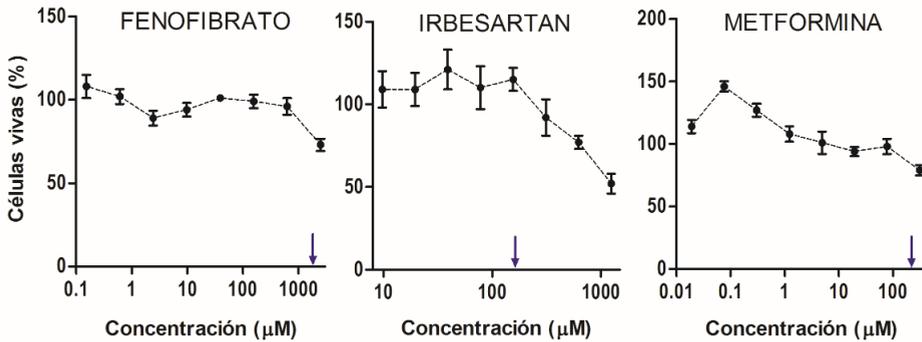
### **3 Resultados**

hemos visto como un grupo de medicamentos cuya acción esteatósica es conocida producen la inducción de la expresión de una serie de miRNAs, ¿es posible que otros fármacos comercializados y ampliamente utilizados tengan un efecto pro-esteatósico e induzcan los mismos biomarcadores?

Nuestro próximo objetivo fue analizar si estos miRNAs candidatos a biomarcadores también son alterados por fármacos que se prescriben normalmente para el SM. En primer lugar, seleccionamos los medicamentos de los siguientes grupos terapéuticos: antihipertensivos (IRBE, HCTZ y AMLO), antidiabéticos orales (SITA y METF), hipolipemiantes (FENO, SIMV y ATOR), inhibidores de la bomba de protones (OMEP), analgésicos (TRAM, PARA y ASPI), ansiolíticos (LORA y DIAZ) y antidepresivos (PARO y VENL).

Las concentraciones subcitotóxicas se determinaron a partir de las curvas de viabilidad dosis-respuesta en los ensayos de MTT (Figura 3.7 y Tabla 2 del Anexo I). Las concentraciones finales que se seleccionaron para los experimentos *in vitro* variaron hasta un máximo de 200 veces la concentración terapéutica máxima en plasma (C<sub>max</sub>), ya que es un límite actualmente utilizado para la evaluación de la seguridad en la industria farmacéutica y un valor razonable de dosificación aguda para diferenciar los fármacos tóxicos frente a los seguros. (Tabla 2 del Anexo I).

### 3 Resultados

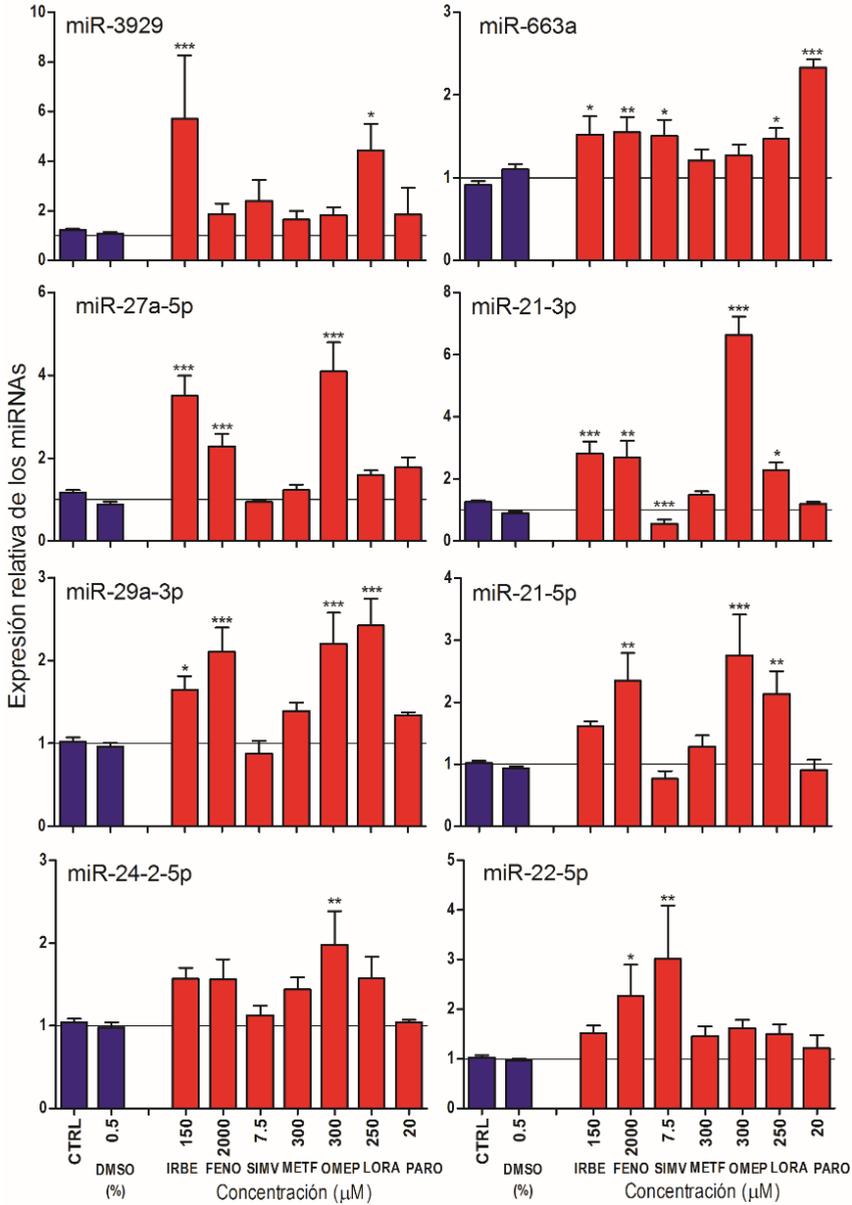


*Figura 3.7: Curvas de citotoxicidad de algunos fármacos para SM en células HepG2 mediante el ensayo MTT. Las células HepG2 fueron sembradas en placas multipocillos e incubadas durante 24h con concentraciones crecientes de los fármacos. Las concentraciones subcitotóxicas seleccionadas (flechas azules) se obtuvieron de las curvas dosis-respuesta.*

Los experimentos *in vitro* se realizaron en células HepG2 expuestas durante 24 horas a los tratamientos seleccionados. Muchos de los compuestos ensayados no tuvieron efecto en el nivel de expresión de los miRNAs biomarcadores o no fue significativo. Así, prácticamente el 60% de los compuestos quedaron descartados para los próximos ensayos, y se concluye que su potencial esteatósico es mínimo o nulo (Figura 1 del Anexo I).

Sin embargo, se observó que SIMV, METF, PARO, y particularmente, IRBE, FENO, OMEP y LORA indujeron significativamente muchos de los miRNAs identificados previamente en asociación con la esteatosis iatrogénica (Figura 3.8).

### 3 Resultados



**Figura 3.8:** Algunos fármacos comunes prescritos en pacientes con EHGNA y SM inducen los mismos miRNAs que los fármacos esteatósicos modelo. Las células HepG2 se trataron con concentraciones subcitotóxicas de IRBE, FENO, SIMV, METF, OMEP, LORA y PARO durante 24h. Los niveles intracelulares de los miRNAs se analizaron por RT-qPCR. Las barras representan la media ± SEM (n=3-4). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ANOVA, Tukey post hoc.

### **3 Resultados**

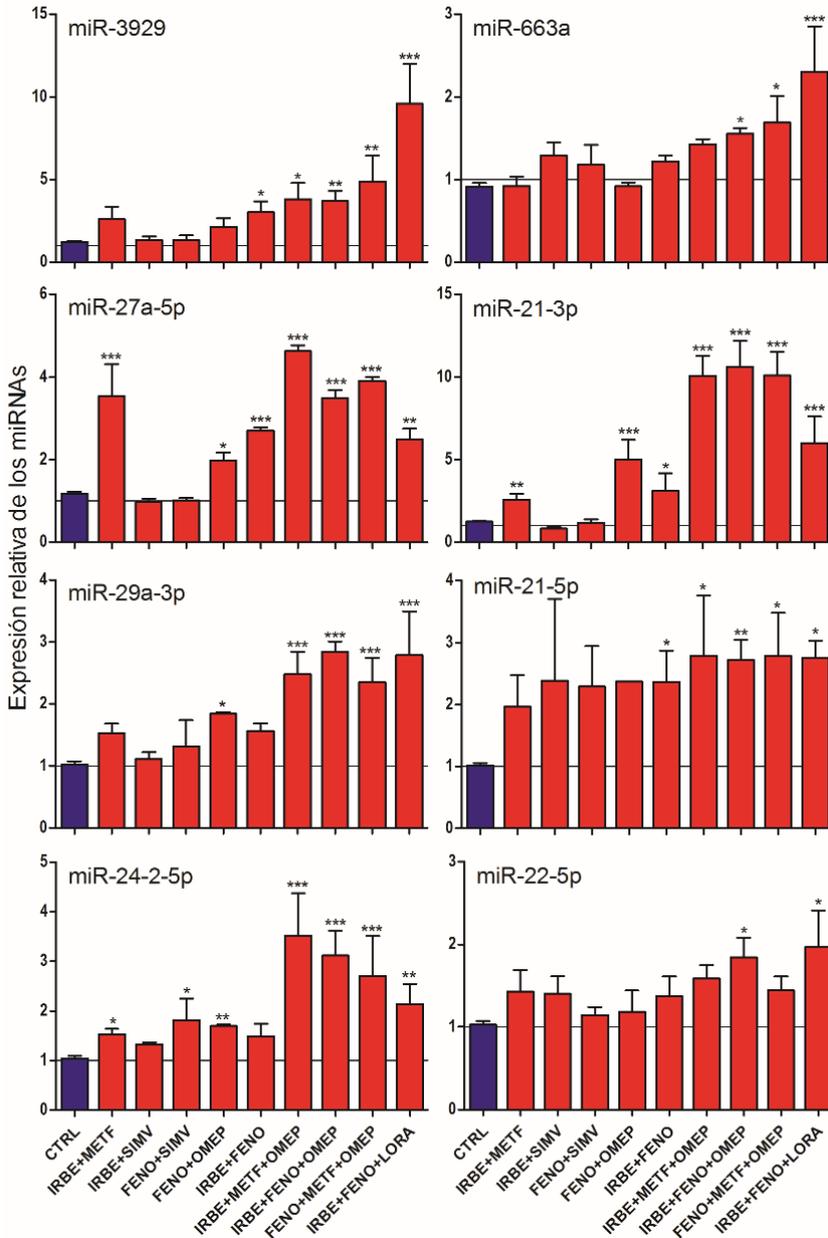
No todos los miRNAs respondieron igual a los tratamientos. Podemos ver como hay miRNAs alterados significativamente por hasta 4-5 de los 7 compuestos (miR-29a-3p y miR-663a) mientras que otros miRNAs se vieron afectados por menos fármacos (miR-3929, miR-27a-5p o miR-21-3p) (Fig.3.8).

#### **3.6 Las combinaciones de fármacos para SM potencian la inducción de los miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica.**

A la mayoría de los pacientes medicados con estos compuestos se les prescribe una combinación terapéutica para tratar las diferentes manifestaciones del SM. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue investigar si la exposición a combinaciones de estos fármacos tiene efectos distintos sobre los niveles de expresión de los miRNAs.

Los cultivos de células HepG2 fueron expuestos durante 24 horas a combinaciones de 2 o 3 de los 7 fármacos seleccionados en los ensayos anteriores. Primero se comprobó mediante ensayos de MTT que estas combinaciones no afectaban a la viabilidad celular (Figura 2 del Anexo I). Los análisis por RT-qPCR de los niveles intracelulares de los miRNAs concluyeron que las combinaciones farmacológicas que incluían FENO, IRBE, OMEP, LORA o METF fueron capaces de inducir todos los miRNAs propuestos como biomarcadores (Figura 3.9). Se observó como en las combinaciones formadas por 3 compuestos, prácticamente todos los miRNAs estudiados resultaron significativamente inducidos. Es decir, en individuos polimedcados con tratamientos diarios de entre 3 a 5 fármacos, el potencial esteatósico de cada uno tendría un efecto aditivo y el riesgo de padecer esteatosis iatrogénica se multiplica.

### 3 Resultados



**Figura 3.9:** Los miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica son inducidos por combinaciones de fármacos comúnmente prescritos en pacientes con EHGNA y SM. Las células HepG2 fueron expuestas a combinaciones (2 o 3) de los 7 fármacos de SM seleccionados. Las concentraciones en las combinaciones fueron las mismas seleccionadas para los ensayos individuales. Los niveles intracelulares

### **3 Resultados**

de los miRNAs se analizaron por RT-qPCR. Las barras representan la media  $\pm$  SEM ( $n=3-4$ ). \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , ANOVA, Tukey post hoc.

Los resultados demuestran que las combinaciones de algunos fármacos que se prescriben comúnmente a pacientes con SM (antihipertensivos, antidiabéticos...) inducen los mismos miRNAs que los fármacos esteatósicos modelo, por lo que podrían contribuir significativamente a la aparición y progresión del hígado graso en estos pacientes.

#### **3.7 Algunos fármacos comúnmente prescritos para el SM inducen la acumulación de lípidos en células HepG2**

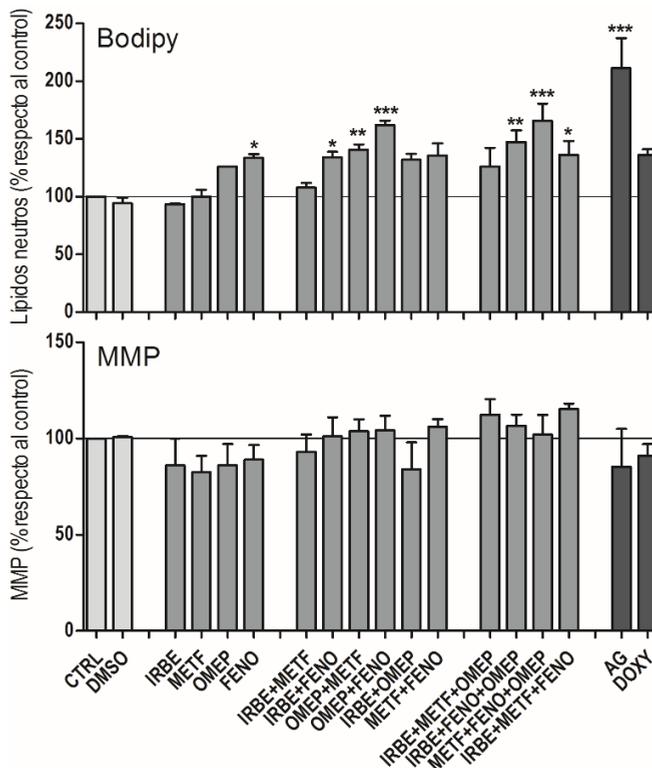
Dadas las semejanzas entre fármacos esteatósicos modelo y fármacos para SM en cuanto a su efecto en los miRNAs, el siguiente objetivo que nos propusimos, fue comprobar si los fármacos prescritos para el SM eran también capaces de inducir la acumulación de grasa en células hepáticas humanas cultivo.

Los análisis de *High Content Screening* (HCS), con la sonda BODIPY 493/503 que cuantifica el contenido de lípidos neutros, demostraron que la fluorescencia se incrementó moderadamente cuando las células HepG2 se incubaron con FENO, IRBE, OMPE y METF, pero el aumento fue mucho más significativo cuando los compuestos estaban combinados (Figura 3.10 A y B). De hecho, se observó que la acumulación de lípidos observada en estas condiciones fue incluso mayor que la inducida por DOXY, un compuesto esteatósico modelo (Fig- 3.10-A y B).

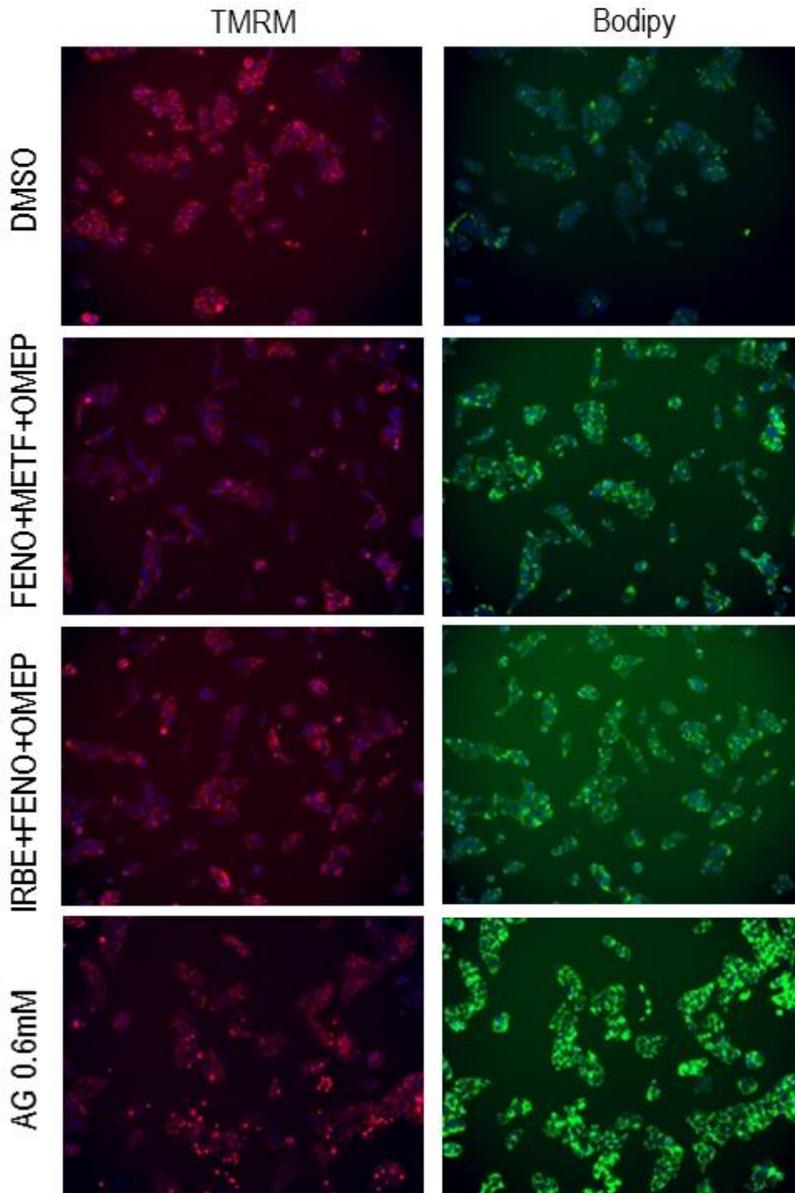
La mitocondria es una diana frecuente de los compuestos citostáticos. Una disminución del potencial de membrana mitocondrial

### 3 Resultados

(MMP) puede desencadenar la producción de ROS, el desequilibrio energético, la pérdida en la homeostasis del calcio y finalmente la apoptosis celular. Sin embargo, los fármacos de nuestros ensayos no afectaron al MMP (medido por la fluorescencia de la sonda TMRM), lo que además corrobora que las concentraciones subcitotóxicas seleccionadas para los tratamientos *in vitro* no afectan la función mitocondrial.



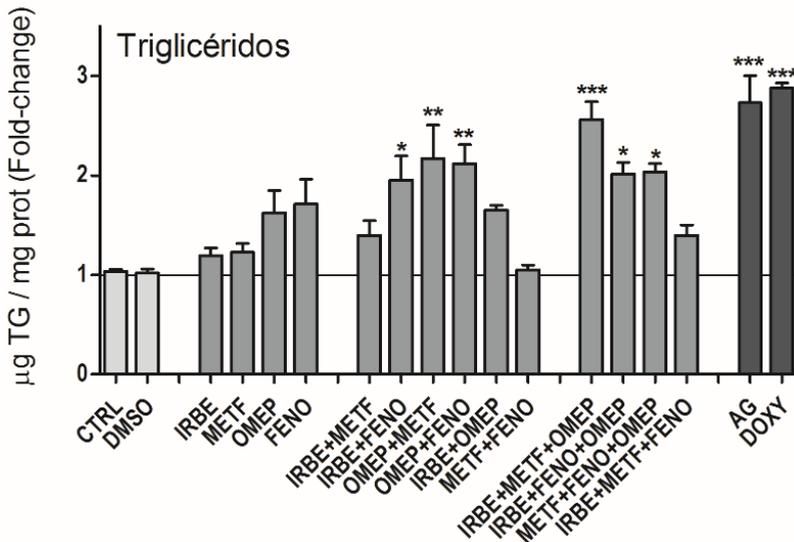
**Figura 3.10-A: Algunos fármacos comunes en pacientes con EHGNA y SM inducen la acumulación de lípidos en cultivos de células hepáticas humanas.** Las células HepG2 en placas de 96 pocillos fueron tratadas con IRBE, METF, OMEP y FENO individualmente o en combinaciones (2 o 3) durante 24 horas. El contenido en lípidos neutros (BODIPY 493/503) y el MMP (TMRM) fueron cuantificados mediante HCS. Las barras representan la media  $\pm$  SEM ( $n=3-4$ ). \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , ANOVA, Tukey post hoc.



*Figura 3.10-B: Algunos fármacos comunes en pacientes con EHGNA y SM inducen la acumulación de lípidos en cultivos de células hepáticas humanas. Las imágenes representativas del HCS muestran la fluorescencia de las distintas sondas: BODIPY 493/503 (lípidos neutros, verde), Hoechst 33342 (núcleo, azul) y TMRM (potencial de membrana mitocondrial, rojo).*

### 3 Resultados

Los TG son los lípidos neutros que mayoritariamente esperamos que se acumulen a causa de los compuestos esteatóxicos. Sin embargo, hay otros lípidos (por ejemplo, ésteres de colesterol) que también pueden teñirse con la sonda BODIPY 493/503. Por ello, se midieron también los niveles intracelulares de TG enzimáticamente, en cultivos expuestos a las mismas condiciones experimentales. Los resultados obtenidos concuerdan con los niveles de lípidos neutros cuantificados por HCS y de nuevo, la máxima acumulación de TG se observó con las coincubaciones de los compuestos, aunque en este caso la respuesta a DOXY fue la más significativa (Figura 3.11). Estos resultados indican que la mayoría de los lípidos neutros que acumulan las células a causa de la exposición a FENO, IRBE, OMPE y METF son TG.



**Figura 3.11: Acumulación principalmente de TG por parte de los fármacos del SM en células hepáticas humanas en cultivo.** Las células HepG2 en placas de 6 cm  $\emptyset$  fueron expuestas a los mismos compuestos y concentraciones citadas en la Fig.3.10. El contenido intracelular de TG se cuantificó enzimáticamente. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=3-4). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ANOVA, Tukey post hoc.

### **3 Resultados**

La investigación desarrollada ha permitido identificar un pequeño grupo de miRNAs cuya expresión ha sido inducida por fármacos esteatósicos modelo en HepG2 y hepatocitos humanos. Además, estos miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica también respondieron a fármacos prescritos comúnmente para el SM; fármacos que por otra parte indujeron esteatosis *in vitro*.

Teniendo en cuenta estos resultados, podemos pensar que, en los pacientes con EHGNA, el tratamiento con una combinación de fármacos para el SM tales como fibratos (FENO), antihipertensivos (IRBE) y antidiabéticos (METF), junto con inhibidores de la bomba de protones (OMEP) y/o benzodiazepinas (LORA), podría contribuir en mayor o menor medida a la esteatosis y a la progresión de la enfermedad hepática. Los miRNAs biomarcadores que hemos descubiertos *in vitro* serían muy útiles para diagnosticar esta esteatosis iatrogénica, pero para probar su utilidad como biomarcadores *in vivo* sería necesaria una validación en pacientes. Sin embargo, encontrar un grupo de pacientes con EHGNA que tomen un fármaco en concreto y otro grupo comparable de pacientes que no lo tomen, es prácticamente imposible, ya que esta población es muy heterogénea, existen diversos grados y estadios de progresión, y la mayoría de los pacientes están polimedicados, lo que no permitiría saber a ciencia cierta cuál es el agente causal. La relevancia clínica de estos biomarcadores queda, por lo tanto, por demostrar a la espera de disponer de una cohorte de estudio adecuada.

#### **3.8 Los miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica regulan mRNA relacionados con el metabolismo lipídico**

Una última cuestión que queda por resolver es si estos miRNAs juegan algún papel en la etiología de la esteatosis o si su alteración por fármacos es un epifenómeno. Los miRNAs son reguladores post-transcripcionales de la expresión génica, lo que nos llevó a preguntarnos cuales serían sus mRNA diana y que rutas metabólicas estarían afectadas.

Para ello, se estudió la función específica de estos miRNAs mediante ensayos de transfección de RNAi. Centramos nuestra atención en el miR-29a-3p por una serie de motivos. En primer lugar, porque, aunque la inducción de su expresión tanto por los fármacos esteatóticos modelo (Fig. 3.4) como por los fármacos prescritos para el SM (Fig.3.8 y Fig.3.9) no es de las más significativas en cuanto a magnitud (1,7-*fold* con CYCA; 2,5-*fold* con LORA y rozando el 4-*fold* con las asociaciones de compuestos), son resultados más reproducibles y presentan mejor significación estadística que otros miRNAs con inducciones de mayor magnitud. En segundo lugar, el miR-29a-3p maduro (UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA) es la hebra guía, abundante y conservada, del pre-miRNA, y su detección es más sensible y robusta tanto en muestras celulares (Ct en HepG2: 25) como en muestras séricas humanas (Ct: 31.5). Por último, aunque ya hay estudios que demuestran la asociación de este miRNA con genes y vías del metabolismo lipídico, como las mediadas por SIRT1 o PIK3R1 en la vía de señalización por insulina o la de HMGCS2 en la biosíntesis de los cuerpos cetónicos (203-205), creemos que aún hay mRNAs diana regulados por este miRNA que no han sido estudiados.

### **3 Resultados**

Primero se realizó una búsqueda de posibles candidatos de genes diana del miR-29a-3p en cuatro bases de datos distintas: TargetScan 7.0, miRDB, miR Walk y DIANA Tools. Tras un análisis comparativo entre las cuatro listas que se realizó con el software *Venny 2.0* del CNB-CSIC, sólo 121 genes se encontraron en común en todas ellas.

A continuación, se realizó una selección entre los posibles mRNA diana, para proceder a analizar su respuesta a miR-29a-3p. Esta selección (Tabla 3.1) incluyó tanto genes que ya habían demostrado su respuesta a este miRNA (que nos sirvieron como controles positivos) como genes no estudiados todavía, pero con un potencial mecánico destacable por las rutas en las que están implicados.

**Tabla 3.1: Posibles mRNA diana del miR-29a-3p.**

<b>Gen ID</b>	<b>Rutas implicadas</b>
HMGCS2	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2</i> Control positivo
SREBP1c	<i>Sterol regulatory element-binding transcription factor 1</i> Control positivo
SIRT-1	<i>sirtuin 1</i> Control positivo
PIK3R1	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i> Control positivo
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i> Control positivo
INSIG1	<i>insulin induced gene 1</i> Señalización SREBP
HMGCS1	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1</i> Señalización SREBP - Homeostasis colesterol-lípidos
LPL	<i>lipoprotein lipase</i> Señalización SREBP
AKT3	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3</i> Señalización mTOR
IGF1	<i>insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)</i> Señalización PI3K-Akt, mTOR, SHP2, FoxO y HIF-1
HNF4G	<i>Hepatocyte nuclear factor 4 gamma</i> Factor de transcripción: biología de desarrollo,

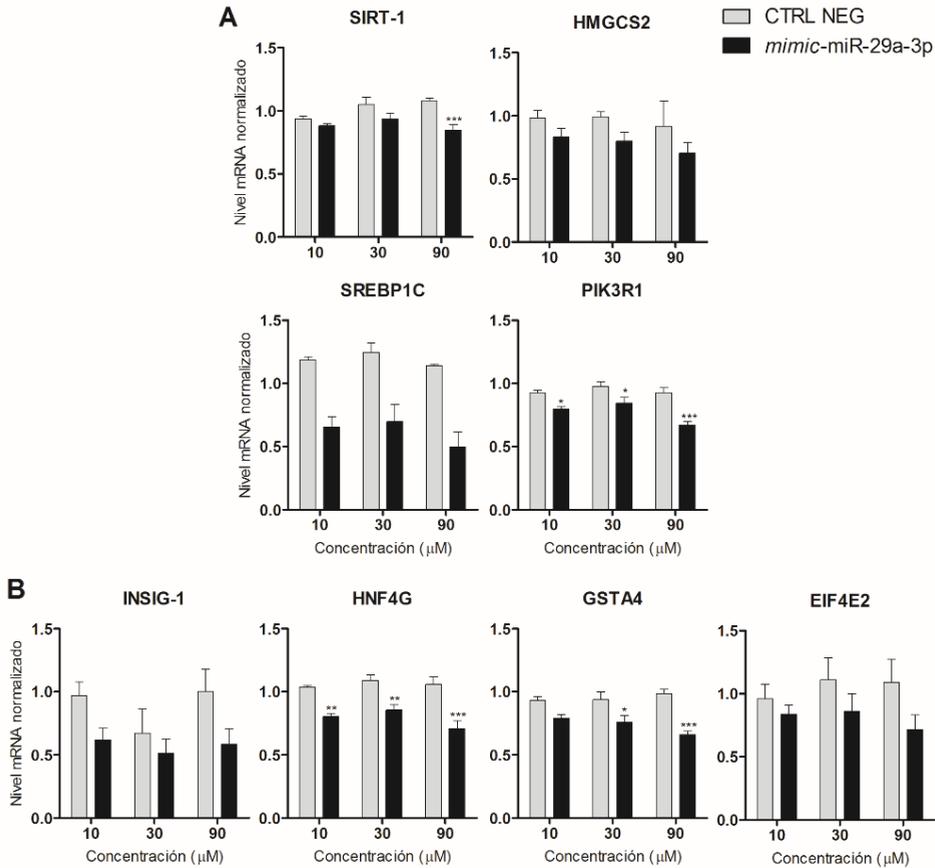
### 3 Resultados

		expresión génica y desarrollo de células $\beta$ ...
ERLIN2	<i>ER lipid raft associated 2</i>	Homeostasis del colesterol mediante la vía SREBP
GSTA4	<i>glutathione S-transferase alpha 4</i>	Detoxificación y metabolización de los productos resultantes de la peroxidación lipídica, xenobióticos...
EIF4E2	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E family member 2</i>	Señalización HIF-1, mTOR y PI3K-Akt
IRS-1	<i>insulin receptor substrate 1</i>	Señalización IGF-1, PI3K-Akt, MAP quinasas

Los cultivos de HepG2 se transfectaron durante 48 horas con los RNAi *mimic* del miR-29a-3p o con un control negativo. También se realizó ensayos de pérdida de función del miRNA mediante transfecciones con un RNAi *antimir* del miR-29a-3p, pero no hubo cambios significativos en la expresión de los genes diana (datos no mostrados).

Los análisis por RT-qPCR del nivel de expresión intracelular de los mRNA diana candidatos mostraron una inhibición de la expresión dosis-dependiente por el RNAi *mimic* (Figura 3.12). Las inhibiciones más significativas se apreciaron a la dosis más alta del RNAi (90nM), pero, la expresión de ningún mRNA fue inhibida más de un 40-50%. Tanto SIRT1, HMGCS2, SREBP1c y PIK3R1 (Fig.3.12-A) son genes diana del miR-29a, cuya asociación ya se ha estudiado (203, 204, 206), mientras que de los otros cuatro genes no hay datos previos que los asocien al miR-29a-3p y podrían considerarse para estudios más específicos en el futuro (Fig.3.12-B).

### 3 Resultados



**Figura 3.12: Represión dosis-dependiente de mRNAs diana mediada por un RNAi mimic del miR-29a-3p.** Las células HepG2 fueron transfectadas con diferentes concentraciones de dos RNAi: un control negativo (barras grises) y un mimic-miR-29a-3p (barras negras) durante 48h. Las transfecciones se realizaron con Lipofectamina RNAiMAX. El nivel de expresión intracelular de cada mRNA (controles positivos (**panel A**) o posibles genes diana (**panel B**)) se analizó por RT-qPCR y se normalizó con el promedio de dos genes: GAPDH y  $\beta$ -actina. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=4). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , Two-way ANOVA.

A continuación, se hizo un estudio del sitio de unión del miRNA en la secuencia de cada mRNA (Tabla 3.2). Los ocho mRNAs del estudio presentaron un solo sitio de unión para el miRNA en la región 3'UTR. La mayoría de las uniones de la secuencia *seed* del miRNA con su zona

### **3 Resultados**

complementaria dentro de la secuencia del mRNA resultaron muy estables: uniones 8-mer (7 bases complementarias + la última “A” en 5’) o uniones 7mer-m8 (7 bases complementarias).

En resumen, tras la identificación de una serie de miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica en cultivos celulares, los ensayos para estudiar la función específica de uno de ellos no obtuvieron los resultados esperados. Los ensayos de pérdida de función no funcionaron, probablemente porque el *antimir* sólo bloqueaba el miR-29a, pero no a otros miembros de la familia miR-29. Sin embargo, los niveles de expresión de los mRNAs identificados como posibles mRNA diana del miR-29a-3p si fueron inhibidos en los estudios de ganancia de función con el *mimic*, pero fueron cambios muy modestos, posiblemente porque la concentración intracelular del miR-29a ya es elevada, y quizás saturante para algunos mRNAs diana, por lo que su sobreexpresión sólo tuvo efectos limitados.



## **Capítulo 2: Búsqueda de miRNAs biomarcadores de esteatosis metabólica. Análisis comparativo del rendimiento predictivo entre miRNAs biomarcadores y biomarcadores clínicos**

Debido a la alta prevalencia de la EHGNA asociada al SM (metabólica) su estudio a nivel clínico es más factible.

En este contexto uno de los objetivos que nos planteamos fue reexaminar el valor predictivo para esteatohepatitis y fibrosis grave de todos los miRNAs postulados hasta la fecha como biomarcadores séricos (incluyendo los identificados en nuestros estudios de esteatosis iatrogénica) y comparar su rendimiento predictivo con los biomarcadores clínicos analíticos convencionales, en una cohorte de pacientes con EHGNA diagnosticados mediante biopsia hepática.

### **3.9 Búsqueda de miRNAs identificados previamente como biomarcadores en pacientes de EHGNA**

En primer lugar, se realizó una búsqueda bibliográfica para encontrar todos los estudios realizados hasta la fecha en los que se haya investigado el papel de los miRNAs circulantes como biomarcadores predictivos en la EHGNA. Esto es, miRNAs séricos que se asocian o correlacionen con la enfermedad o el grado de gravedad de la misma (por ejemplo, EHNA y fibrosis). En total encontramos 14 estudios, siendo el más antiguo del año 2011 (Tabla 4 del Anexo I). Se descartaron los estudios en modelos animales y aquellos en los que los miRNAs se analizaron sólo en muestras de hígado humano. Además, tampoco consideramos estudios que investigasen la asociación de miRNAs circulantes con una característica clínica específica de los pacientes de

### **3 Resultados**

EHGNA, como la enfermedad coronaria arterial o la obesidad (207). De los 14 estudios, sólo tres realizaron descubrimiento de *novo* de miRNAs (basados en *arrays* de expresión o en secuenciación masiva) (174, 208, 209). Mientras que en todos los demás, los miRNAs estudiados se seleccionaron de acuerdo a su relevancia en rutas relacionadas con la patología o a descubrimientos previos en tejido hepático o en modelos de EHGNA (por ejemplo, modelos *in vitro*). Además, cuatro de los estudios se centraron en el estudio de un solo miRNA preseleccionado (179, 210-212). Y en sólo tres estudios el diagnóstico de la enfermedad no se comprobó con una biopsia hepática (208, 211, 213).

Los 14 estudios seleccionados defendían un total de 18 miRNAs significativamente alterados en pacientes de EHGNA o en los grupos de EHNA o fibrosis grave (Tabla 4 del Anexo I). Cinco de los miRNAs estaban presentes en más de un estudio: miR-122 (n=11), miR-34 (n=5), miR-192 (n=4), miR-21 (n=3) y miR-16 (n=2), mientras que los otros 13 miRNAs sólo estaban descritos en un estudio: miR-451, miR-1290, miR-27b, miR-181d, miR-99a, miR-197, miR-146b, miR-375, miR-331, miR-30c, miR-22, miR-29a y miR-663a. Nuestro siguiente objetivo fue analizar estos miRNAs en una cohorte independiente para demostrar o rechazar su validez.

#### **3.10 Características de la población de estudio**

Nuestra cohorte de validación incluyó 75 pacientes diagnosticados de EHGNA (25 casos con EHGNA no avanzada (HGNA) y 50 casos de EHNA) mediante una biopsia y 17 controles sin EHGNA. Las características basales de los grupos se detallan en la Tabla 3.3. La

### **3 Resultados**

población de estudio se encontraba dentro del rango de sobrepeso-obesidad (IMC=25-35), con un 60% de mujeres y una edad promedio de 52 años. Entre el grupo control con hígado normal (HN) y el grupo con enfermedad leve (HGNA) hubo pocas diferencias, (sólo la edad y la glucosa plasmática mostraron diferencias estadísticamente significativas). Sin embargo, entre el grupo control y el grupo con enfermedad grave (EHNA) se observaron bastantes diferencias, incluyendo la edad, la glucosa, los TG y la AST y ALT (Tabla 3.3).

En cuanto a la histología de las biopsias de los pacientes, el grado de esteatosis se evaluó según la escala de Brunt (141). La gravedad de la enfermedad para cada sujeto se diagnosticó de acuerdo con dos sistemas de puntuación: el más antiguo, el *NAS score* y más recientemente el *SAF score*. En cuanto al grado de fibrosis se categorizó en cuatro estadios, desde el más leve (F1) al más grave o cirrosis (F4). Según la interpretación de las biopsias por parte del hepatopatólogo, el 24% de los pacientes presentaba esteatosis pura, un 28% esteatosis con balonización moderada y un 48% de pacientes presentaban esteatosis con inflamación lobulillar moderada. Cuatro pacientes de HGNA presentaban fibrosis, pero en su estadio más leve (F1). Como era de esperar, los pacientes con EHNA mostraron unas características histológicas mucho más graves que los otros dos grupos (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3: Características basales de la cohorte de estudio EHGNA.**

	<b>HN (n=17)</b>	<b>HGNA (n=25)</b>	<b>EHNA (n=50)</b>	
Edad (años)	42,9 ± 9,3	51,6 ± 10,4	57,4±10,4	<b>a,b</b>
Sexo				
Hombres	7 (41,2%)	11 (44%)	19 (38%)	
Mujeres	10 (58,8%)	14 (56%)	31 (62%)	

### 3 Resultados

IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26,2 ± 3,6	29,6 ± 5,2	32,4 ± 4,6	<b>b</b>
Perímetro cintura (cm)	nd	99,8 ± 17,0	107,5 ± 11,1	<b>c</b>
Glucosa (mg/dL)	89,9 ± 10,7	118,1 ± 39,7	126,7 ± 62,3	<b>a,b</b>
TG (mg/dL)	106,7 ± 36,3	126,3 ± 66,3	190,8±104,4	<b>b,c</b>
Colesterol total (mg/dL)	203,7 ± 37,4	202,6 ± 43,6	199 ± 39,2	
Colesterol-HDL (mg/dL)	55,0 ± 18,2	52,5 ± 11,2	45,6 ± 13,4	
Colesterol-LDL (mg/dL)	128,1 ± 34,7	123,7 ± 41,5	122,9 ± 33,7	
Bilirrubina total (mg/dL)	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,3	
Albúmina (g/dL)	4,5 ± 0,5	4,6 ± 0,3	4,6 ± 0,3	
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	245,2 ± 75,1	260,1 ± 74,2	218,4 ± 66,5	<b>c</b>
ALT (IU/L)	29,8 ± 16,7	51,8 ± 32,1	64,7 ± 52,6	<b>b</b>
AST (IU/L)	26,0 ± 8,8	36 ± 15,1	54,6 ± 35,4	<b>b,c</b>
γ-GT (IU/L)	50,8 ± 51,4	134±144,8	122,8±128,1	
FA (IU/L)	86,1 ± 32,7	106,4 ± 48,2	95,4 ± 35,5	
Protrombina (seg)	14,6 ± 2,1	14,1 ± 1,4	14 ± 1,6	
Hb (g/dL)	13,9 ± 0,9	14,7 ± 1,2	14,4 ± 1,1	
Saturación Transferrina (%)	27,2 ± 9,6	26,8 ± 11,7	28,1 ± 11,0	
Ferritina (μg/L)	66,8 ± 54,7	113,1 ± 58,7	283,8±325,7	<b>b,c</b>
HbA1C (%)	nd	6,4 ± 1,4	6,5 ± 1,3	
Insulina (μU/mL)	nd	17,4 ± 11,1	32,5 ± 37,3	<b>c</b>
HOMA	nd	4,7 ± 3,6	11,2 ± 16,9	<b>c</b>

#### HISTOLOGIA

Esteatosis (%)				***
Grado 0				
Grado 1		20 (80%)	4 (8%)	
Grado 2		3 (12%)	23 (46%)	
Grado 3		2 (8%)	23 (46%)	
Balonización (%)				***
No (0)		18 (72%)		
Moderada (1)		7 (28%)	20 (40%)	
Grave (2)			30 (60%)	
Inflamación Lobular (%)				***
No (0)		13 (52%)	1 (2%)	
Moderada (1)		12 (48%)	35 (70%)	
Grave (2)			14 (28%)	

### 3 Resultados

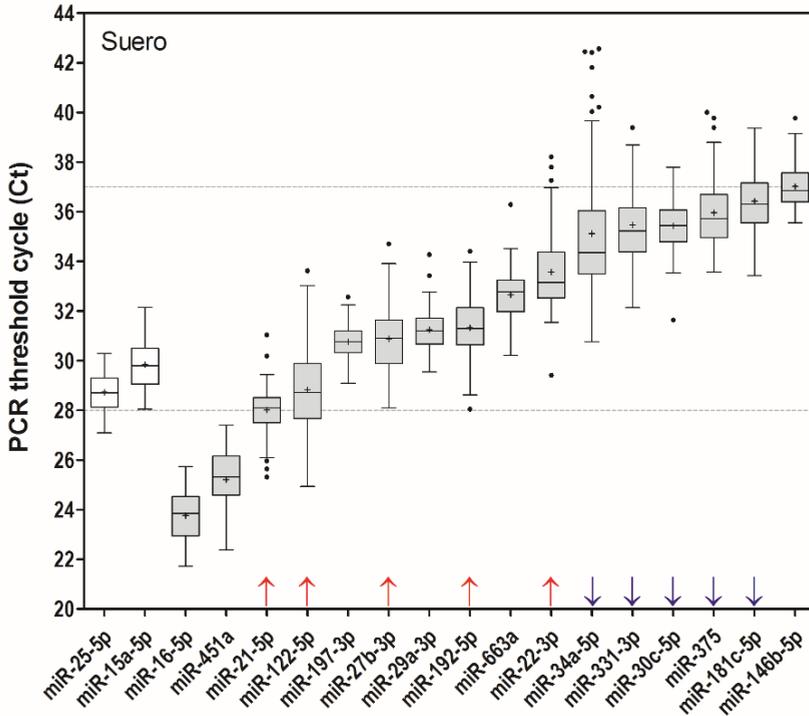
Fibrosis (%)				***
Estadio 0		21 (84%)	4 (8%)	
Estadio 1		4 (16%)	9 (18%)	
Estadio 2			8 (16%)	
Estadio 3			16 (32%)	
Estadio 4			13 (26%)	
<b>SCORES</b>				
NAS (%)				***
NAS_0-2		19 (76%)		
NAS_3-4		6 (24%)	12 (24%)	
NAS_5-8			38 (76%)	
SAF Activity				***
A_0-1		25 (100%)		
A_2-3-4			50 (100%)	
NAFLD fibrosis score				***
< -1.455	15 (88,2%)	15 (60%)	18 (36%)	
-1.455/-0.675		6 (24%)	4 (8%)	
-0.675/0.676	2 (11,8%)	4 (16%)	19 (38%)	
> 0.676			9 (18%)	
FIB-4				***
< 1.30	14 (82,4%)	17 (68%)	16 (32%)	
>1.30	3 (17,6%)	8 (32%)	34 (68%)	
APRI				**
< 1	17 (100%)	24 (96%)	35 (70%)	
>1		1 (4%)	15 (30%)	
BARD				
< 2	4 (23,5%)	8 (32%)	10 (20%)	
≥ 2	13 (76,5%)	16 (64%)	40 (80%)	

Los datos se muestran como media ± desviación estándar o como el número de casos y porcentajes (%). HN, hígado normal; HGNA, hígado graso no alcohólico; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica; IMC, índice de masa corporal; TG, triglicéridos; HDL, lipoproteína de alta densidad; ALT, alanino aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa;  $\gamma$ -GT, gamma-glutamilttransferasa; FA, fosfatasa alcalina; Hb, hemoglobina; HbA1C, hemoglobina glicosilada; HOMA, "homeostatic model assessment"; APRI, "AST to platelet ratio index"; FIB-4, fibrosis-4; nd, no determinado. **a** HN vs HGNA, **b** HN vs EHNA, **c** HGNA vs EHNA,  $p < 0,05$  (ANOVA o t-test); \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (Chi-square).

### **3.11 Nivel de expresión sérico de los miRNAs postulados previamente y su relación con el nivel de expresión en hígado**

La primera condición que tienen que cumplir los miRNAs para ser considerados unos buenos biomarcadores es que se puedan cuantificar de forma fiable en los fluidos corporales (por ejemplo, ciclos  $\leq 36-38$ ), porque la exactitud, la reproducibilidad y la precisión disminuyen cuando los cambios se detectan a ciclos de PCR muy elevados. Para ello, desarrollamos una RT-qPCR específica para los 18 miRNAs identificados en los estudios previos que se seleccionaron y se analizó su nivel sérico en la cohorte de estudio (Figura 3.13). En nuestras condiciones experimentales, dos de los miRNAs postulados en los estudios (miR-99a y miR-1290) no pudieron ser detectados o se detectaron en muy pocas muestras y con unos Ct (*PCR threshold cycle*) muy elevados. Lo mismo ocurrió con algunos de los miRNAs postulados por nosotros a partir de ensayos *in vitro* como biomarcadores de esteatosis por fármacos (por ejemplo, miR-21-3p y miR-3929). Sin embargo, 16 miRNAs se detectaron de forma fiable (Ct<38) en prácticamente toda la cohorte (>90% de los sujetos). La mayoría de los miRNAs se detectaron en el rango entre Ct: 28-37, lo que indica diferencias en la concentración sérica de los miRNAs de hasta 500 veces. El miR-34a, el segundo más estudiado después del miR-122, resultó tener concentraciones en suero muy bajas (sobre todo en sujetos sanos), mientras que los miR-16 y miR-451a fueron los más abundantes en suero humano. Como esperábamos, los dos miRNAs que se utilizaron en la normalización de los resultados (miR-15a-5p y miR-25-5p) mostraron una abundancia adecuada en suero, pero,

sobre todo una menor variabilidad respecto a los otros (rango intercuartil) (Fig.3.13).



**Figura 3.13: Expresión de miRNAs asociados a EHGNA en sueros humanos.** El RNA total se purificó de 92 muestras de suero humano y se analizaron 18 miRNAs por RT-qPCR. Los resultados están representados como Ct en diagramas de cajas con bigotes que incluyen a los valores dentro del percentil 75/25  $\pm$  1,5 IQR (rango intercuartil). Los datos fuera de este rango se representan individualmente (Boxplot Tukey). Las líneas de puntos horizontales en los ciclos 28 y 37 delimitan los niveles de expresión del suero para la mayoría de los miRNAs analizados. Las flechas rojas sobre el eje X indican los miRNAs con una expresión alta en hígado y las azules aquellos con expresión hepática más baja.

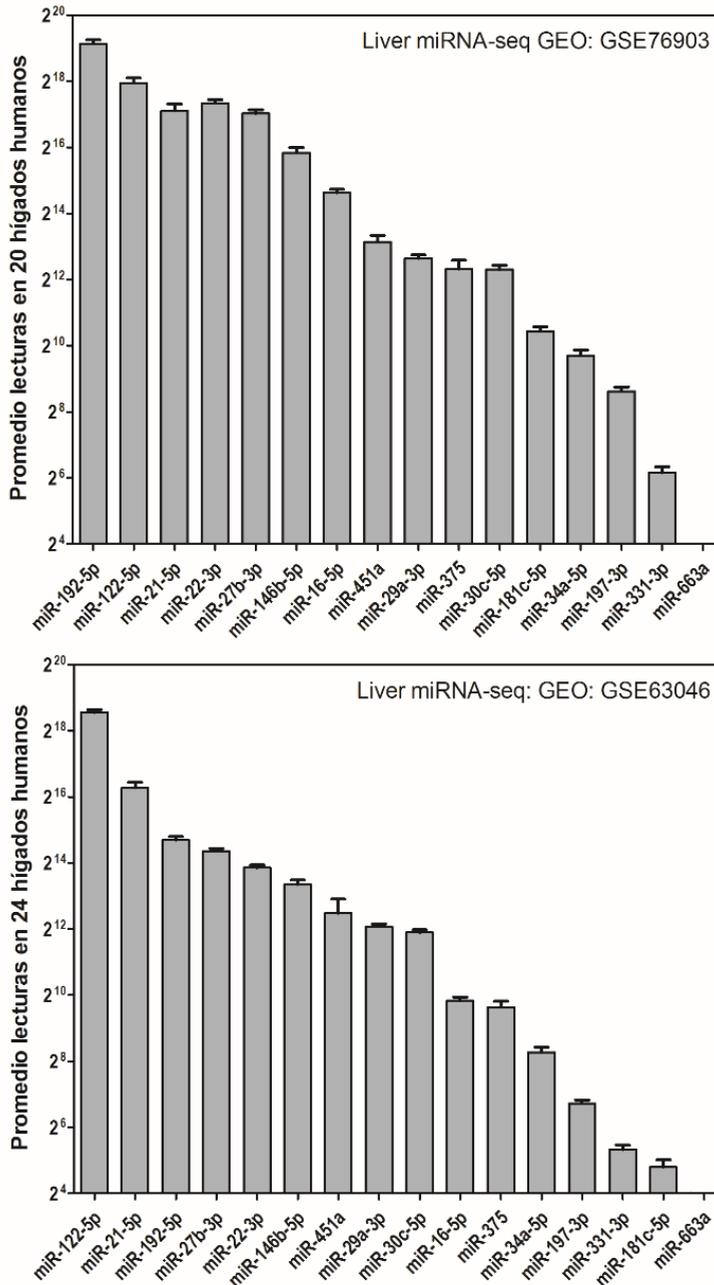
La secuenciación de RNAs de pequeño tamaño permite definir el miRNoma del hígado humano y categorizar los miRNAs según su abundancia en el tejido. Hemos extraído las lecturas de secuenciación normalizadas de los 16 miRNAs de nuestro estudio en 24+20 muestras de

### **3 Resultados**

tejido hepático humano sano depositadas en la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO) (GSE76903 (214) y GSE63046 (215)). Los resultados indican que, de entre los miRNAs del estudio, los más abundantes en el hígado humano son miR-122, -192, -21, -22, -27a y -146b, mientras que los menos representativos son miR-331, -197, -34a, -181c, -30c y -375 (Figura 3.14). Además, no se registraron lecturas significativas para el miR-663a en hígado humano (214, 215), aunque sí que se ha detectado su expresión en células de hepatoma humano (216).

Si comparamos estos resultados con los mostrados anteriormente en la Fig. 3.13, observamos que la mayoría de los miRNAs con una expresión abundante en hígado se detectaron a Ct bajos en suero (flechas rojas), mientras que los menos representados en el tejido hepático humano se detectaron en suero a Ct más elevados (flechas azules), lo que indica una buena correlación de las concentraciones de los miRNAs entre hígado y suero. Los dos miRNAs cuyos resultados fueron más discrepantes son el miR-16 y miR-451a (muy abundantes en las muestras de suero, pero no correlaciona con el nivel en tejido), lo que podría explicarse si, además del hígado, hay otros órganos o tejidos que contribuyan significativamente a los niveles circulantes.

### 3 Resultados



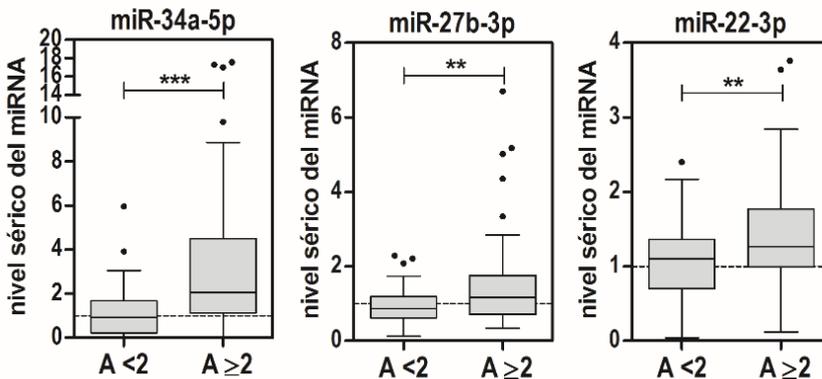
**Figura 3.14:** Expresión de miRNAs asociados a EHGA en hígados humanos. Se buscó en el Repositorio de Expresión Génica Omnibus (GEO) conjuntos de datos de RNA no codificantes de hígados humanos mediante secuenciación de alto rendimiento. Se encontró dos conjuntos de datos, GSE76903 y GSE63046

(Illumina HiSeq) que incluyeron 20 y 24 hígados control respectivamente (tejido normal adyacente a un hepatocarcinoma). Se extrajeron las lecturas de secuenciación normalizadas de los miRNAs asociados con EHGNA, se procesaron como media  $\pm$  SEM y se ordenaron del nivel de expresión hepática más alto al más bajo.

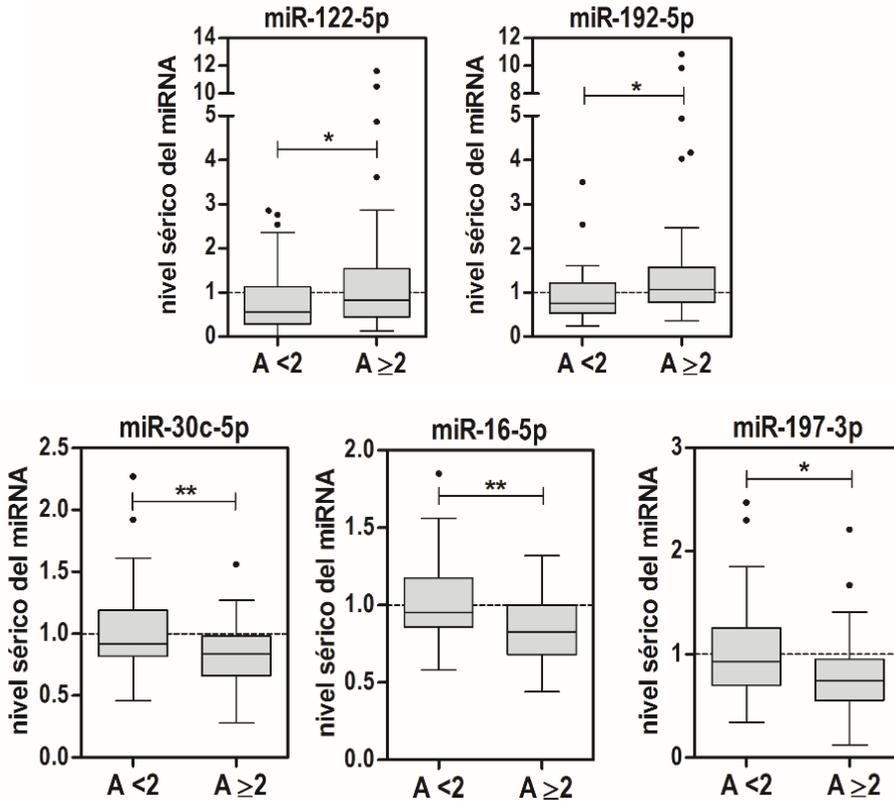
#### **3.12 Validación de los miRNAs como biomarcadores para la esteatohepatitis no alcohólica y la fibrosis avanzada**

Una vez se comprobó que en nuestras condiciones experimentales podíamos ser capaces de detectar de forma fiable a la mayoría de los miRNAs del estudio, el siguiente objetivo fue analizar la concentración sérica de los 16 miRNAs en nuestras cohortes de estudio.

Primero, se agruparon los pacientes según el sistema SAF score, que es la suma del grado de esteatosis en los hepatocitos (S), la actividad (A) y el grado de fibrosis (F). Los pacientes con una enfermedad grave son aquellos con Actividad  $\geq 2$ , siendo la Actividad la suma de los grados de balonización de los hepatocitos (de 0 a 2) y la inflamación lobular (de 0 a 2) (143, 144). Sólo 8 de los 16 miRNAs analizados resultaron significativamente diferentes en pacientes con Actividad  $\geq 2$ , estando cinco de ellos inducidos (miR-34a, -192, -27b, -122 y -22) y tres reprimidos (miR-197, -30c y -16) (Figura 3.15).



### 3 Resultados

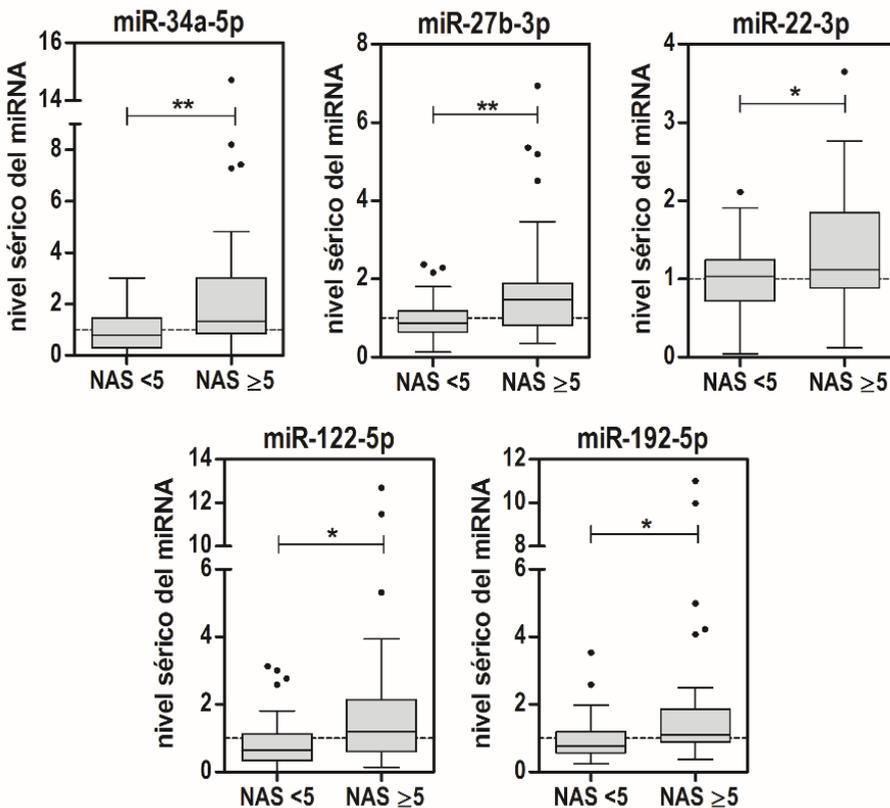


**Figura 3.15: miRNAs séricas alterados significativamente en pacientes de EHGNA con un SAF score elevado.** La cohorte de estudio se dividió en dos grupos de acuerdo con el sistema del SAF score. Cincuenta pacientes fueron clasificados con Actividad  $\geq 2$ . El nivel sérico de cada miRNA individual fue analizado por RT-qPCR y normalizado con la media geométrica del miR-25 y el miR-15a. Los niveles en suero de cinco miRNAs fueron inducidos y tres inhibidos en los pacientes con  $A \geq 2$ . Los datos representan el fold-change del nivel sérico de los miRNAs normalizados. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , t-test.

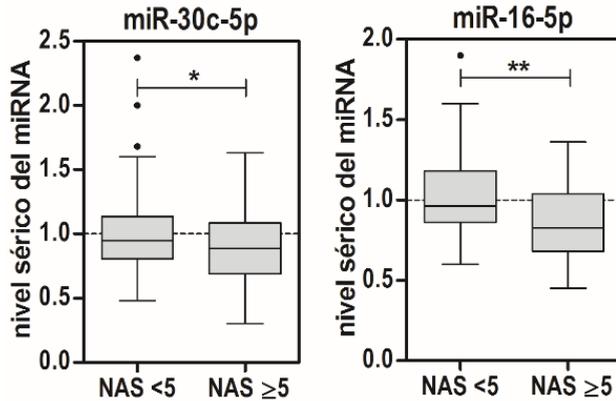
En segundo lugar, analizamos la gravedad según el sistema NAS score (136, 141), donde el valor resulta de la suma de los grados de la esteatosis (de 0 a 3), la inflamación lobular (de 0 a 3) y la balonización hepática (de 0 a 2). Los pacientes que se definen como EHNA según este sistema son aquellos cuya puntuación es mayor o igual a cinco.

### 3 Resultados

Analizamos las diferencias en suero de los miRNAs de nuestro estudio y los resultados indican que, 7 de los 16 miRNAs mostraron alterada su expresión en pacientes con  $NAS \geq 5$ . Los cinco miRNAs inducidos coincidían con los identificados en el grupo de pacientes con Actividad  $\geq 2$ , según el SAF *score* (miR-34a, -192, -27b, -122 y -22). En cuanto a los miRNAs cuya expresión resultó más baja, sólo observamos diferencias significativas para este grupo en el miR-16 y miR-30c (Figura 3.16).



### 3 Resultados



**Figura 3.16: miRNAs séricos alterados significativamente en pacientes de EHGNA con un NAS score elevado.** La cohorte de estudio se dividió en dos grupos de acuerdo con el sistema de NAS score. Treinta y ocho pacientes de EHGNA se clasificaron con un NAS  $\geq 5$ . El nivel sérico de cada miRNA individual fue analizado según lo expuesto en la Fig.3.15. Cinco miRNAs resultaron inducidos y dos inhibidos en pacientes con NAS  $\geq 5$ . Los datos representan el fold-change del nivel sérico de los miRNAs normalizados. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , t-test.

Por último, en cuanto al grado de fibrosis, que se clasifica de 1 a 4 según el grado de tejido cicatricial y disfuncional que haya reemplazado al tejido hepático sano, se considera fibrosis grave cuando  $F > 2$ . En el análisis de los miRNAs, encontramos 4 miRNAs con niveles de expresión sérica diferentes en este grupo de pacientes. Otra vez de nuevo, el nivel sérico del miR-27b fue más elevado en los controles y los de los miR-16 y miR-30c más bajos. Además, en los pacientes con fibrosis grave, los niveles en suero del miR-21 también resultaron inducidos (Figura 3.17). Algunos miRNAs, como el miR-122 o el miR-192, que se encontraban inducidos significativamente en pacientes con SAF score o NAS score elevado, no resultaron inducidos en la fibrosis grave. Los resultados que muestran la Figura 3.17 demuestran que, mientras esos miRNAs tienden a incrementar en estadios intermedios de fibrosis (F1 y F2), sus niveles en

### 3 Resultados

suero caen en los estadios más graves (F3 y F4). Este comportamiento dual evita que se aprecien diferencias significativas en estos dos miRNAs entre F0-2 y F3-4.

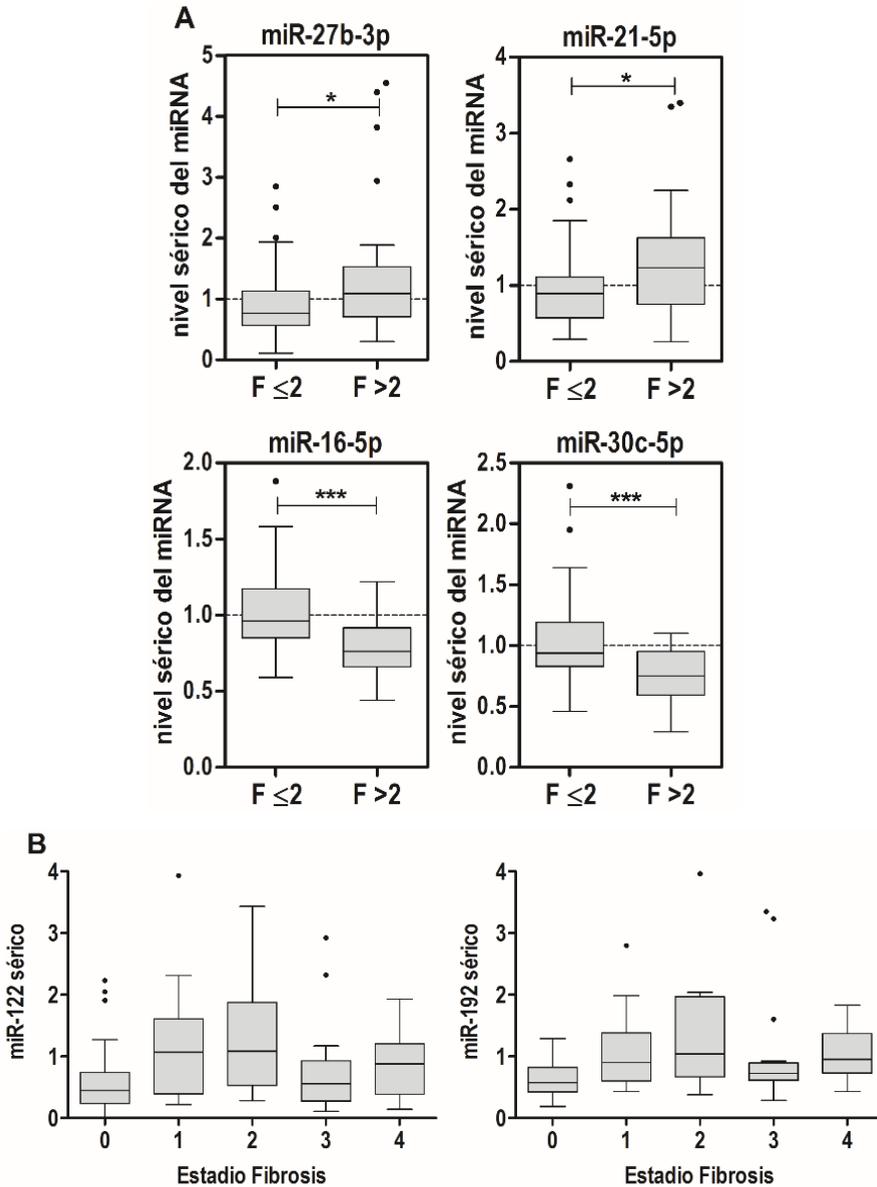


Figura 3.17: Cambios en los miRNAs séricos de acuerdo con el estadio de fibrosis en pacientes con EHGNA. La cohorte de estudio se dividió en 2 (A) o 5 (B) grupos

### **3 Resultados**

*según el estadio de Fibrosis. Veintinueve pacientes con EHGNA fueron clasificados en fibrosis grave  $F > 2$  ( $F3 + F4$ ). El nivel individual de cada miRNA fue analizado según lo expuesto en la Fig.3.15. Los datos representan el "fold-change" del nivel sérico de los miRNAs normalizados. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , t-test.*

Resumiendo, de los 16 miRNAs postulados previamente en los diferentes estudios seleccionados, como biomarcadores diagnósticos y de gravedad de la EHGNA (tanto de esteatosis como de fibrosis grave) hemos confirmado que los miR-34a, -192, -27b, -122, -22 y -21 están inducidos mientras que los miR-197, -30c y -16 están inhibidos en el suero de los pacientes con estadios graves de la EHGNA. Sin embargo, solo tres de ellos (miR-27b, -16 y -30c) se encontraban alterados de manera consistente tanto en EHNA como fibrosis grave.

#### **3.13 Asociación de los miRNAs circulantes con las variables clínicas**

Además de reexaminar el valor diagnóstico predictivo de EHGNA de los miRNAs postulados como biomarcadores hasta la fecha, también nos propusimos comparar los resultados con los biomarcadores clínicos convencionales de suero. En primer lugar, hicimos estudios de correlaciones entre los miRNAs y las variables clínicas y los resultados obtenidos demuestran que los miRNAs con niveles séricos incrementados en pacientes con EHGNA más grave (miR-34a, -192, -27b, -122, -22 y -21) mostraron una fuerte correlación con los niveles de AST, ALT, ferritina y el *score* de fibrosis APRI (Tabla 5 del Anexo I). Además de estas correlaciones tan consistentes, también observamos correlaciones significativas entre los miRNAs alterados en el suero de pacientes con fibrosis grave y los algoritmos de fibrosis. Así, el miR-27b (inducido en los pacientes) correlaciona con el algoritmo de fibrosis FIB-4 y APRI,

mientras que los miR-30c y -16 (inhibidos) correlacionan con FIB-4, BARD y el “*NAFLD Fibrosis Score*” (Tabla 5 del Anexo I).

Curiosamente, el miR-16 también correlaciona con la FA ( $R_{\text{Pearson}} = -0,28$ ,  $p=0,01$ ), el miR-192 con la protrombina ( $R_{\text{Pearson}} = 0,30$ ,  $p= 0,004$ ) y el miR-122 con los niveles de bilirrubina total ( $R_{\text{Pearson}} = 0,30$ ,  $p=0,003$ ).

#### **3.14 Rendimiento diagnóstico de los miRNAs biomarcadores circulantes**

Los estudios publicados previamente analizaron el rendimiento diagnóstico de los miRNAs séricos mediante curvas ROC y sus parámetros asociados (AUROC, sensibilidad, especificidad, razón de verosimilitud positiva y negativa, etc.) (ver Tabla 4 del Anexo I). Nosotros también hemos analizado el rendimiento diagnóstico de los miRNAs que resultaron diferencialmente expresados en la cohorte de nuestros pacientes con EHGNA para confirmar o no su valor diagnóstico como posibles biomarcadores. Además, como algunos de los miRNAs analizados fueron inducidos y otros reprimidos, nos planteamos que los cocientes entre miRNAs inducidos y reprimidos podrían generar nuevas variables con mayor valor diagnóstico. Los marcadores convencionales en suero y los índices de fibrosis también se analizaron y los resultados se compararon con los obtenidos para los miRNAs biomarcadores. Los valores de corte óptimos para las curvas ROC se determinaron usando el índice de Youden.

Primero analizamos el valor predictivo de los miRNAs para identificar los pacientes con *SAF score*  $\geq 2$ . El mejor resultado para un

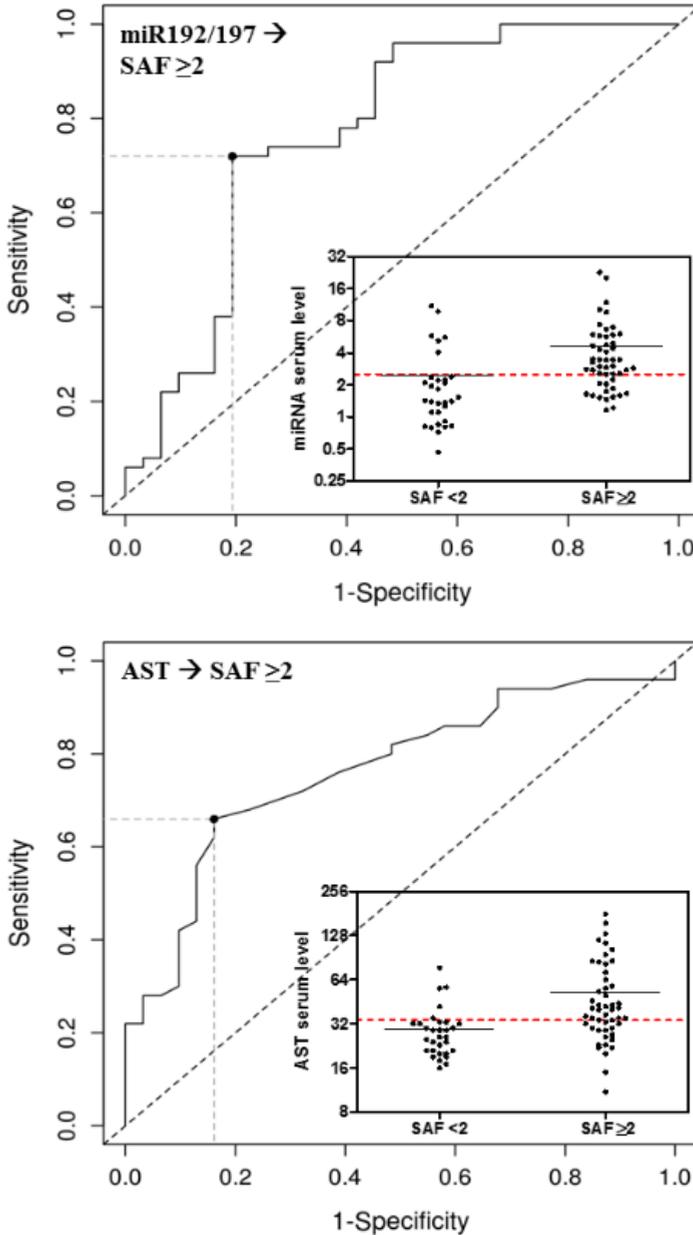
### **3 Resultados**

miRNA individual obtenido fue con el miR-34a, con un modesto valor de AUROC de 0,76. Sin embargo, cuando los combinamos en cocientes se obtienen mejores resultados de AUROC (miR-34a/197, 0,81 y miR-192/197, 0,78). El mejor marcador clínico convencional fue, como era de esperar, la AST con un AUROC de 0,75. La sensibilidad fue similar para los cocientes de miRNAs que para la AST (73-74% vs 74% para AST), sin embargo, la especificidad fue mucho mayor en los cocientes de miRNAs (83-79% vs 64% para AST) (Tabla 3.4 y Figura 3.18).

**Tabla 3.4: Rendimiento de los predictores de EHNA evaluados por el análisis de curvas ROC según el SAF score.**

	<b>SAF- A≥2</b>		
	<b>miR-34a/197</b>	<b>miR-192/197</b>	<b>AST</b>
<b>AUROC</b>	0,81 (0,72-0,90)	0,78 (0,69-0,88)	0,75 (0,65-0,85)
<b>Cut-off óptimo</b>	4,43	2,55	33
<b>Sensibilidad</b>	0,73 (0,58-0,85)	0,74 (0,60-0,85)	0,74 (0,59-0,85)
<b>Especificidad</b>	0,83 (0,67-0,93)	0,79 (0,63-0,90)	0,64 (0,48-0,78)
<b>VPP (precisión)</b>	0,83 (0,69-0,91)	0,80 (0,66-0,90)	0,71 (0,56-0,84)
<b>VPN</b>	0,72 (0,57-0,87)	0,72 (0,57-0,86)	0,67 (0,52-0,81)
<b>PLR</b>	4,17 (2,08-8,35)	3,45 (1,89-6,31)	2,07 (1,34-3,21)
<b>NLR</b>	0,33 (0,20-0,53)	0,33 (0,20-0,54)	0,40 (0,24-0,68)
<b>Exactitud</b>	0,77 (0,67-0,85)	0,74 (0,64-0,83)	0,70 (0,59-0,79)

Los valores entre paréntesis indican los intervalos de confianza. AUROC, área bajo la curva de las características del operador receptor (ROC); VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; PLR, razón de verosimilitud positiva; NLR, razón de verosimilitud negativa.



*Figura 3.18: Análisis de la curva ROC de los predictores de EHGNA grave en base al sistema SAF score. Se probó los miRNAs (y cocientes) seleccionados y los marcadores clínicos convencionales como biomarcadores predictivos para discriminar pacientes con un SAF score  $\geq 2$ . Las gráficas insertadas en las curvas*

### **3 Resultados**

ROC representan la separación de los diferentes grupos de acuerdo con el valor de corte óptimo según el método de Youden.

Los resultados obtenidos en el análisis predictivo de los pacientes con un NAS  $\geq 5$  fueron más prometedores y se observó un rendimiento diagnóstico mejor con los miRNAs que con las variables clínicas convencionales. El valor predictivo más elevado para un miRNA individual fue el obtenido con el miR-27b (AUROC de 0,73), pero con los cocientes miR-192/30c y miR-27b/30c mejoraron los valores de AUROC (0,78 y 0,79 respectivamente). El mejor de los marcadores clínicos fue de nuevo la AST con un AUROC de 0,75. En cuanto a la sensibilidad y la especificidad, en este caso el rendimiento fue mejor para los cocientes de miRNAs que para el marcador clínico (sensibilidad del 87% para miR-192/30c vs el 79% para AST y una especificidad del 89% para el cociente miR-27b/30c frente al 59% para AST) (Tabla 3.5 y Figura 3.19).

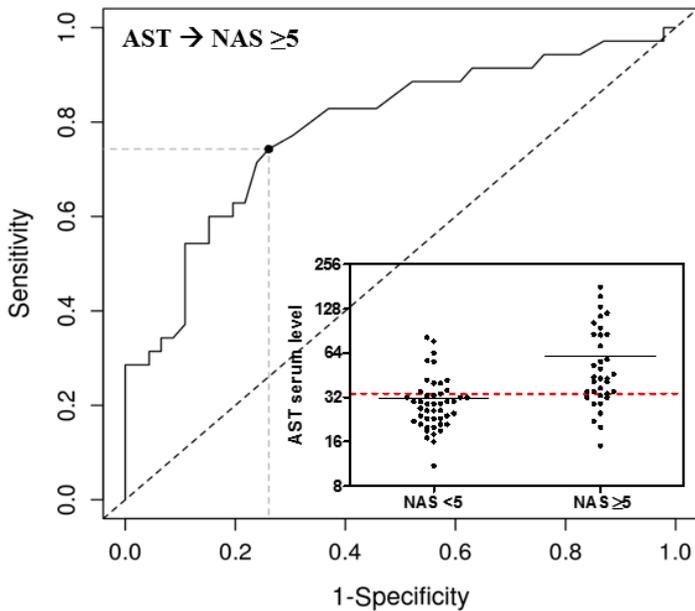
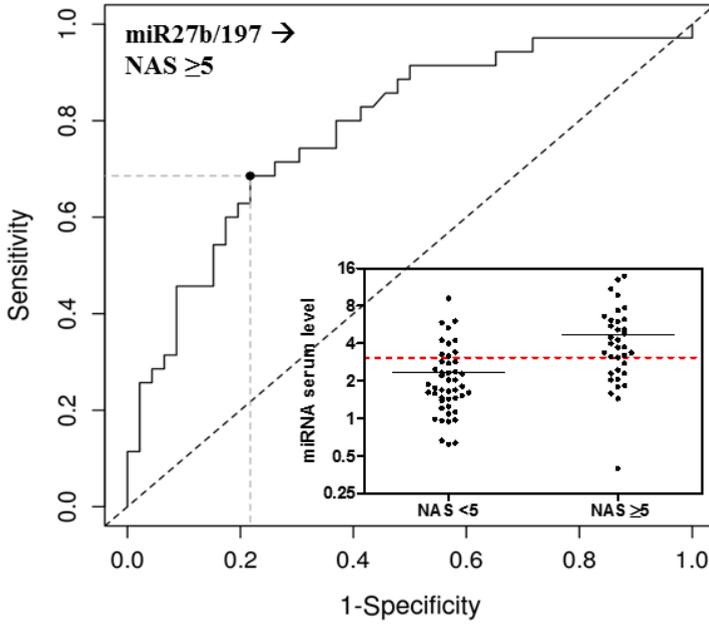
**Tabla 3.5: Rendimiento de los predictores de EHNA evaluados por el análisis de curvas ROC según el NAS score.**

	NAS $\geq 5$		
	miR-192/30c	miR-27b/30c	AST
<b>AUROC</b>	0,78 (0,69-0,88)	0,79 (0,69-0,88)	0,75 (0,64-0,85)
<b>Cut-off óptimo</b>	1,62	2,83	33
<b>Sensibilidad</b>	0,87 (0,72-0,96)	0,55 (0,38-0,71)	0,79 (0,63-0,90)
<b>Especificidad</b>	0,69 (0,54-0,80)	0,89 (0,77-0,96)	0,59 (0,45-0,73)
<b>VPP (precisión)</b>	0,66 (0,52-0,86)	0,78 (0,60-0,88)	0,58 (0,43-0,76)
<b>VPN</b>	0,88 (0,74-0,93)	0,74 (0,59-0,89)	0,80 (0,64-0,88)
<b>PLR</b>	2,76 (1,83-4,17)	4,97 (2,22-11,2)	1,92 (1,35-2,78)

### 3 Resultados

<b>NLR</b>	0,19 (0,08-0,44)	0,50 (0,35-0,73)	0,35 (0,19-0,68)
<b>Exactitud</b>	0,74 (0,64-0,82)	0,73 (0,63-0,82)	0,67 (0,57-0,77)

Ver pie de Tabla 3.4.



### **3 Resultados**

*Figura 3.19: Análisis de la curva ROC de los predictores de EHGNA grave en base al sistema NAS score. Se probó tanto los miRNAs como los marcadores clínicos convencionales como biomarcadores predictivos para discriminar pacientes con un NAS  $\geq 5$ . Las gráficas insertadas en las curvas ROC representan la separación de los diferentes grupos de acuerdo con el valor de corte óptimo según el método de Youden.*

Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que los miR-34a, -192, -27b, y sus respectivos cocientes con el miR-197 y -30c, son los miRNAs biomarcadores más útiles a la hora de discriminar entre pacientes con HGNA y EHNA.

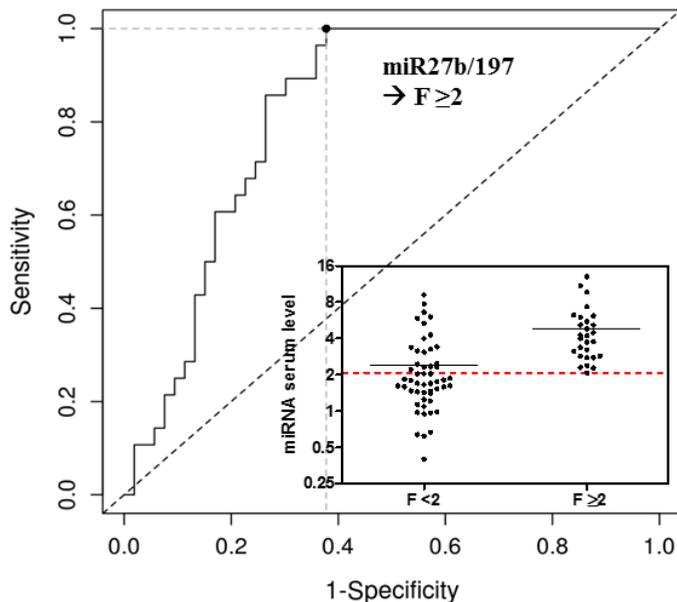
Por último, en el análisis predictivo de la fibrosis grave ( $F > 2$ ) en los pacientes con EHGNA, los resultados demostraron que, en términos generales, los miRNAs no muestran una ventaja clara frente a los algoritmos convencionales para la clasificación de la fibrosis. El miRNA individual que obtuvo el mejor resultado fue el miR-30c (inhibido en pacientes  $F > 2$ ) con un AUROC de 0,72. Algunos cocientes como miR-27b/30c y miR-27b/197 mejoraron ligeramente (AUROC= 0,77 y 0,75 respectivamente). Sin embargo, FIB-4 con un AUROC de 0,85 resultó ser mucho mejor que cualquier miRNA (individual o cociente). Además, el índice FIB-4, en acuerdo con estudios previos ((217)), obtuvo una elevada especificidad (86%), lo que indica un buen rendimiento diagnóstico para predecir la fibrosis avanzada (Tabla 3.6 y Figura 3.20). Curiosamente, el cociente miR-27b/197 mostró una sensibilidad mayor que la que obtuvo el FIB-4 (83% vs 72%) y podría ser considerado para complementar los algoritmos convencionales de fibrosis.

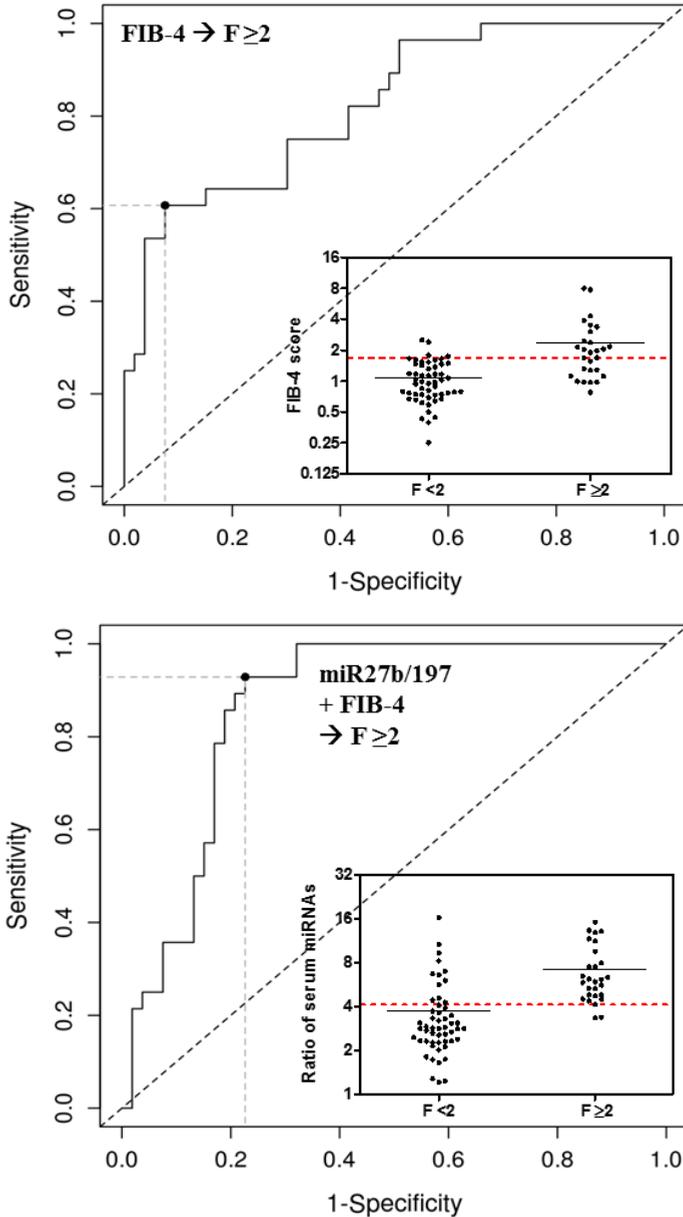
### 3 Resultados

**Tabla 3.6: Rendimiento de los predictores de EHNA evaluados por el análisis de curvas ROC según el grado de Fibrosis.**

	Fibrosis >2		
	miR-27b/197	miR-27b/30c	FIB-4
<b>AUROC</b>	0,75 (0,65-0,86)	0,77 (0,67-0,87)	0,85 (0,76-0,93)
<b>Cut-off óptimo</b>	2,28	2,34	1,68
<b>Sensibilidad</b>	0,83 (0,64-0,94)	0,72 (0,53-0,87)	0,72 (0,53-0,87)
<b>Especificidad</b>	0,60 (0,47-0,72)	0,74 (0,62-0,85)	0,86 (0,75-0,93)
<b>VPP (precisión)</b>	0,49 (0,36-0,76)	0,57 (0,42-0,77)	0,70 (0,53-0,86)
<b>VPN</b>	0,88 (0,74-0,93)	0,86 (0,71-0,91)	0,87 (0,74-0,94)
<b>PLR</b>	2,09 (1,47-2,95)	2,85 (1,77-4,60)	5,07 (2,63-9,66)
<b>NLR</b>	0,29 (0,13-0,65)	0,37 (0,20-0,68)	0,32 (0,18-0,59)
<b>Exactitud</b>	0,66 (0,56-0,76)	0,71 (0,61-0,81)	0,82 (0,72-0,89)

Ver pie de Tabla 3.4.





**Figura 3.20:** Análisis de la curva ROC de los predictores de EHGNA grave en base al estadio de fibrosis. Se probó los biomarcadores predictivos (miRNAs y marcadores clínicos) para discriminar pacientes con un estadio de fibrosis grave  $F \geq 2$ . Las gráficas insertadas en las curvas ROC representan la separación de los diferentes grupos de acuerdo con el valor de corte óptimo según el método de Youden.

### **3.15 Modelos de clasificación multivariante basados en los miRNAs séricos y/o variables clínicas clásicas**

Desarrollamos también modelos PLS-DA Multivariante para valorar si todos los biomarcadores en conjunto son capaces de predecir mejor a los pacientes de acuerdo con la clase a la que pertenecen, por ejemplo, SAF  $A < 2$  vs  $A \geq 2$ , NAS  $< 5$  vs  $\geq 5$  o Fibrosis  $\leq 2$  vs  $> 2$ . Además, esta aproximación nos permite aplicar un método de validación cruzado robusto. En la Tabla 3.7 y la Figura 2 del Anexo I quedan resumidos los resultados de la validación cruzada considerando tres modelos diferentes: miRNAs individuales, miRNAs y sus cocientes, y variables clínicas.

Los valores AUROC de la validación cruzada para las 16 variables clínicas (Tabla 3.7) variaron entre 0,67-0,75, siempre por debajo de 0,80, lo que sugiere unos rendimientos deficientes en la predicción de la gravedad de la EHGNA. Los valores de AUROC aumentaron cuando se evaluaron miRNAs y sus cocientes (0,74-0,81) y fueron aún más elevados (0,78-0,83) al considerarse juntas todas las variables (clínicas y miRNAs).

Por lo tanto, según estos modelos PLS-DA con validación cruzada, la mejor identificación de pacientes graves (SAF  $A \geq 2$ , NAS  $\geq 5$  y F  $> 2$ ) se logró cuando todas las variables (clínicas y miRNAs) se combinaban en el mismo modelo predictivo. Estos resultados sugieren que la incorporación del análisis de los miRNAs séricos a los algoritmos predictivos actuales o futuros podrían mejorar significativamente el diagnóstico no invasivo de pacientes de EHGNA en riesgo.

### 3 Resultados

**Tabla 3.7: Evaluación mediante la validación cruzada (LOO-CV) del rendimiento predictivo de los modelos PLS-DA basados en marcadores clínicos convencionales y/o miRNAs para predecir SAF  $A \geq 2$ , NAS  $\geq 5$  o Fibrosis  $> 2$ .**

SAF $A \geq 2$	Clínicas	miRNAs	Clínicas & miRNAs
<b>AUROC</b>	0,75	0,79	0,82
<b>Sensibilidad</b>	68,0 (53,3-80,5)	74,0 (59,7-85,4)	66,0 (51,2-78,8)
<b>Especificidad</b>	78,6 (63,2-89,7)	71,4 (55,4-84,3)	78,6 (63,2-89,7)
<b>PLR</b>	3,2 (1,7-5,8)	2,6 (1,6-4,3)	3,1 (1,7-5,7)
<b>NLR</b>	0,4 (0,3-0,6)	0,4 (0,2-0,6)	0,4 (0,3-0,7)
<b>Variables</b>	16	33	49
<b>Variables latentes</b>	2	3	2

NAS $\geq 5$	Clínicas	miRNAs	Clínicas & miRNAs
<b>AUROC</b>	0,67	0,74	0,78
<b>Sensibilidad</b>	44,7 (28,6-61,7)	50,0 (33,4-66,6)	47,4 (31,0-64,2)
<b>Especificidad</b>	79,6 (66,5-89,4)	85,2 (72,9-93,4)	87,0 (75,1-94,6)
<b>PLR</b>	2,2 (1,2-4,1)	3,4 (1,6-6,9)	3,6 (1,7-7,9)
<b>NLR</b>	0,7 (0,5-0,9)	0,6 (0,4-0,8)	0,6 (0,4-0,8)
<b>Variables</b>	16	33	49
<b>Variables latentes</b>	2	2	1

F $> 2$	Clínicas	miRNAs	Clínicas & miRNAs
<b>AUROC</b>	0,75	0,81	0,83
<b>Sensibilidad</b>	72,4 (52,8-87,3)	69,0 (49,2-84,7)	72,4 (52,8-87,3)
<b>Especificidad</b>	74,6 (62,1-84,7)	76,2 (63,2-86,0)	82,5 (70,9-91,0)
<b>PLR</b>	2,9 (1,8-4,6)	2,9 (1,7-4,8)	4,15 (2,3-7,4)
<b>NLR</b>	0,4 (0,2-0,7)	0,4 (0,2-0,7)	0,3 (0,2-0,6)
<b>Variables</b>	16	33	49
<b>Variables latentes</b>	4	3	2

Ver pie de Tabla 3.4.

#### **3.16 ¿Son los miRNAs biomarcadores de gravedad para la EHGNA identificados hasta ahora los mejores candidatos posibles?**

De los 14 estudios publicados hasta la fecha dirigidos a encontrar miRNAs biomarcadores para la EHGNA, sólo tres realizaron búsquedas no sesgadas (basadas en análisis globales (RNAseq) o muy amplios (PCR array)) (174, 208, 209). El resto de los estudios se centraron en el análisis de uno o varios miRNAs particulares basándose en conocimientos previos y, en consecuencia, no realizaron búsquedas *de novo*. Por lo tanto, puede que algunos buenos candidatos a miRNAs biomarcadores hayan sido pasados por alto. Nuestro siguiente objetivo fue investigar esta posibilidad.

Para ello, realizamos un pequeño análisis piloto mediante secuenciación de RNA (RNAseq) en el suero de un grupo reducido de pacientes pertenecientes a nuestra cohorte de estudio (cuatro pacientes de HGNA vs cuatro pacientes con EHNA). Solo 178 miRNAs maduros fueron detectados con confianza en más de 50% de los pacientes, lo que sólo representa cerca del 7% de todos los miRNAs humanos maduros registrados hasta la fecha en miRBase. Estos resultados confirman la baja sensibilidad de la secuenciación en suero si la comparamos con las matrices de qPCR convencionales utilizadas en otros estudios y que han demostrado poder detectar más de 25% del total de los miRNAs (209). De entre los 7 miRNAs identificados en nuestros resultados asociados a la gravedad de la EHGNA (miR-122, -192, -27b, -34a, -22, -30c y -16), 5 se confirmaron en la secuenciación y su expresión resultó diferencial en el suero de los pacientes con EHNA. Sin embargo, dos de ellos (miR-34a y miR-27b) no pudieron ser detectados con confianza.

### **3 Resultados**

Además, se encontraron 39 nuevos miRNAs significativamente alterados en el suero de los pacientes con EHNA (25 de ellos fueron inducidos y 14 reprimidos). Estos miRNAs, que recoge la Tabla 3.8, no se han citado ni publicado hasta la fecha como posibles biomarcadores de gravedad de la EHGNA y, por lo tanto, podemos decir que la investigación en este campo todavía está abierta. Entre los nuevos miRNAs identificados por la secuenciación encontramos significativamente inducidos los miR-125b, -193a/b, -320b/c/e, -378a/c/g/y y -483, mientras que los miR-let7a/d/f, -27a, -93, -150, -215 y -223 estaban reprimidos en los sueros de pacientes con mayor gravedad. La relevancia de estos nuevos miRNAs como biomarcadores circulantes para EHNA debe confirmarse y validarse en cohortes adecuadas con un mayor número de sujetos, pero podrían convertirse en biomarcadores en un futuro con un rendimiento de predicción mejor a los identificados y validados hasta la fecha.

**Tabla 3.8: miRNAs diferencialmente expresados en el suero de los pacientes con EHNA (n=4) vs pacientes con HGNA (n=4) analizados por secuenciación de miRNAs.**

<b>miRNA ID</b>	<b><i>Fold (Log2)</i></b>	<b><i>Fold Change</i></b>	<b>Estadística (t)</b>	<b><i>p</i>-valor</b>
hsa-mir-100-5p	1,84	3,59	4,30	0,002
hsa-mir-100-5p	1,8	3,6	4,3	0,0024
hsa-mir-125b-1-5p	1,4	2,7	2,9	0,0195
hsa-mir-125b-2-5p	2,4	5,2	4,4	0,0022
hsa-mir-193a-5p	2,8	6,8	5,8	0,0004
hsa-mir-193b-5p	4,9	30,0	7,7	0,0000
hsa-mir-210-3p	0,7	1,6	2,4	0,0434
hsa-mir-30a-5p	1,8	3,6	5,3	0,0007
hsa-mir-320b-1-3p	1,4	2,7	3,2	0,0122
hsa-mir-320b-1-5p	2,2	4,7	3,5	0,0076
hsa-mir-320b-2-3p	2,5	5,6	4,1	0,0030
hsa-mir-320c-1-3p	2,3	4,8	3,6	0,0064

### **3 Resultados**

hsa-mir-320c-2-5p	2,0	4,0	3,8	0,0047
hsa-mir-320e-5p	1,2	2,3	2,4	0,0397
hsa-mir-324-3p	0,9	1,9	2,8	0,0223
hsa-mir-378a-3p	1,9	3,8	3,7	0,0054
hsa-mir-378c-5p	2,3	5,0	3,2	0,0117
hsa-mir-378g-5p	1,3	2,5	2,8	0,0224
hsa-mir-483-5p	2,9	7,5	5,2	0,0007
hsa-mir-885-3p	1,3	2,4	2,4	0,0423
hsa-mir-1228-5p	1,7	3,2	3,4	0,0086
hsa-mir-1303-3p	0,9	1,9	2,8	0,0223
hsa-mir-1307-3p	0,9	1,8	2,8	0,0236
hsa-mir-1468-5p	0,8	1,7	2,4	0,0413
hsa-mir-3591-3p	2,9	7,5	4,5	0,0018
hsa-mir-6734-5p	1,3	2,4	2,6	0,0317
hsa-let-7a-1	-2,0	0,2	-4,2	0,0029
hsa-let-7d	-1,2	0,4	-2,5	0,0371
hsa-let-7f-2	-1,9	0,3	-2,8	0,0236
hsa-mir-27a-5p	-1,4	0,4	-4,2	0,0028
hsa-mir-92b-3p	-0,6	0,6	-2,4	0,0396
hsa-mir-93-5p	-1,1	0,5	-3,0	0,0164
hsa-mir-107-3p	-0,7	0,6	-2,4	0,0453
hsa-mir-150-3p	-0,7	0,6	-2,5	0,0374
hsa-mir-150-5p	-1,0	0,5	-4,3	0,0024
hsa-mir-215-5p	-1,4	0,4	-3,5	0,0073
hsa-mir-223-5p	-1,5	0,3	-2,4	0,0402
hsa-mir-330-5p	-0,7	0,6	-2,3	0,0474
hsa-mir-485-5p	-0,8	0,6	-2,5	0,0384
hsa-mir-582-3p	-1,5	0,4	-2,4	0,0423
<b>hsa-mir-122-5p</b>	2,9	7,7	4,2	0,0026
<b>hsa-mir-192-5p</b>	1,3	2,5	1,8	0,1021
<b>hsa-mir-22-3p</b>	1,8	3,5	3,2	0,0124
<b>hsa-mir-16-5p</b>	-1,6	0,3	-3,2	0,0121
<b>hsa-mir-30c-5p</b>	-0,6	0,7	-1,0	0,3252

### **Capítulo 3: Búsqueda de biomarcadores diagnósticos de colestasis iatrogénica**

Los resultados de los capítulos anteriores demuestran que existe una firma de miRNAs alterados en células HepG2 en respuesta a fármacos esteatósicos modelo y a fármacos que se prescriben normalmente a pacientes con SM. También hemos demostrado que los miRNAs liberados al torrente circulatorio pueden ser excelentes biomarcadores para diagnosticar la gravedad de la EHGNA en pacientes. Sin embargo, no hemos podido demostrar que los miRNAs circulantes puedan distinguir entre la EHGNA de origen metabólico y la causada por medicamentos; siendo la mayor limitación la imposibilidad de encontrar cohortes de pacientes con un diagnóstico preciso de esteatosis iatrogénica. Por el contrario, en el contexto de la HTX por medicamentos (*drug-induced liver injury*, DILI) sí que existen otros fenotipos o manifestaciones para los que existen criterios clínicos bien definidos. Nos referimos al DILI hepatocelular y al colestásico. En este capítulo nos centraremos en el estudio de los miRNAs asociados al DILI colestásico.

Por otra parte, hay que destacar que los fármacos hepatotóxicos no siguen mecanismos únicos bien definidos, sino todo lo contrario, ya que en muchas ocasiones un mismo fármaco activa varias respuestas simultáneamente, o dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición. Un ejemplo es la CYCA, un compuesto esteatósico modelo, del que también se ha descrito su capacidad de activar mecanismos colestásicos.

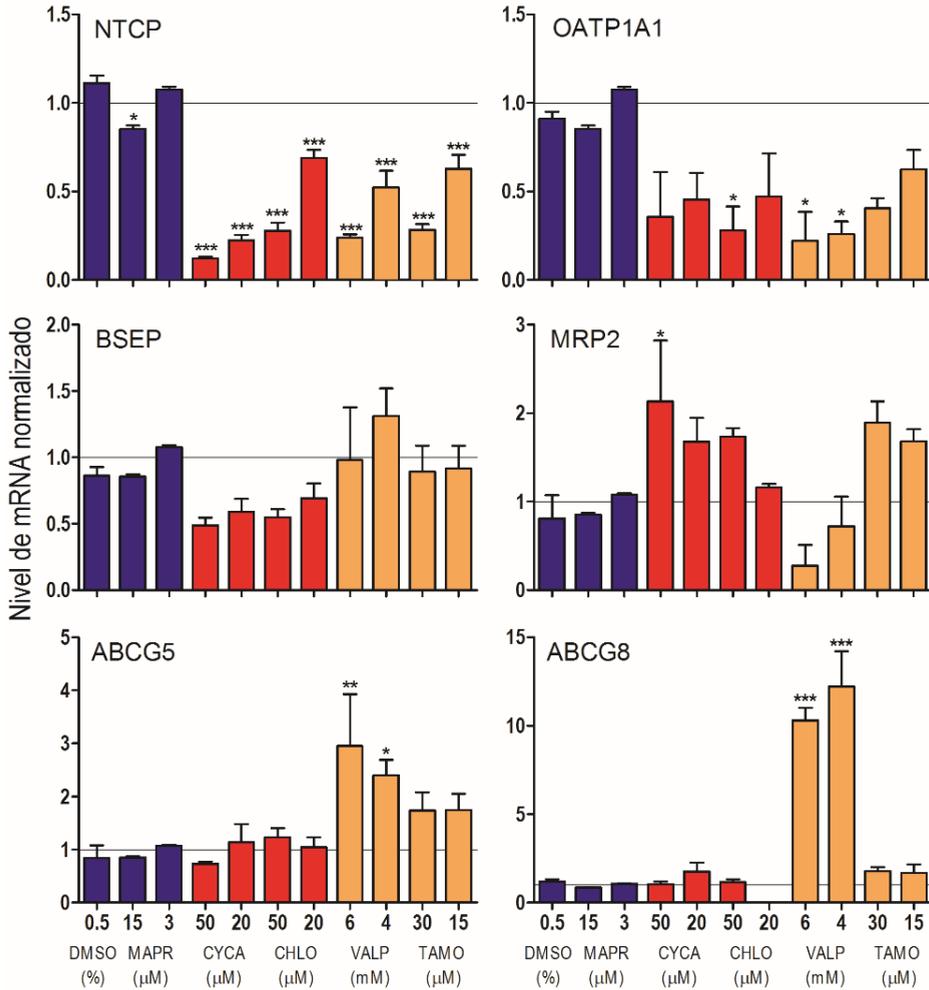
Esta idea fue constatada en un estudio previo del grupo de investigación en el que comparamos los efectos de fármacos modelo

### **3 Resultados**

colestásicos y esteatósicos sobre la expresión de genes de transportadores hepatobiliares. La colestasis se caracteriza por la acumulación de los AB en la sangre o en el hígado. Los transportadores que poseen los hepatocitos tanto en la membrana sinusoidal (NTCP y OATPs) como en la canalicular (BSEP, MRP2, MDR3, ABCG5/8...) son los encargados del paso de los componentes que forman la bilis. En este estudio utilizamos como modelo experimental cultivos primarios de hepatocitos de rata en sándwich de colágeno (185).

Los hepatocitos fueron expuestos durante 24 horas a diferentes concentraciones de compuestos colestásicos modelo (CYCA, CHLO, GLYB, ETHY...), compuestos esteatósicos (VALP, TAMO, DOXY...) y compuestos no hepatotóxicos (AMIK, KETO, MAPR...). Se realizó un análisis mediante RT-qPCR del nivel de mRNA de los transportadores de AB tanto de entrada (NTCP, OATP1A1) como de salida (BSEP, MRP2, ABCG5/ABCG8). Los resultados mostraron que los compuestos colestásicos (CYCA y CHLO) inhiben significativamente el nivel de expresión de la mayoría de los transportadores de AB a excepción de MRP2 cuya expresión se vio inducida (Figura 3.21). Sorprendentemente, los compuestos esteatósicos modelo (VALP y TAMO) también alteraron la expresión de algunos transportadores, sobre todo el VALP que inhibió significativamente a NTCP y OATP1A1 e indujo a ABCG5/8. (Fig.3.21). Por tanto, podemos afirmar que la colestasis y la esteatosis iatrogénicas están relacionadas y parecen compartir algunos mecanismos, ya que tanto los fármacos colestásicos como los esteatósicos afectan a la expresión de los transportadores de AB, algo que se supone es un fenómeno más específico de las respuestas colestásicas.

### 3 Resultados



**Figura 3.21: Efecto de los fármacos colestáticos y no colestáticos en el nivel de expresión de los transportadores hepatobiliares.** Los hepatocitos de rata fueron incubados durante 24h con diferentes concentraciones de fármacos colestáticos (barras rojas), esteatóticos (barras naranjas) o controles (barras azules). El nivel de expresión de cada transportador fue determinado por RT-qPCR y fue normalizado con el gen housekeeping GAPDH. Las barras representan la media  $\pm$  SEM (n=3). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ANOVA y Tukey HSD post hoc test.

Nuestro objetivo principal en este apartado es identificar una firma de miRNAs alterados en células hepáticas humanas expuestas a

compuestos colestásicos modelo y validar los miRNAs alterados como biomarcadores en el suero de una cohorte de pacientes con DILI.

#### **3.17 El cultivo de hepatocitos en sándwich de colágeno favorece la expresión de los transportadores de ácidos biliares**

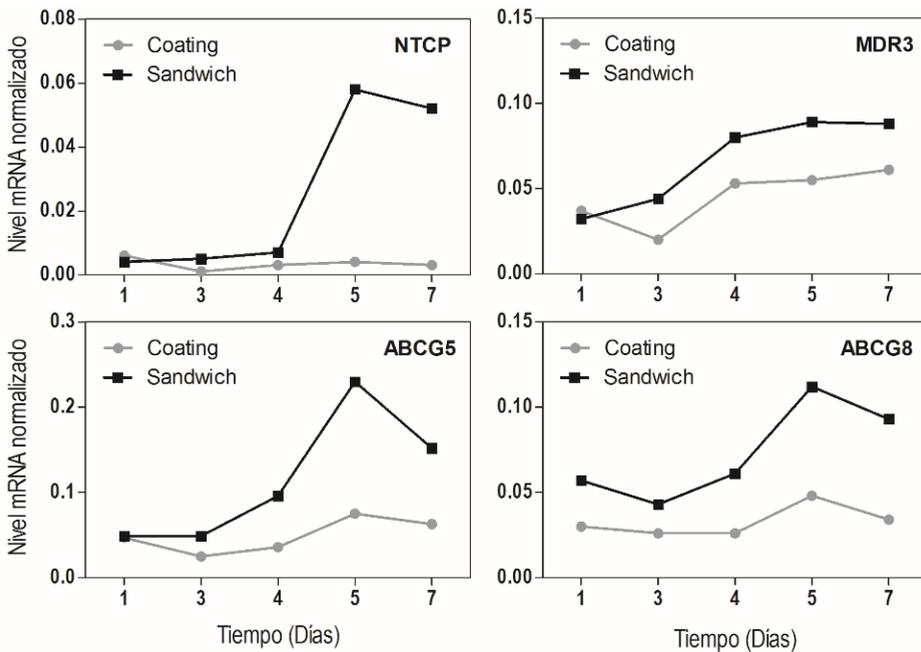
Los hepatocitos primarios humanos en cultivo son el modelo *gold-standard* en la actualidad para numerosos estudios tanto en investigación básica como estudios de HTX para la industria farmacéutica. Los hepatocitos cultivados en monocapa son metabólicamente competentes, presentan la capacidad de biotransformar compuestos y excretarlos, y responden a inductores del complejo CYP. Sin embargo, en estudios a largo plazo que requieren muchos días en cultivo, los hepatocitos pierden poco a poco algunas características de fenotipo adulto, y la viabilidad y funcionalidad va decayendo, lo que limita enormemente su uso.

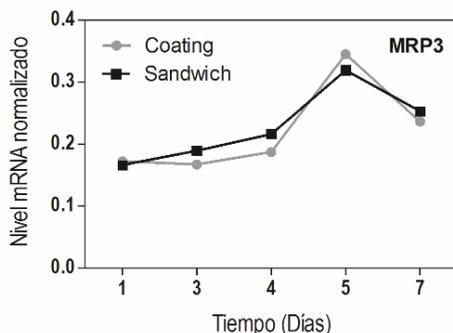
Los cultivos de hepatocitos humanos en sándwich de colágeno, sin embargo, mantienen mejor las características de los hepatocitos adultos, incluyendo la capacidad de construir una red de canalículos biliares que confiere una morfología más similar a la del hepatocito, y la secreción de moléculas hepáticas como la albúmina, la urea o los AB. Sin embargo, esta técnica presenta también una serie de limitaciones; se requiere un gran número de hepatocitos de partida y los compuestos a testar deben incorporarse una vez se ha formado la red de canalículos biliares, sobre el cuarto o quinto día, tras la aplicación de la segunda capa de colágeno, por lo que se limita la ventana de exposición al fármaco a unos 3-4 días.

Los hepatocitos humanos Upcyte (HU) fueron sembrados en paralelo mediante dos técnicas: sobre una sola capa de colágeno (*coating*)

### 3 Resultados

o aplicándose una segunda capa de colágeno encima de la monocapa a las 24 horas de la siembra (sándwich). Los resultados mostraron el beneficio del sándwich de colágeno sobre el nivel de expresión de los transportadores de AB en comparación con la monocapa celular (Figura 3.22). Prácticamente todos los transportadores de AB que se analizaron mediante RT-qPCR, alcanzaron su máxima nivel de expresión a los 4-5 días, sin embargo, se observó como a partir del séptimo día los niveles empiezan a decaer. Es por ello, que podemos considerar esa ventana de tiempo (entre el cuarto y quinto día desde que se aplicó la segunda capa de colágeno) como el mejor momento para exponer a las células a los compuestos en los ensayos de toxicidad.





**Figura 3.22:** Comparación entre cultivo de hepatocitos en sándwich de colágeno y en monocapa de colágeno (coating). Los HU se sembraron en placas pretratadas con colágeno y 24h post-siembra la mitad de los cultivos se cubrieron con una segunda capa de colágeno. Las células de ambos modelos se recogieron y congelaron a distintos días. Los niveles de los transportadores de AB se analizaron mediante RT-qPCR, siendo “1” el valor de expresión del transportador en un pool de hígados humanos, y se normalizaron respecto al gen housekeeping PBGD.

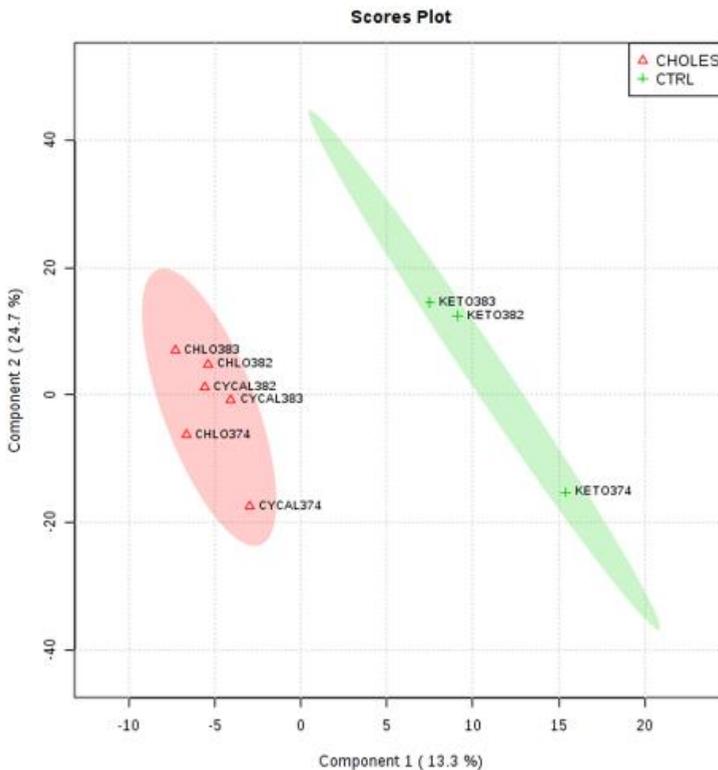
### **3.18 miRNAs alterados por compuestos colestásicos modelo en hepatocitos humanos**

Con el fin de identificar una firma de miRNAs alterados por fármacos colestásicos se siguió un enfoque similar al que realizamos en el estudio de esteatosis. En primer lugar, se realizó un análisis global de los miRNAs diferencialmente expresados mediante secuenciación de RNA (RNAseq) en HU tratados con los compuestos colestásicos y controles.

Los HU (donante 10-03) se cultivaron en sándwich de colágeno (ver detalle en Materiales y Métodos) y se incubaron con concentraciones subcitotóxicas de CHLO (25 $\mu$ M) y CYCA (12,5 $\mu$ M) como fármacos colestásicos modelo. Los resultados fueron comparados con células tratadas con KETO (37,5 $\mu$ M) como compuesto control. Los cultivos (n=3) estuvieron expuestos a los xenobióticos durante 24 horas.

### 3 Resultados

En total, 593 miRNAs maduros fueron detectados de forma fiable en las células (lecturas promedio  $\geq 3$ , estando presentes en al menos el 75% (7/9) de las muestras,). Un primer análisis de PCA no supervisado no mostró una clara separación entre ambas condiciones: colestásica (CHLO y CYCA) y no colestásica (KETO). Sin embargo, un análisis PLS-DA supervisado (Figura 3.23) maximizó las diferencias y generó un modelo predictivo capaz de discriminar entre las dos condiciones (R2: 0,99, Q2: 0,30, Variables Latentes:3).



**Figura 3.23:** Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de los niveles de expresión de los miRNAs en los hepatocitos humanos. Los HU se incubaron durante 24h con concentraciones subcitotóxicas de fármacos colestásicos (CHOLEST, triángulos rojos) o un fármaco control (CTRL, cruces verdes). Los miRNAs se cuantificaron mediante RNAseq en tres experimentos independientes. El análisis PLS-DA se realizó con el software MetaboAnalyst.

### 3 Resultados

Como ya hemos visto los miRNAs se diluyen mucho cuando son liberados al medio extracelular, lo que limita su detección y su uso como biomarcador. Por ello, y con vistas a su validación como biomarcadores séricos, la lista de 593 miRNAs fue filtrada una vez más para seleccionar solo especies de miRNAs maduras cuya expresión fuera abundante. Se aumentó el promedio de lecturas en las muestras a  $\geq 24$  lo que redujo la lista a 355 miRNAs. Del total de esta lista, 25 miRNAs resultaron significativamente inducidos o inhibidos por los fármacos colestásicos. Sin embargo, las diferencias no fueron sustanciales y los cambios observados variaron entre 2,56 (para la máxima inducción) y 0,49 (para la mayor represión). Otros miRNAs también fueron alterados, pero específicamente por un solo fármaco: doce respondieron solo a CHLO y doce también solo a CYCA (Tabla 3.9). Por lo tanto, 49 miRNAs de 355 (un 13,8% del total) fueron alterados significativamente por los fármacos colestásicos modelo. En ese grupo destacaron, el miR-21, -22-3p, 27a-5p, -1260a/b, -424-5p, -30c-5p, -98-5p, -16-5p, -34a-5p, -122-5p y -146b-5p (Tabla 3.9). También resultaron alterados los niveles intracelulares de dos miRNAs (miR-192-5p y miR-451a), sin embargo, la variabilidad experimental y el pequeño número de réplicas no dio lugar a significación estadística (miR-192-5p; 0,89 *fold-change* y  $p > 0,05$ ; miR-451a; 0,37 *fold-change* y  $p > 0,05$ ).

**Tabla 3.9: miRNAs alterados por los fármacos colestásicos en HU analizados mediante RNAseq.**

CHLO & CYCA vs KETO			
miRNA maduro	Promedio lecturas	<i>Fold-change</i>	<i>p</i> -valor
miR-27a-5p	24	2,56	0,050
miR-1260a	384	1,80	0,003

### **3 Resultados**

miR-1260b	405	1,77	0,005
miR-29b-3p	180	1,33	0,036
miR-424-5p	887	1,29	0,001
miR-30c-5p	6976	0,83	0,004
miR-17-5p	2763	0,79	0,018
miR-98-5p	3643	0,79	0,005
miR-582-5p	91	0,77	0,045
miR-26b-3p	86	0,76	0,043
miR-16-5p	36536	0,76	0,042
miR-34a-5p	1289	0,76	0,013
miR-425-5p	1150	0,76	0,009
miR-30c-1-3p	53	0,75	0,028
miR-20a-5p	3586	0,74	0,0005
miR-26b-5p	13877	0,72	0,017
miR-574-5p	531	0,70	0,00003
let-7b-3p	50	0,67	0,003
miR-122-5p	103426	0,66	0,034
miR-3613-5p	56	0,65	0,050
miR-1303	103	0,64	0,013
miR-675-5p	89	0,62	0,025
miR-296-3p	33	0,57	0,002
miR-425-3p	68	0,53	0,046
miR-146b-5p	1795	0,49	0,050

#### **CHLO vs KETO**

<b>miRNA maduro</b>	<b>Promedio lecturas</b>	<b><i>Fold-change</i></b>	<b><i>p</i>-valor</b>
miR-21-3p	21841	1,84	0,031
miR-21-5p	302116	1,70	0,025
miR-182-5p	26007	1,57	0,004
miR-128-1-5p	40	1,53	0,025
miR-1286	50	1,47	0,031
miR-28-3p	21150	1,47	0,008
miR-1304-3p	225	1,40	0,040
miR-151a-3p	15482	1,22	0,037
miR-1180-3p	242	0,78	0,020
miR-574-3p	802	0,76	0,003
miR-128-3p	861	0,75	0,034
miR-152-3p	235	0,67	0,049

#### **CYCA vs KETO**

<b>miRNA maduro</b>	<b>Promedio lecturas</b>	<b><i>Fold-change</i></b>	<b><i>p</i>-valor</b>
---------------------	--------------------------	---------------------------	-----------------------

### **3 Resultados**

miR-616-5p	30	1,64	0,011
miR-19a-3p	1510	1,43	0,001
miR-19b-3p	3887	1,32	0,007
miR-22-3p	150585	1,23	0,043
miR-769-5p	1572	0,78	0,001
miR-483-3p	73	0,76	0,036
miR-483-5p	70	0,72	0,046
miR-20b-5p	140	0,70	0,046
miR-106a-5p	63	0,69	0,017
miR-4454	130	0,64	0,019
miR-671-5p	35	0,64	0,051
miR-26a-2-3p	44	0,57	0,029

#### **3.19 Identificación de una firma de miRNAs alterados por diferentes compuestos colestásicos**

Nuestro siguiente objetivo fue confirmar los resultados preliminares que se han obtenido mediante el análisis de RNAseq. Para ello, los HU fueron expuestos durante 24 horas a un número mayor de compuestos y los niveles de expresión intracelular de los miRNAs se analizaron por RT-qPCR.

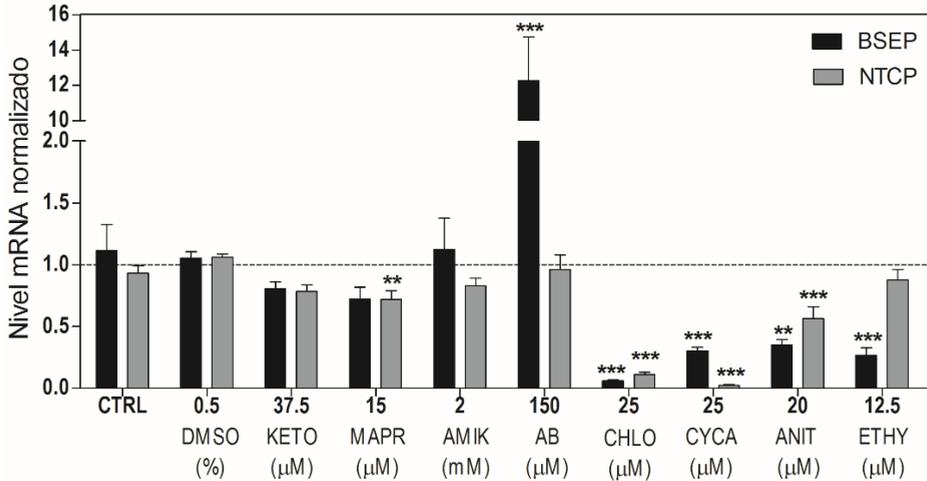
En el grupo de compuestos colestásicos se agregaron ANIT y ETHY. Por un lado, ANIT es un compuesto químico bien caracterizado que se utiliza en los roedores para modelar la colestasis intrahepática, sin embargo, su mecanismo de toxicidad difiere del de CHLO y CYCA, ya que ANIT al cruzar la membrana canalicular del hepatocito produce necrosis aguda en el epitelio del conducto biliar (107). Por otro lado, ETHY es usado experimentalmente en roedores para imitar la colestasis inducida por estrógenos. Este compuesto puede inhibir y reducir la expresión de los transportadores de AB en la membrana canalicular, pero, a diferencia de CHLO y CYCA, la mayoría de sus efectos están mediados

### **3 Resultados**

a través del receptor de estrógenos (218). Las células tratadas con compuestos colestásicos se compararon con cultivos tratados con compuestos no colestásicos (KETO, MAPR y AMIK) y con células expuestas a una mezcla de AB (150  $\mu$ M) para discriminar si las alteraciones en los miRNAs eran resultado de los tratamientos farmacológicos o por acumulación intracelular de AB.

Para demostrar que las concentraciones subcitotóxicas seleccionadas de los productos químicos provocaban efectivamente una toxicidad colestásica, se midió mediante RT-qPCR el efecto de estos compuestos en el nivel de expresión de dos transportadores clave de los AB, el transportador de entrada al hepatocito (NTCP) y el encargado de expulsarlos de la célula (BSEP). En la Figura 3.24, se observa que todos los compuestos disminuyeron significativamente la expresión de BSEP en los hepatocitos humanos. En cambio, NTCP fue reprimido por CHLO, CYCA y ANIT, pero ETHY no tuvo ningún efecto en los niveles del mRNA. Los compuestos controles no afectaron el nivel de ninguno de los transportadores y, como era de esperar, la exposición a AB activó la inducción adaptativa de BSEP mediada por la activación de FXR.

### 3 Resultados



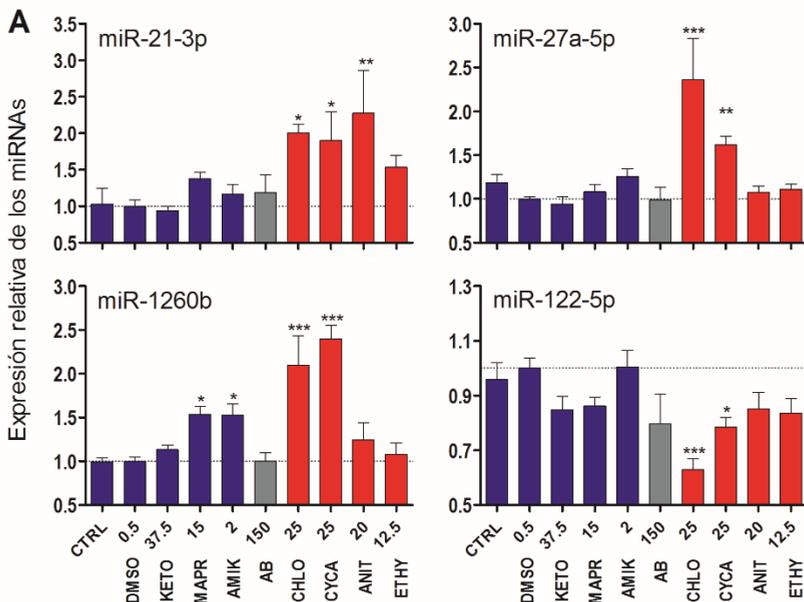
**Figura 3.24:** Nivel de expresión de los transportadores de AB en hepatocitos humanos expuestos a fármacos colestásicos y no colestásicos. Los HU cultivados en sándwich de colágeno se trataron con fármacos colestásicos modelo y no colestásicos, o con una mezcla de AB durante 24h. La expresión de los mRNA de los transportadores de ácidos biliares BSEP (negro) y NTCP (gris) se analizó mediante RT-qPCR y los resultados se normalizaron con el nivel de expresión del housekeeping PBGD. Las barras representan la media  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , ANOVA.

Antes de proceder a la validación de los resultados previos de RNAseq, se hizo una selección de miRNAs de interés en base a varios factores, como la abundancia intracelular, su relación con el hígado, el grado de inducción o represión y la significación estadística. El nivel de expresión intracelular de los miRNAs seleccionados se validó mediante RT-qPCR. Se observó que los fármacos colestásico modelo CHLO y CYCA fueron los más efectivos e indujeron la expresión de miR-21-3p, -27a-5p o -1260b, pero también tuvieron un efecto represor en otros miRNAs como, miR-122-5p, -192-5p o -451a (Figura 3.25-A). Sin embargo, no se observó una respuesta común a todos los compuestos colestásicos incluidos en el estudio.

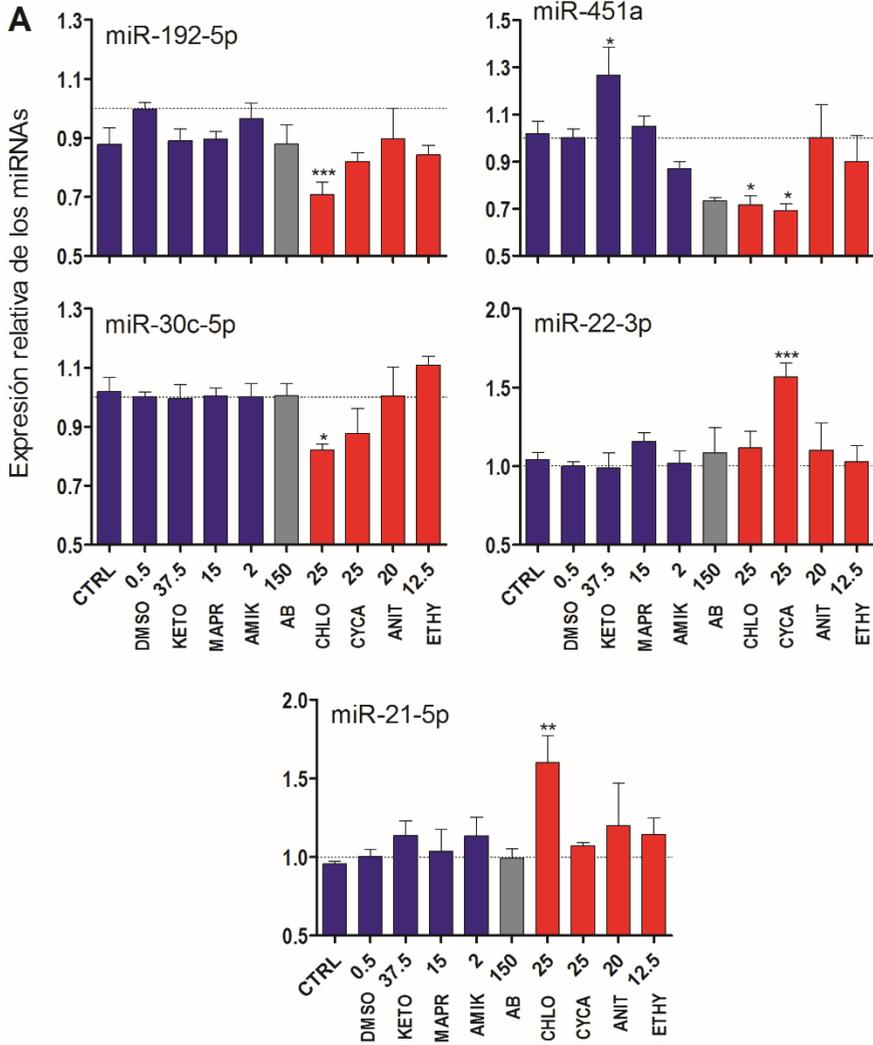
### 3 Resultados

ANIT causó la inducción significativa de miR-21-3p, -34a-5p y -98-5p (Fig.3.25-A y B), en cambio, ETHY no tuvo ningún efecto sobre los miRNAs analizados a las dosis que se seleccionaron para los experimentos. Curiosamente, la expresión de un miRNA (miR-424-5p) si se vio alterada por todos los fármacos colestásicos, sin embargo, las diferencias no fueron significativas (Fig.3.25-C). Finalmente, el miR-451a fue el único cuya expresión se vio afectada por los AB libres (Fig.3.25).

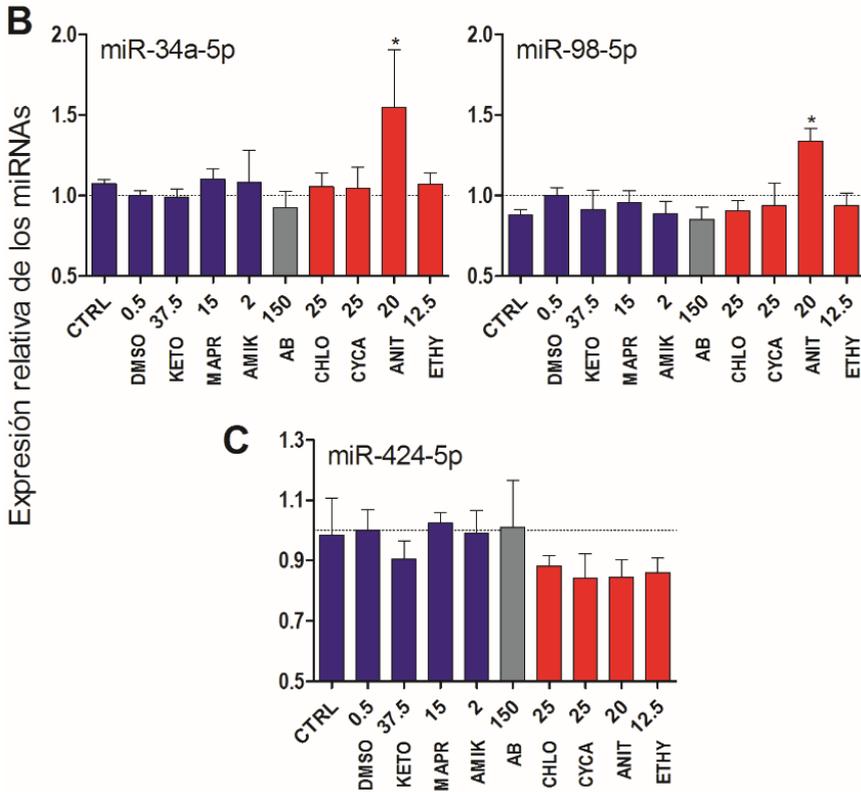
En resumen, a partir de los miRNAs identificados por RNAseq como posibles biomarcadores de colestasis iatrogénica, hemos validado una firma de 11 miRNAs alterados por los diferentes compuestos colestásicos en los HU en cultivo. Sin embargo, esta firma no fue común para todos los fármacos y esto puede deberse a los diferentes mecanismos de toxicidad de los distintos compuestos modelo que se eligieron para este estudio.



### 3 Resultados



### 3 Resultados



**Figura 3.25:** Nivel de expresión de miRNAs en hepatocitos humanos expuestos a fármacos colestáticos y no colestáticos. Los HU (donante 10-03) cultivados en sándwich de colágeno durante 5 días, se trataron con fármacos colestáticos modelo (barras rojas) y no colestáticos (barras azules), o con una mezcla de AB (barra gris), durante 24h. Los niveles intracelulares de los miRNAs se analizaron mediante RT-qPCR y se normalizaron con la media geométrica del miR-Let-7a y miR-25. **A:** miRNAs significativamente alterados por CHLO y/o CYCA. **B:** miRNAs alterados específicamente por ANIT. **C:** miR-424-5p inhibido moderadamente por todos los compuestos colestáticos. Las concentraciones se expresan en  $\mu\text{M}$ , excepto el DMSO (%) y AMIK (mM). Las barras representan la media  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , ANOVA.

#### 3.20 Características de las cohortes de pacientes de DILI

Recientemente hemos demostrado que las alteraciones en los miRNAs intracelulares inducidas por fármacos pueden exportarse al

### **3 Resultados**

medio extracelular (216). El siguiente objetivo que nos propusimos, fue investigar si los niveles de expresión de los miRNAs alterados por los fármacos colestásicos en los ensayos *in vitro*, también se ven afectados en el suero de los pacientes con DILI. Para ello, reclutamos dos grupos diferentes de pacientes: una cohorte de estudio y otra de validación.

En cuanto a los fármacos causales del DILI, estos pertenecían a muchos grupos terapéuticos distintos, sin embargo, los antibióticos (29% del DILI colestásico/mixto y 37% del DILI hepatocelular) y los AINEs (21% y 17%, respectivamente) fueron los más frecuentes. No se observaron diferencias en los grupos farmacológicos o los principios activos entre los grupos DILI colestásico/mixto y DILI hepatocelular, o no se pudieron estimar debido a los pocos casos en cada grupo. Sin, embargo, desde un punto de vista cualitativo, el DILI colestásico fue causado por fármacos pertenecientes a más diversidad de grupos terapéuticos (10 *versus* los 7 que ocasionaron los casos de DILI hepatocelular). Por último, cabe destacar que las drogas y los productos de herboristería causan preferentemente un DILI con fenotipo hepatocelular (hasta un 17% de la cohorte) (Tabla 3.10).

**Tabla 3.10: Fármacos específicos de las cohortes de estudio y validación de DILI.**

<b>Grupo farmacológico</b>	<b>Principio Activo</b>	<b>DILI Colestásico/Mixto</b>	<b>DILI Hepatocelular</b>
AINE	Dexketoprofeno	2	1
AINE	Ibuprofeno	1	2
AINE	Metamizol	1	3
AINE	Paracetamol	2	3
Antibiótico	Amoxicilina	1	
Antibiótico	Amoxicilina +clavulánico	5	4

### **3 Resultados**

Antibiótico	Ceftriaxona	2	1
Antibiótico	Cefuroxima		1
Antibiótico	Ciprofloxacino		1
Antibiótico	Claritromicina		1
Antibiótico	Clindamicina	1	
Antibiótico	Isoniazida		1
Antibiótico	Levofloxacino	1	1
Antibiótico	Nitrofurantoina		1
Antiepiléptico	Topiramato	1	
Antifúngico	Fluconazol		1
Antifúngico	Voriconazol	1	
Antihipertensivo	Metildopa		1
Antihipertensivo	Ramipril	1	
Antiplaquetario	Clopidogrel	1	
Drogas	Speed...		4
Esteroide anabolizante	Epistane	2	
Herboristería	Isoflavona		1
Herboristería	Mapurito		1
Hipolipemiente	Atorvastatina	2	
Inmunosupresor	Abatacept	1	
Inmunosupresor	Azatioprina	2	
Inmunosupresor	Metotrexato	2	
Inmunosupresor	Teriflunomida		1
Quimioterápico	Capecitabina	3	
Quimioterápico	Oxaliplatino	4	
Quimioterápico	Temozolomida		1
Quimioterápico	Trabectedina		2

La cohorte de estudio incluyó 31 pacientes diagnosticados de DILI, 18 de ellos con DILI colestásico/mixto y 13 con DILI hepatocelular. Además, se incluyó un grupo de 17 sujetos control con el hígado sano sometidos a una colecistectomía laparoscópica. La cohorte de estudio presentaba un IMC dentro del rango normal-sobrepeso (IMC = 19-29), con un porcentaje de mujeres del 52% y una edad promedio de 48 años. Las características basales de la población se detallan en la Tabla 3.11. Como era de esperar, los pacientes con DILI colestásico/mixto

### 3 Resultados

presentaron elevaciones significativas de los niveles de FA, bilirrubina total y  $\gamma$ -GT. Además, también mostraron unos niveles de TG mucho más elevados y unos niveles de albumina circulante inferior al resto de grupos. Por el contrario, los pacientes del grupo DILI hepatocelular se caracterizaron por aumentos muy significativos en la ALT y AST, aunque la albúmina también fue ligeramente inferior en comparación al grupo control.

**Tabla 3.11: Características basales de la cohorte de estudio DILI.**

	HN (n=17)	DILI COL/MIX (n=18)	DILI HEP (n=13)	
Edad (años)	42,9 ± 9,3	52,7±19,1	46,7±16,4	
Sexo				
Hombres	7 (41,2%)	12(66,7%)	4 (30,8%)	
Mujeres	10 (58,8%)	6 (33,4%)	9 (69,2%)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26,2 ± 3,6	25,0±2,7	24,2±4,0	
Glucosa (mg/dL)	89,9 ± 10,7	95,7±26,0	86,6±19,1	
TG (mg/dL)	106,7 ± 36,3	212,3±129,1	109,8±54,0	a,c
Colesterol total (mg/dL)	203,7 ± 37,4	203,4±104,6	190,8±62,1	
Bilirrubina total (mg/dL)	0,6 ± 0,2	<b>10,5</b> ±14,9	3,1±6,9	a
Albumina (g/dL)	4,5 ± 0,5	3,7±0,4	4,0±0,4	a,b
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	245,2 ± 75,1	307,8±131,9	224,0±59,0	
ALT (IU/L)	29,8 ± 16,7	143,4±104,3	<b>930,6</b> ±873,2	b,c
AST (IU/L)	26,0 ± 8,8	109,4±88,6	<b>538,9</b> ±620,4	b,c
$\gamma$ -GT (IU/L)	50,8 ± 51,4	<b>711,2</b> ±927,0	193,4±113,3	a
FA (IU/L)	86,1 ± 32,7	<b>390,7</b> ±346,6	121,8±46,8	a,c
Hb (g/dL)	13,9 ± 0,9	12,8±1,8	13,4±1,5	

#### **FÁRMACOS**

AINES	4 (20%)	4 (29%)
Antibióticos	5 (25%)	8 (57%)
Anabolizantes	2 (10%)	
Antifúngicos	1 (5%)	
Antihipertensivo	1 (5%)	

### 3 Resultados

Antiplaquetario		1 (5%)	
Quimioterapia		2 (10%)	1 (7%)
Inmunosupresor		3 (15%)	1 (7%)
Hipolipemiente		1 (5%)	
Antiepiléptico			
Drogas & Herboristería			
<b>Media Tratamiento (días)</b>		49	37
<b>Factor R</b>			
<2	nd	16 (88,9%)	
>2 y <5	nd	2 (11,1%)	
>5	nd		13 (100%)

Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar o como el número de casos y porcentajes (%). HN, hígado normal; COL/MIX, Colestásico/Mixto; HEP, Hepatocelular; IMC, índice de masa corporal; TG, Triglicéridos; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa;  $\gamma$ -GT, gamma-glutamilttransferasa; FA, fosfatasa alcalina; Hb, hemoglobina; AINES, Antiinflamatorio no esteroideo; R, Factor de daño hepático: ALT LSN (40 U/L), FA LSN (129 U/L); nd, no determinado.  $p < 0,05$  (ANOVA) **a** HN vs COL/MIX, **b** HN vs HEP, **c** COL/MIX vs HEP.

La cohorte de validación incluyó 9 pacientes diagnosticados de DILI colestásico/mixto y 9 pacientes con DILI hepatocelular. La cohorte presentaba un IMC dentro del rango normal de peso (IMC = 22-25), una edad promedio de 44 años y un 55,5% de hombres. Los pacientes de la cohorte también mostraron las características típicas del DILI basadas en elevaciones de las transaminasas en el grupo de DILI hepatocelular y elevaciones de los niveles de FA y  $\gamma$ -GT, aunque menos significativas, en el grupo de DILI colestásico/mixto (las características basales de esta cohorte se recogen en la Tabla 3.12). Además, los niveles de bilirrubina resultaron normales en el grupo DILI colestático, lo que indica que la patología fue más leve en esta cohorte que en los sujetos de la cohorte de estudio.

### 3 Resultados

**Tabla 3.12: Características basales de la cohorte de validación DILI**

	HN (n=17)	DILI COL/MIX (n=9)	DILI HEP (n=9)	
Edad (años)	42,9 ± 9,3	39±26	44±22	
Sexo				
Hombres	7 (41,2%)	5 (56%)	5 (56%)	
Mujeres	10(58,8%)	4 (44%)	4 (44%)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26,2 ± 3,6	22±2	25±4	a
Glucosa (mg/dL)	89,9 ± 10,7	84±10	100±28	
TG (mg/dL)	106,7 ± 36,3	129±26	151±97	
Colesterol total (mg/dL)	203,7 ± 37,4	223±102	118±65	b,c
Bilirrubina total (mg/dL)	0,6 ± 0,2	0,6±0,3	10,6±10	b,c
Albumina (g/dL)	4,5 ± 0,5	4,0±0,5	3,3±0,7	b,c
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	245,2 ± 75,1	305±106	175±102	c
ALT (IU/L)	29,8 ± 16,7	60±42	<b>1142±753</b>	b,c
AST (IU/L)	26,0 ± 8,8	41±18	<b>793±736</b>	b,c
γ-GT (IU/L)	50,8 ± 51,4	178±173	170±96	a,b
FA (IU/L)	86,1 ± 32,7	298±99	148±53	a,c
Hb (g/dL)	13,9 ± 0,9	12,8±1,6	12,5±2	
<b>FÁRMACOS</b>				
AINES		1 (10%)		
Antibióticos		3 (30%)	1 (10%)	
Anabolizantes				
Antifúngicos			1 (10%)	
Antihipertensivos			1 (10%)	
Antiplaquetario				
Quimioterapia		2 (20%)	3 (30%)	
Inmunosupresor		3 (30%)		
Hipolipemiente				
Antiepiléptico		1 (10%)		
Drogas & Herboristería			4 (40%)	
<b>Media Tratamiento (días)</b>		<b>89</b>	<b>77</b>	

<b>Factor R</b>		
$\leq 2$	nd	9 (100%)
$>2$ y $<5$	nd	
$>5$	nd	9 (100%)

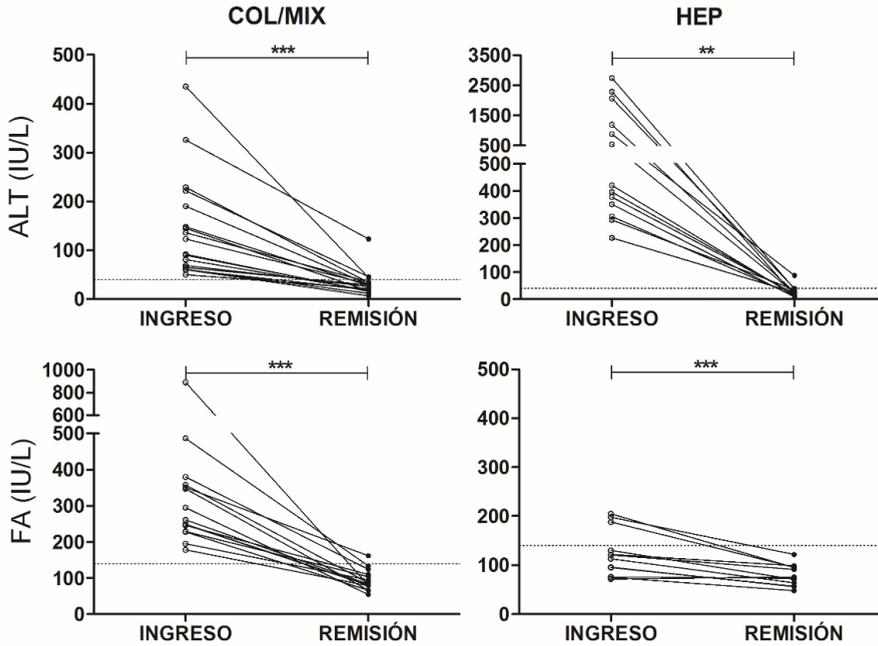
Ver pie de Tabla 3.11

Finalmente, en cuanto a la clasificación del daño hepático según el factor R, todos los pacientes del grupo hepatocelular presentaron un  $R \geq 5$  (tanto en la cohorte de estudio como la de validación), mientras que en el grupo colestásico/mixto sólo hubo dos pacientes clasificados como mixtos (en la cohorte de estudio); el resto tuvieron un  $R \leq 2$ , que define el DILI colestásico.

#### **3.21 Niveles circulantes de miRNAs asociados a fármacos colestásicos en pacientes de DILI**

Los niveles séricos de cada miRNA se analizaron en primer lugar en la cohorte de estudio, a dos tiempos distintos para cada paciente: ingreso y remisión. En primer lugar, el análisis de los niveles séricos de ALT y FA en estos dos puntos de tiempo demostró que ambas enzimas alcanzan los niveles normales de referencia en la remisión (Figura 3.26). De esta forma, podríamos considerar a cada paciente su propio control en la fase de recuperación. Los resultados muestran que, en el momento del ingreso, los niveles de ALT eran mucho más elevados en el DILI hepatocelular, mientras que los niveles de FA resultaron significativamente más elevados en el DILI colestásico.

### 3 Resultados

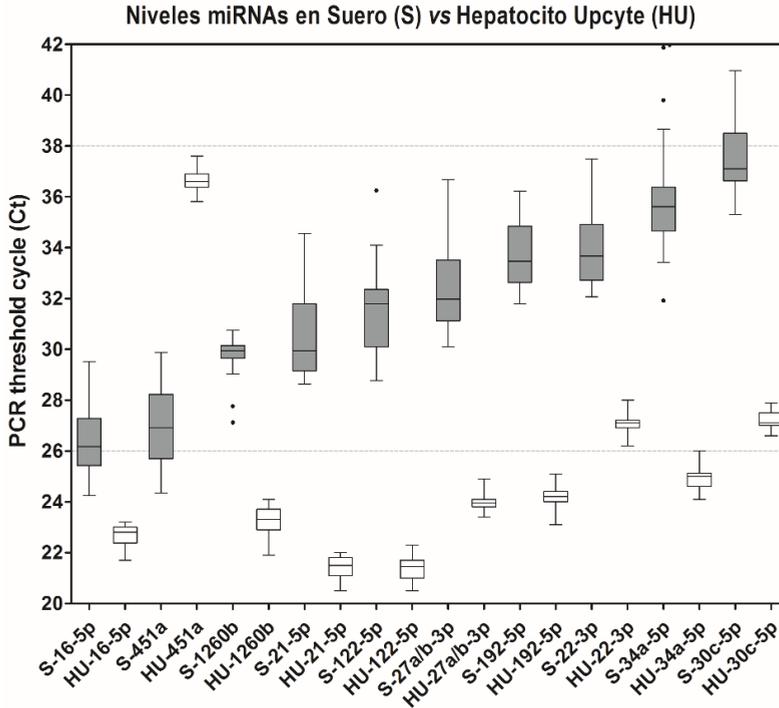


**Figura 3.26:** Niveles séricos de ALT y FA en pacientes con DILI en el momento del ingreso y remisión. La cohorte de estudio se dividió en dos grupos según el valor de R: DILI colestásico/mixto ( $R < 5$ ) y DILI hepatocelular ( $R \geq 5$ ). Se comparó el nivel sérico de ALT y FA en ambos momentos para cada paciente. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , prueba t pareada.

Con respecto a los miRNAs, ya se ha comentado que las concentraciones séricas son mucho más bajas que las concentraciones intracelulares, lo que limita o impide la detección fiable de algunos de los miRNAs seleccionados en los estudios *in vitro*. Precisamente, los miR-27a-5p y miR-21-3p, que son hebras pasajeras de baja expresión, no pudieron detectarse en las muestras séricas bajo nuestras condiciones experimentales. En la Figura 3.27, se representa una comparación de las concentraciones relativas de los miRNAs (expresadas como valores de Ct) en los cultivos de hepatocitos humanos y en el suero de los pacientes. Tal como cabe esperar, se observa mayor dispersión en las cajas

### **3 Resultados**

pertencientes a las muestras de suero de pacientes. La mayoría de los miRNAs analizados presentaron una buena proporcionalidad entre su concentración en hepatocitos y en suero. Así, los miRNAs abundantes en los hepatocitos como el miR-16, -1260, -21 y -122 (Ct más bajo), también fueron los más abundantes en el suero humano (Fig.3.27), mientras que los miRNAs con una expresión más baja intracelularmente (Ct más elevado) como el miR-22, -34a y -30c, también resultaron los miRNAs circulantes menos abundantes. El miRNA que resultó más discrepante fue el miR-451a, que mostró una concentración mucho más elevada en suero que en los hepatocitos. Pero estos resultados no coinciden con los datos públicos que hemos consultado de RNAseq humanos en los que el miR-451a resulta ser elevado también intracelularmente. Estas diferencias podrían deberse a una característica específica del donante de las células Upcyte que se utilizó en los ensayos o a una importante contribución de otros tejidos, además del hígado, al nivel circulante del miRNA.

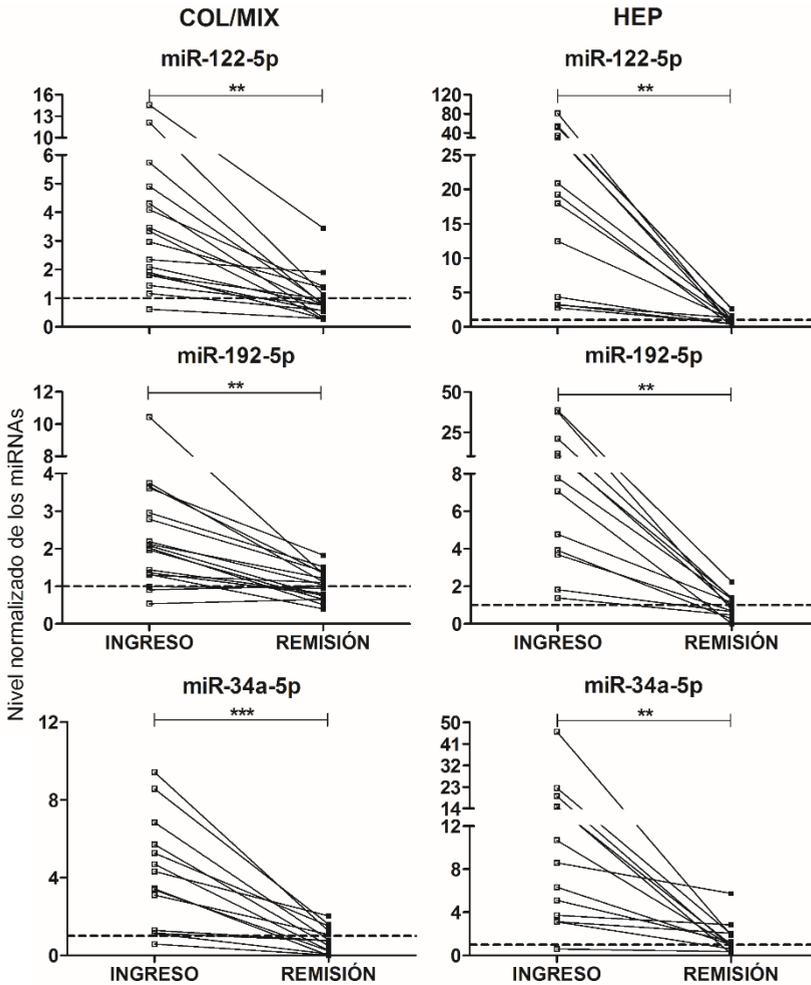


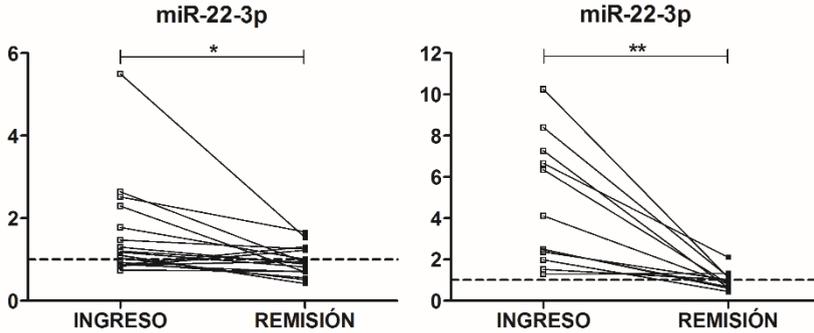
**Figura 3.27: Expresión de miRNAs alterados en suero y hepatocitos humanos.** El RNA total se purificó a partir de 48 muestras de suero (S) o de 74 muestras de hepatocitos Upcyte (HU), y el nivel de expresión de 10 miRNAs se determinó por RT-qPCR. Los resultados se representan como “PCR threshold cycles” (Ct) en gráficos de cajas. Las líneas de puntos horizontales en los ciclos 26 y 38 delimitan los niveles de expresión del suero para la mayoría de los miRNA analizados.

El análisis detallado de los niveles de los miRNAs en el suero de los pacientes de DILI demostró que la mayoría estaban alterados significativamente en el momento del ingreso (Figuras 3.28 y 3.29). En cuanto a las diferencias entre DILI colestásico/mixto y DILI hepatocelular, los miR-122, -192, -34a y -22 alcanzaron niveles circulantes mucho más elevados en el grupo hepatocelular, de modo similar a los niveles séricos de ALT (Fig.3.28). Por ejemplo, el incremento en la expresión del miR-122 fue de hasta 300 veces en el DILI

### 3 Resultados

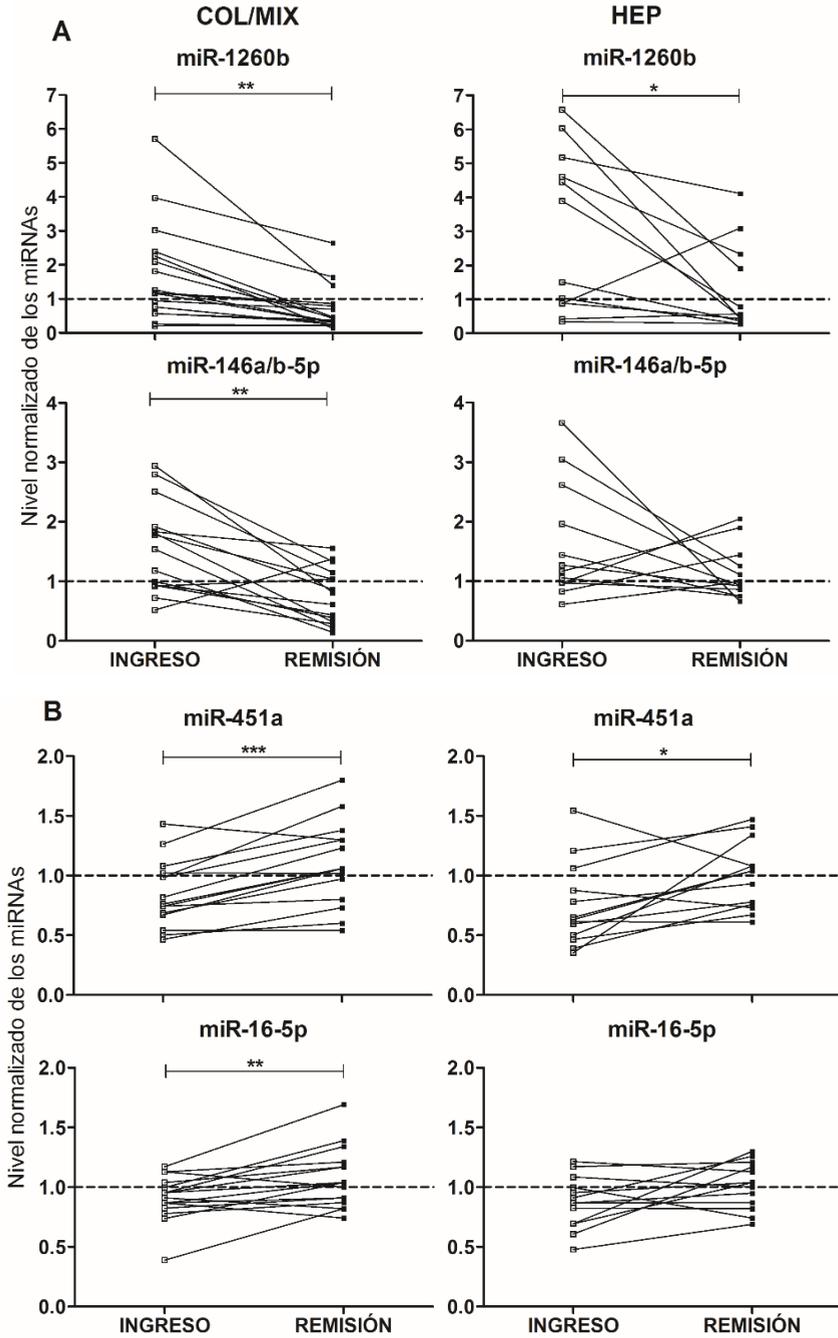
hepatocelular, mientras que en el DILI colestásico fue de tan solo 13 veces. Por lo tanto, a pesar de que estos cuatro miRNAs circulantes resultaron significativamente alterados en los ensayos *in vitro* por compuestos colestásicos, no parecen ser específicos de esta condición y, en cambio, podrían considerarse biomarcadores del DILI hepatocelular.





**Figura 3.28: miRNAs preferentemente alterados en el suero de pacientes con DILI hepatocelular.** La cohorte de estudio se dividió en dos grupos según el valor de R: DILI colestásico/mixto (COL/MIX) y DILI hepatocelular (HEP). Los niveles séricos de los miRNAs se analizaron tal como se describe en la Fig.3.25. Se realizó una comparación pareada entre los niveles al ingreso y remisión. Los miR-122, -192, -34a y -22 se alteraron mucho más significativamente en los pacientes con DILI hepatocelular. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , prueba t-pareada.

En contraste, cuatro miRNAs mostraron unas diferencias más significativas en los pacientes de DILI colestásico (Fig.3.29). Los miR-1260b y miR-146a resultaron inducidos en los sueros de pacientes colestásicos al ingreso, sin embargo, en el grupo de DILI hepatocelular, la alteración de estos miRNAs no fue tan consistente (Fig.3.29-A). Del mismo modo, los miR-451a y miR-16-5p mostraron niveles significativamente más bajos en los pacientes de DILI colestásico al ingreso, mientras que no mostraron diferencias importantes en el DILI hepatocelular (Fig.3.29-B). Por lo tanto, estos cuatro miRNAs (miR-1260b, -146a, -451a y -16) podrían postularse como biomarcadores circulantes más específicos para el DILI colestásico, aunque la magnitud de los cambios fue mucho más modesta.



*Figura 3.29: miRNAs preferentemente alterados en el suero de pacientes con DILI colestásico/mixto. La cohorte de estudio se dividió en dos grupos según el valor*

### **3 Resultados**

de R: DILI colestásico/mixto (COL/MIX) y DILI hepatocelular (HEP). Los niveles séricos de los miRNAs se analizaron tal como se describe en la Fig.3.25. Las diferencias en el miR-1260b y miR-146a/b (inducidos, **panel A**), y en los miR-451a y miR-16 (inhibidos, **panel B**) fueron más significativas en los pacientes con DILI colestásico/mixto. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , prueba t-pareada.

Por último, otros dos miRNAs (miR-21 y miR-30c) también resultaron significativamente inducidos en el suero de los pacientes DILI al ingreso, pero no mostraron diferencias marcadas entre los dos fenotipos de DILI.

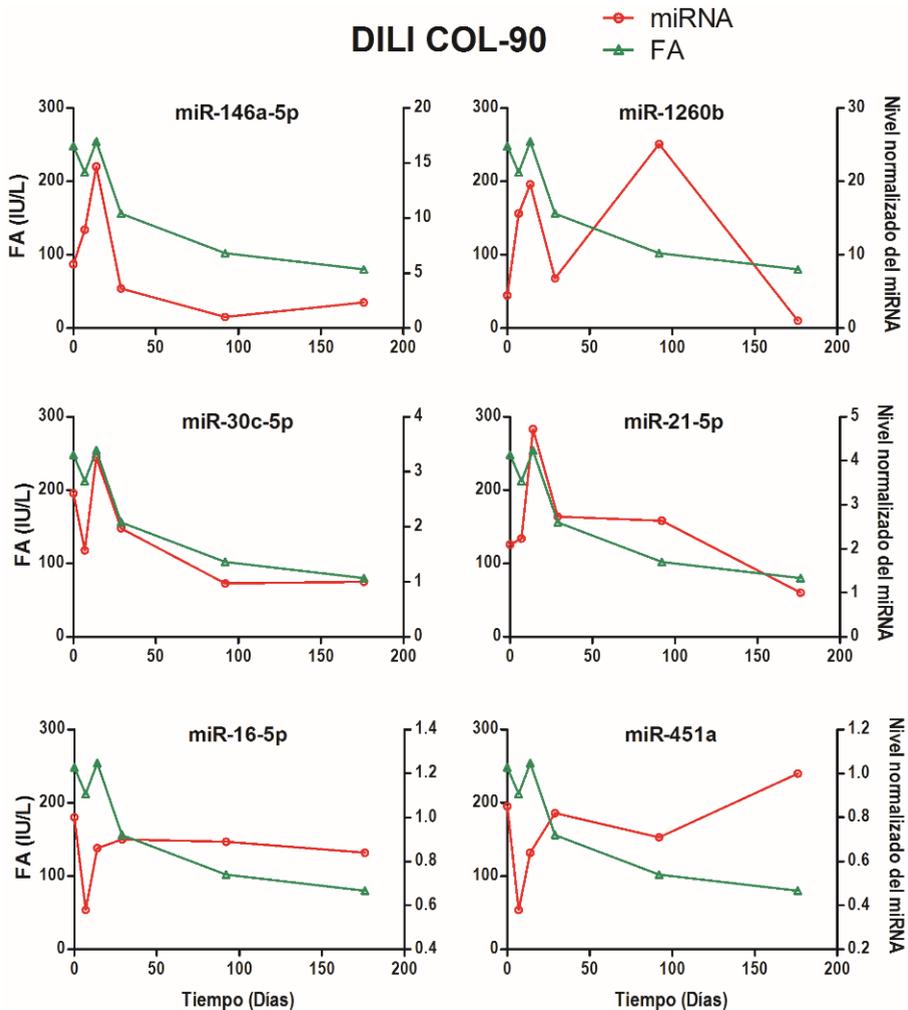
#### **3.22 Análisis secuencial de miRNAs circulantes en el suero de pacientes de DILI**

La caracterización de los biomarcadores no invasivos para DILI en solo dos puntos del proceso patológico (ingreso hospitalario *versus* remisión del DILI) puede que no sea lo suficientemente informativa para predecir la gravedad. De algunos pacientes de la cohorte de estudio disponemos de muestras de suero seriadas a lo largo del curso temporal de la enfermedad. Gracias a ello, pudimos realizar un análisis de los miRNAs alterados a lo largo del tiempo, desde el inicio del DILI hasta el alta hospitalaria, y comparamos los resultados obtenidos con los perfiles de las enzimas FA y ALT a los mismos tiempos.

El análisis de las muestras de suero secuenciales de un paciente con DILI colestásico (COL-90) demostró que los niveles séricos de los miR-146a/b-5p, -1260b, -30c-5p y -21-5p progresaron con un curso temporal similar al de la FA (Figura 3.30), resultados que además son consistentes con las correlaciones significativas entre la actividad de esta enzima y los niveles de los cuatro miRNAs ( $R_{\text{Pearson}} 0,53-0,81$ ). Además, los miR-1260b y miR-146a/b-5p mostraron rangos dinámicos más

### 3 Resultados

amplios que la FA (Fig.3.30), lo que podría ser positivo de cara al diagnóstico de la gravedad. Por el contrario, otros dos miRNAs (miR-16-5p y -451a) tuvieron comportamientos opuestos a lo largo de la curva temporal y, aumentaron sus niveles en el suero del paciente cuando la FA disminuyó.

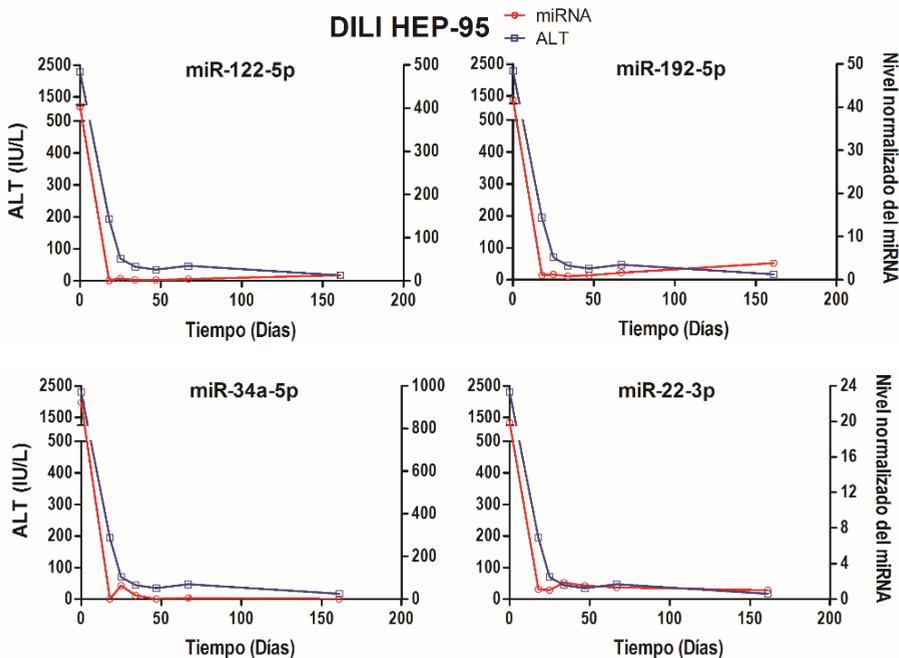


**Figura 3.30:** Evolución temporal de los miRNAs en suero de un paciente de DILI colestásico y su relación con el perfil de FA. Se analizó el nivel sérico de los miRNAs mediante RT-qPCR en un total de seis muestras secuenciales de suero, desde el ingreso a la remisión, del paciente COL-90. Los niveles de los miRNAs se

### 3 Resultados

compararon con el perfil de FA medida a los mismos tiempos. Los perfiles de los miRNAs (curvas rojas) coincidieron (miR-146a/b, -1260b, -30c, -21) o se opusieron (miR-16, -451a) al perfil de la FA (curva verde).

Por otro lado, también se analizaron las muestras secuenciales de suero de un paciente con DILI hepatocelular (HEP-95). Los resultados mostraron que los miRNAs distintivos del DILI hepatocelular 122-5p, -192-5p, -34a-5p y -22-3p presentaron perfil similar y alta correlación con los niveles de la ALT (Figura 3.31) ( $R_{\text{Pearson}} > 0,72-0,96$ ). Estos miRNAs alcanzaron niveles de normalidad muy rápido, incluso antes que la normalización de la ALT. Además, los miR-122-5p y miR-34a-5p mostraron rangos dinámicos más amplios que la enzima (Fig.3.31).



**Figura 3.31:** Evolución temporal de los miRNAs en suero de un paciente seleccionado de DILI hepatocelular y su relación con el perfil de ALT. Se analizó el nivel sérico de los miRNAs mediante RT-qPCR en un total de siete muestras de suero secuenciales desde el ingreso a la remisión de un paciente de DILI hepatocelular (HEP-95). Los niveles de los miRNAs se compararon con el perfil de

### **3 Resultados**

*ALT a los mismos tiempos. Los niveles séricos de miR-122, -192, -34a y -22 (curvas rojas) mostraron una evolución temporal muy similar al perfil de la ALT (curva azul).*

En resumen, hemos probado que el nivel sérico de varios miRNAs seguía una respuesta muy similar al perfil en el suero de la FA en un paciente con DILI colestásico, mientras que otro grupo de miRNAs mostraron un curso temporal igual a la ALT en el suero de un paciente con DILI hepatocelular. En ambos casos, algunos de estos miRNAs demostraron mejores rangos dinámicos que las propias enzimas, lo que podría suponer mejoras para el diagnóstico del DILI en cuanto a la sensibilidad y a la detección temprana.

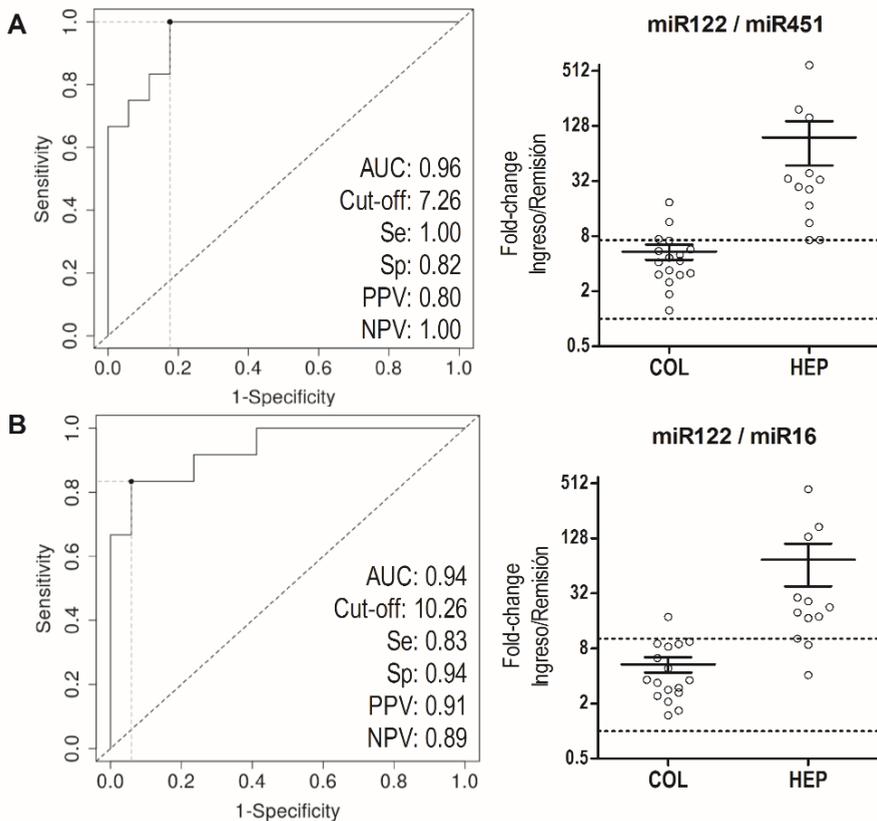
#### **3.23 Análisis del rendimiento de los nuevos miRNAs como biomarcadores para la clasificación de pacientes de DILI**

Una última pregunta que nos hicimos es si estos miRNAs alterados en el suero de los pacientes con DILI tienen un valor predictivo capaz de discriminar entre fenotipo de DILI colestásico o DILI hepatocelular.

Se realizó un análisis mediante curvas ROC del rendimiento diagnóstico de estos biomarcadores séricos en nuestra cohorte de estudio. Como ya ocurrió con los pacientes con EHGNA del capítulo anterior, algunos miRNAs séricos son inducidos y otros reprimidos en los pacientes de DILI, de tal forma que los cocientes entre ambos podrían generar nuevas variables diagnósticas con un mayor potencial de discriminación. El mejor rendimiento diagnóstico se obtuvo con el cociente miR-122/miR-451a, que mostró un AUROC de 0,956 (Fig.3.32-A). La mejor separación entre ambos grupos de pacientes se logró con un valor de corte de 7,26, con el que la identificación del DILI colestásico mostró una

### 3 Resultados

sensibilidad del 100% y una especificidad del 82%. Por otro lado, el cociente de miR-122/miR16 también obtuvo un buen potencial de predicción con un valor de AUROC de 0,936 (Fig.3.32-B). La mejor separación de pacientes con DILI colestásico vs hepatocelular se logró con un valor de corte de 10,26, lo que permitía una sensibilidad del 83% y una especificidad del 94%.

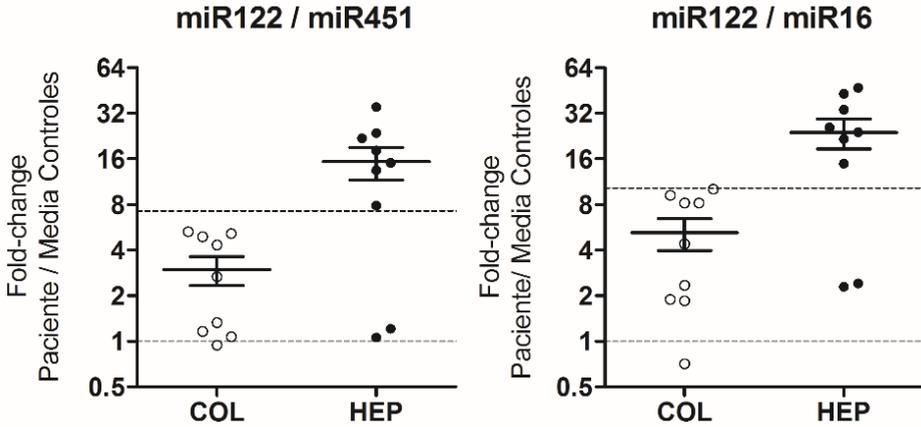


**Figura 3.32: Análisis de curvas ROC de nuevos biomarcadores de miRNAs para la clasificación del DILI.** Se analizaron los cocientes de miRNAs seleccionados como biomarcadores predictivos para discriminar entre DILI hepatocelular (HEP) y colestásico (COL) en la cohorte de estudio. Los valores de los cocientes de los miRNAs se expresaron como cambios entre el ingreso y la remisión para cada paciente. La línea de puntos horizontal superior representa la separación de ambos grupos según el valor de corte óptimo según el índice de Youden. AUC,

### **3 Resultados**

*área bajo la curva; Se, sensibilidad; Sp, especificidad; PPV, valor predictivo positivo; NPV, valor predictivo negativo.*

Por último, quisimos validar estos resultados en una cohorte independiente, que incluyó 9 pacientes con DILI colestásico y 9 pacientes con DILI hepatocelular (ver las características basales de esta cohorte en la Tabla 3.12). Sin embargo, el DILI fue más leve en el grupo colestásico, ya que los niveles de bilirrubina eran normales y los niveles de FA y de  $\gamma$ -GT fueron más bajos que los de la cohorte de estudio. Además, como las muestras de suero de estos pacientes se recolectaron solo en el momento del ingreso, los niveles del miRNA no pudieron analizarse frente al momento de la remisión, y los resultados tuvieron que referirse al valor promedio en el grupo de control. A pesar de estas limitaciones, los resultados demostraron que los cocientes miR-122/miR-451a y miR-122/ miR-16 permiten una separación correcta de la mayoría de los pacientes de los grupos hepatocelular y colestásico, de acuerdo con los valores de corte definidos previamente (Figura 3.33). Todos los pacientes de DILI colestásico se clasificaron con precisión, mientras que sólo 2 de los 9 con DILI hepatocelular se predijeron erróneamente. Más concretamente, el análisis del rendimiento diagnóstico mostró un AUROC de 0,827 y 0,864 para miR-122/miR-451a y miR-122/miR-16, respectivamente. La identificación del DILI colestásico se realizó con una sensibilidad del 78% y una especificidad del 100%, con ambos cocientes de miRNA. Los resultados demuestran que los biomarcadores propuestos tienen un rendimiento notable y similar para diagnosticar el DILI idiosincrásico colestásico frente al hepatocelular.



**Figura 3.33: Análisis de biomarcadores de miRNAs para la clasificación del DILI en una cohorte de validación.** Los cocientes de los miRNAs séricos se analizaron en una cohorte de validación independiente. La separación de los grupos (COL y HEP) se realizaron según el valor de corte óptimo definido en la Fig.3.32. Los valores al ingreso están referidos al valor promedio del grupo control.



## **4- DISCUSSION**



El diagnóstico de la hepatotoxicidad iatrogénica se basa, actualmente, en un diagnóstico por exclusión. Además, los biomarcadores convencionales son inespecíficos y las pruebas diagnósticas invasivas. En nuestros estudios demostramos que los fármacos alteran la expresión *in vitro* de un conjunto de miRNAs, que posteriormente resultaron alterados significativamente en el suero de pacientes diagnosticados de EHGNA y DILI (colestásico y hepatocelular).

### **4.1 Búsqueda de biomarcadores de esteatosis iatrogénica.**

La patogénesis de la EHGNA y su progresión a EHNA es el resultado de la interacción entre factores genéticos y factores ambientales, y los fármacos se consideran uno de los factores ambientales más relevantes. El hígado graso iatrogénico ocurre solo en algunos individuos, particularmente en aquellos que presentan factores de riesgo primarios (63), y entre ellos, la EHGNA de carácter metabólico podría considerarse un factor de susceptibilidad en el daño hepático por medicamentos (219). De esta forma, la EHGNA se asocia con disfunción mitocondrial y disminución de la producción de energía hepática (220), que puede sensibilizar al hígado al efecto de los fármacos esteatósicos, pues muchos también interfieren en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los AG (221). Un estudio reciente (222) respalda la idea de que la EHGNA puede potenciar la esteatosis iatrogénica. El estudio mostró que el estrés metabólico inducido por una dieta rica en grasas en ratones potenciaba la esteatosis derivada del tratamiento con ácido valproico.

Uno de los principales inconvenientes de investigar la esteatosis inducida por fármacos en la EHGNA es la dificultad que conlleva

## **4 Discusión**

diferenciar entre la influencia del factor metabólico (grasa proveniente de la dieta) y la contribución de los fármacos. Nuestro trabajo se centra en los miRNAs como biomarcadores capaces de discriminar entre ambas condiciones y analizar la contribución de los fármacos comúnmente prescritos a la EHGNA.

En nuestros estudios utilizamos CYCA como fármaco esteatósico modelo y observamos la alteración significativa de cerca de 80 miRNAs en cultivos de células HepG2. Estos resultados están en concordancia con un estudio previo en el que se observó la alteración de 91 miRNAs en células HepG2 tratadas con CYCA (20 $\mu$ M) (223). Este fármaco es un inmunosupresor cuya ventana terapéutica es muy estrecha debido a sus efectos adversos, incluyendo la hepatotoxicidad (224), ya que induce la acumulación de grasa en cultivos de hepatocitos y células HepG2 (183). Sin embargo, CYCA también puede alterar otras rutas e inducir otros efectos adversos (como la colestasis), por lo que puede que no todos los miRNAs alterados se asocien con la esteatosis iatrogénica.

Para encontrar un patrón común, comparamos CYCA con otros fármacos esteatósicos modelo en cultivos de células HepG2: VALP, DOXY, AMIO y TAMO. La expresión de varios miRNAs fue inducida por la mayoría de estos compuestos, destacando los miR-21, -22, -24-2, -27a, -29a, -202, -663a, -1260 y -3929 (Figura 4.1).

Estos resultados demuestran por primera vez que los compuestos esteatósicos modelo producen una huella común en el perfil de expresión de los miRNAs en cultivos celulares de HepG2. Además, también incrementan la liberación de estos miRNAs al medio extracelular.

## 4 Discusión

Algunos de estos miRNAs (miR-21, -22, -24, -27a y -29a) regulan genes y rutas relacionadas con el metabolismo lipídico (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1: Genes diana relacionados con el metabolismo lipídico de algunos miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica.**

<b>miRNA</b>	<b>Genes diana relacionados con metabolismo lipídico</b>	<b>Referencias</b>
<b>miR-21</b>	FABP7, PPAR $\alpha$ , IGFBP3	(225)
<b>miR-22</b>	ACLY, ELOVL6, MAT1A, PTEN	(226-228)
<b>miR-24</b>	FASN, SREBP1c, SCD, ACAC, INSIG1, ARNT	(229-231)
<b>miR-27a</b>	LDLR, RXR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$ , FASN, SREBPs, ApoA1, ApoB, ApoE3	(232-235)
<b>miR-29a</b>	LPL, PTEN, FXR, SIRT1 AHR	(204, 236-238)

En este trabajo intentamos demostrar experimentalmente la asociación entre alguno de los miRNAs de esteatosis iatrogénica y alguno de sus posibles mRNA diana, sin embargo, los resultados no fueron concluyentes. Entre las posibles causas podemos sugerir la función redundante de algunas familias de miRNAs (la pérdida de función de un miRNA puede verse compensada por otros de la misma familia), la expresión muy abundante o saturante de algunos miRNAs (la ganancia de función no tendría efecto) o que el tiempo de transfección pudo ser insuficiente para observar cambios más importantes en la expresión de los niveles de mRNAs y proteína dianas.

Nuestra búsqueda de biomarcadores de esteatosis iatrogénica se realizó en la línea celular HepG2, células que derivan de un

## **4 Discusión**

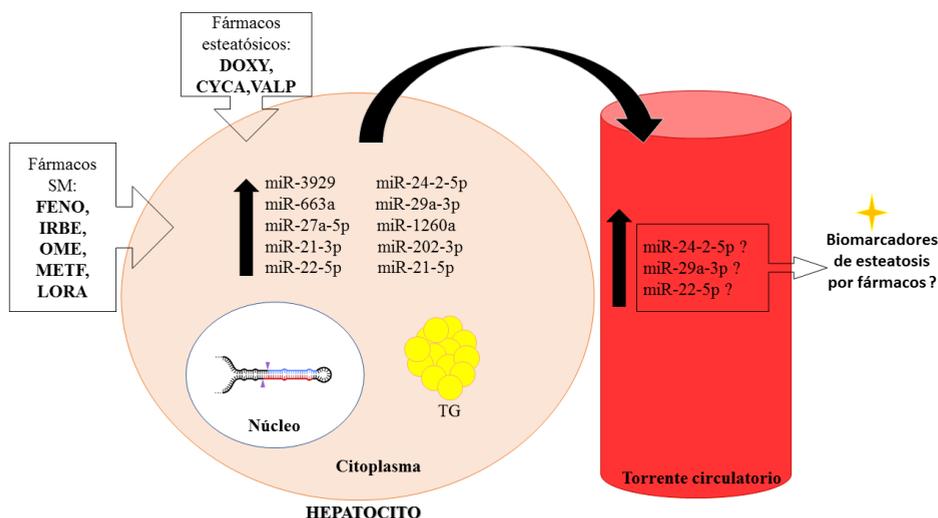
hepatocarcinoma y cuya respuesta a los fármacos puede verse alterada, así como el perfil de expresión de los miRNAs. Sin embargo, un estudio previo comparó el miRNoma de las células HepG2 y los hepatocitos humanos y sólo un 10% de los miRNAs se encontraron expresados diferencialmente en HepG2 (239). De los miRNAs identificados en este estudio, sólo el miR-21-3p se encuentra inducido en las células HepG2 respecto a los hepatocitos humanos.

La EHGNA está muy relacionada con la obesidad, la resistencia a la insulina, la hipertensión y las dislipemias y es por ello por lo que hoy en día se considera la manifestación hepática del SM. En estos pacientes, las terapias combinadas para tratar todas estas condiciones, son administradas de forma crónica durante semanas, meses o años, y pueden desencadenar la acumulación del fármaco o sus metabolitos en el hígado causando hepatotoxicidad (63). Estudiamos la posibilidad que algunos de los fármacos comunes prescritos para el SM pudiesen ser esteatósicos. Para ello, analizamos el efecto de 17 compuestos diferentes en el miRNoma de las células HepG2 y observamos que algunos de ellos fueron capaces de inducir los miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica, particularmente cuando los fármacos se combinaban entre ellos (Figura 4.1). Además, también se observó una acumulación de AG, especialmente de TG en los cultivos de HepG2. Los fármacos que demostraron un mayor potencial esteatósico fueron FENO, IRBE, METF, OMEP y LORA.

Estos resultados tienen importancia clínica ya que demuestran por primera vez que algunos fármacos comúnmente prescritos a pacientes con SM inducen la acumulación de TG y la expresión de los miRNAs biomarcadores de esteatosis inducida por fármacos, en células HepG2,

## 4 Discusión

especialmente en combinaciones farmacológicas. Lo que refuerza la idea de que la esteatosis puede agravarse en los pacientes con EHGNA metabólica como consecuencia de los tratamientos farmacológicos de las condiciones asociadas (diabetes, hipertensión, dislipemias, etc.).



**Figura 4.1:** miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica. Los fármacos esteatósicos modelo y algunos de prescripción común en pacientes con SM inducen, además del acúmulo de TG, la expresión intracelular de un grupo de miRNAs en hepatocitos. Tres de ellos resultaron también significativamente inducidos en el suero de pacientes que tomaban fibratos.

Algunos de los miRNAs biomarcadores identificados en los estudios *in vitro* pudieron ser cuantificados y validados de forma fiable en el suero de los pacientes. Uno de los fármacos comunes para tratar el SM que resultó particularmente inductor de los miRNAs biomarcadores fue el FENO. Los fibratos son agonistas de PPAR $\alpha$  utilizados en la clínica para mejorar los niveles plasmáticos de TG y el perfil de lipoproteínas aterogénicas. Algunos estudios demuestran que además mejoran la esteatosis hepática (240), mientras que en otros estudios la terapia con

## **4 Discusión**

FENO en ratones la agrava (241, 242). Nuestros resultados demuestran que FENO es responsable tanto de la acumulación de lípidos como de la inducción de miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica en cultivos de HepG2 y que, además, el grado de esteatosis y los miRNAs biomarcadores séricos aumentaron significativamente en pacientes de EHGNA que tomaban fibratos.

Estos resultados son la prueba de concepto de que existen miRNAs circulantes que podrían permitir identificar pacientes en los que la esteatosis tenga un origen iatrogénico, lo que permitiría prescribirles otros fármacos menos esteatóxicos y evitar la progresión y gravedad de la EHGNA. La validación de nuestros hallazgos requiere cohortes de pacientes bien definidas (homogéneas) y con un n suficiente, algo que resulta complicado dada la gran diversidad de fármacos y combinaciones de los mismos que toman estos pacientes.

Con respecto a la EHGNA de origen metabólico, hemos reexaminado el valor predictivo de los miRNAs postulados en un total de 14 estudios previos (junto con los miRNAs de esteatosis iatrogénica identificados en nuestro trabajo) en una nueva cohorte de pacientes de EHGNA del Hospital La Fe. Del total de 18 miRNAs previamente postulados como biomarcadores de EHGNA, 16 fueron detectados de forma fiable en el suero de los pacientes, pero sólo 9 de ellos (miR-34a, -192, -27b, -122, -22, -21, -197, -30c y -16) mostraron alteraciones significativas en los pacientes con un grado más grave de la patología. Hay que señalar que tres de los estudios previos publicados se enfocaron en identificar miRNAs asociados a la condición de EHGNA positivo, sin tener en cuenta la gravedad de la enfermedad (208, 209, 213). En dos de

## **4 Discusión**

estos tres estudios, la gravedad no pudo ser determinada de forma fiable porque no se realizó biopsia hepática a los pacientes. En concreto, en el estudio de Yamada *et al*, los pacientes se diagnosticaron mediante escáner de ultrasonidos y se observó que los niveles séricos de los miR-122 y miR-34a eran más elevados en pacientes con EHGNA. Por otro lado, Zarrinpar *et al* buscaron identificar miRNAs con diferente expresión en parejas de gemelos que presentaban diferencias en la patología. En este estudio los pacientes se diagnosticaron mediante resonancia magnética del hígado y se observó, que los niveles en suero del miR-30c, eran más bajos en gemelos tanto con EHGNA concordante como discordante. En el último de los tres estudios mencionados, los autores identificaron un panel de miRNAs circulantes (entre los que se incluyen el miR-122, -192 y -27b) con una gran precisión para predecir pacientes de EHGNA, pero, aunque los pacientes si fueron biopsiados, el rendimiento de estos miRNAs para predecir la EHNA o la fibrosis avanzada no se evaluó (208).

Nuestro estudio y otros de los reexaminados (174, 212, 243-246) demuestran que algunos de los miRNAs identificados (por ejemplo, el miR-34a, -122 y -192) se asocian con la gravedad de la enfermedad además de predecir la condición de paciente de EHGNA. Además, nuestros resultados muestran por primera vez que los niveles séricos de los miR-27b y miR-30c están alterados significativamente tanto en la fibrosis avanzada como en la EHNA (247). No obstante, el diagnóstico rutinario de la EHGNA en la población general se realiza mediante ultrasonografía y otras técnicas de imagen (248), y no existen pruebas específicas y sensibles que diferencien la EHNA/fibrosis de la esteatosis simple (217). Por ello, la mayoría de los estudios publicados desde hace

unos años intentan identificar biomarcadores asociados con la gravedad (Tabla 4 del Anexo I).

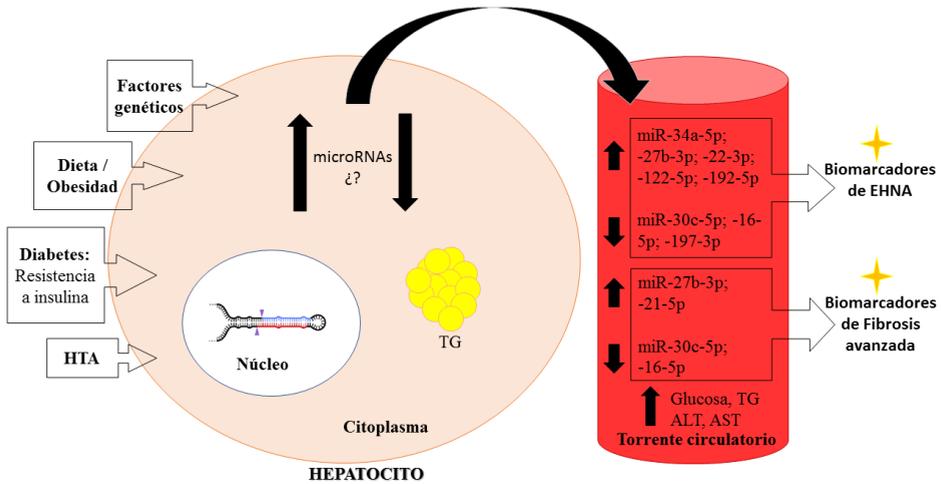
En muchos estudios se ha observado que el miR-122 se incrementa significativamente en el suero de los pacientes con EHNA (174, 212, 243-246), sin embargo, no hay muchos que analicen el nivel sérico del miR-122 en los pacientes con un grado de fibrosis grave. En dos estudios llegaron a conclusiones opuestas. Mientras que uno mostró valores séricos del miR-122 aumentados en esos pacientes (174), los autores del otro estudio sostienen que el miR-122 disminuye en los pacientes con fibrosis grave (179). Akuta *et al* demostró en su trabajo que el miR-122 tiene un comportamiento dual, su nivel aumenta en estadios tempranos, pero va disminuyendo a medida que progresa la fibrosis (212). Nuestros resultados concuerdan con este comportamiento del miR-122 y además se observó también en los niveles séricos del miR-192. Este es un hallazgo importante, pues limita el uso del miR-122 y de otros miRNAs con un comportamiento similar para predecir la fibrosis grave si se compara los estadios F0-2 (nada/leve/moderada) vs F3-4 (grave). Es por ello, que el miR-122 puede ser postulado como un buen biomarcador de EHNA, pero no de fibrosis avanzada. El miR-122 representa el 75% del total de miRNAs hepáticos y su expresión es específica en el hígado, donde regula, entre otros, procesos como el metabolismo del colesterol y los ácidos grasos libres, el crecimiento de los carcinomas hepatocelulares y la replicación del virus de la hepatitis C (249). El miR-122 circulante se correlaciona con la muerte celular hepática tras una lesión inducida por virus, alcohol, tóxicos o fármacos, lo que sugiere que los niveles séricos de este miRNA simplemente indican la muerte de células hepáticas tras

## **4 Discusión**

diferentes situaciones patológicas (250). Esta idea está en consonancia con la fuerte correlación observada en nuestro estudio entre el miR-122 y las transaminasas hepáticas ALT y AST, así como el incremento observado en el suero de los pacientes con DILI de carácter hepatocelular.

Los niveles séricos de miR-192 (174, 244, 246), miR-34a (243, 246) y miR-22 (216, 251) también estaban incrementados en el suero de los pacientes de EHNA y nuestros resultados concuerdan con estos hallazgos previos. De forma similar, el miR-197 correlaciona negativamente con la inflamación asociada a la EHNA (252), lo que concuerda con nuestros resultados en los que los pacientes de EHNA muestran un nivel sérico de este miRNA más bajo. En resumen, nuestro estudio ha validado los hallazgos anteriores para los miR-122, -34a, -192, -22 y -197 como biomarcadores de EHNA (Figura 4.2).

En cuanto al miR-16, los resultados obtenidos fueron discrepantes respecto a dos estudios previos. Cermelli *et al* (243) observó un aumento del nivel sérico del miR-16 en pacientes con esteatosis simple, mientras que los resultados de Liu *et al* (246) mostraron niveles elevados del miR-16 en el suero de pacientes con EHNA y correlaciones con el estadio de fibrosis. Por el contrario, nuestros resultados muestran una disminución significativa de los niveles del miR-16 tanto en pacientes de EHNA como en la fibrosis avanzada, además de una fuerte correlación negativa con los niveles de la AST hepática y los algoritmos de predicción de fibrosis (Fig. 4.2). Una posible explicación sería la abundancia de este miRNA en otras células además de las hepáticas (como los eritrocitos) (253), lo que supondría que su liberación a la circulación estaría influenciada por otros procesos no hepáticos como la hemólisis de los eritrocitos.



**Figura 4.2: miRNAs biomarcadores de gravedad en el hígado graso no-alcohólico.** La patogenia de la EHGNA es multifactorial. Factores genéticos, dieta, patologías de base, desajustes metabólicos, fármacos etc. favorecen la esteatosis y la alteración en el nivel de expresión de miRNAs en el hepatocito. El análisis de los niveles circulantes de miRNAs en el suero de pacientes con EHGNA y SM mostró que miR-34a, -27b, -22, -122, -192 (inducidos); -30c, -16 y -197 (inhibidos) podrían postularse como biomarcadores de EHNA. Mientras que los niveles circulantes de los miR-27b, -21 (inducidos); -30c y -16 (inhibidos) resultaron alterados en el suero de pacientes con fibrosis avanzada.

Uno de los puntos importantes a destacar de nuestro estudio, es la correcta relación entre el nivel intracelular y el nivel circulante de la mayoría de los miRNAs validados. Los resultados de un estudio reciente (254) confirman que varios de estos miRNAs (miR-192, -27b, -197 y -30c) están alterados en el medio extracelular de cultivos de células hepáticas humanas incubadas con AG. Las alteraciones observadas en el medio extracelular coinciden con las observadas en el suero humano (por ejemplo, los niveles del miR-192 y el miR-27b están aumentados mientras que los de los miR-197 y -30c están disminuidos).

## **4 Discusión**

En cuanto al poder predictivo de los miRNAs biomarcadores, hemos observado rendimientos similares entre los miRNAs y los marcadores séricos convencionales como las transaminasas. Sin embargo, hemos demostrado que los cocientes entre miRNAs inducidos e inhibidos superan el rendimiento predictivo de los marcadores clásicos para la EHNA. En estudios previos, los mejores miRNAs postulados fueron: miR-34a, -122, -192 y -375 (174, 243, 245, 246). Los análisis de las curvas ROC para estos miRNAs demostraron unos valores de AUROC comprendidos entre 0,68 y 0,76. Por otra parte, en el estudio de Becker (244), un panel de miRNAs basado en los miR-122, -192 y -21 mostró un AUROC de 0,81. En nuestro estudio los miRNAs con mejor rendimiento predictivo fueron el miR-34a (para la clasificación de los pacientes según el SAF *Activity*) y el miR-27b (para la clasificación de los pacientes según el NAS *score*) que mostraron unos valores de AUROC de 0,76 y 0,73 respectivamente, que son valores comparables a los de los estudios previos. Sorprendentemente, estos valores se incrementaron significativamente con los cocientes de los miRNAs, alcanzando valores de AUROC de 0,81 (miR34a/197) y 0,79 (miR27b/30c), que además eran superiores al rendimiento obtenido para la transaminasa AST (AUROC=0,75).

El potencial de los miRNAs como predictores de fibrosis en los pacientes de EHGNA no está tan estudiado. Como ya se ha comentado, dos estudios con resultados contradictorios postulan al miR-122 como predictor de fibrosis grave. En uno el nivel sérico del miRNA disminuye (AUROC=0,82 (179)) mientras que en el otro está inducido en el suero de los pacientes (AUROC=0,61 (174)). Sin embargo, nuestros resultados y

## **4 Discusión**

los de otro grupo (210), muestran un comportamiento dual para este miRNA en la fibrosis leve (aumenta) *versus* la fibrosis grave (disminuye). En otro estudio se propone el miR-16 (aumentado en suero) como predictor de fibrosis (AUROC=0,71 (246)), pero en nuestro estudio el miR-16 disminuyó en los pacientes con fibrosis F3-4. Por último, con nuestros resultados mostramos por primera vez una asociación entre los niveles de miR-27b, -21 y -30c y la fibrosis grave (F3-4) (247) (Fig. 4.2).

Analizando el rendimiento de los miRNAs como marcadores de fibrosis grave, el miRNA que obtuvo mejores datos fue el miR-30c (AUROC=0,72) y de nuevo los cocientes mejoraban los valores, siendo el mejor cociente el miR27b/30c (AUROC=0,77). Estos valores resultaron similares a los obtenidos para los algoritmos de fibrosis como APRI y BARD (ambos con una AUROC=0,76). Sin embargo, el índice de fibrosis FIB-4 demostró el mejor rendimiento de todos (AUROC=0,85). El cociente miR-27b/197 mostró una sensibilidad superior a la del FIB-4 (83% *vs* 72%), lo que indica que este cociente podría mejorar la clasificación de los pacientes con fibrosis grave en el grupo correcto evitando los falsos negativos. Los algoritmos para el diagnóstico de la fibrosis no incluyen en sus cálculos ningún miRNA circulante (250) y según nuestros resultados pensamos que la inclusión de estos podría mejorar el rendimiento predictivo de estos algoritmos.

Por último, hemos desarrollado modelos predictivos basados en análisis multivariante PLS-DA seguido de una validación cruzada LOO-CV para poder estimar el rendimiento predictivo desde un punto de vista integral. Los modelos se construyeron con tres tipos de variables: biomarcadores clínicos convencionales, miRNAs circulantes y los dos

## **4 Discusión**

tipos de variables juntas. El modelo multivariante proporcionó un buen ajuste entre los datos y los modelos de calibración, como muestran los valores de AUROC de la Figura 3 del Anexo I. Sin embargo, nuestras estimaciones iniciales pueden ser algo optimistas en comparación a los resultados que obtuvimos posteriormente tras la validación cruzada, ya que los valores de AUROC fueron inferiores. No existe un valor umbral de AUROC que indique una clara discriminación entre las clases. Sin embargo, si tenemos en cuenta que una herramienta diagnóstica es buena cuando el AUROC es  $>0,8$  y se considera excelente si el valor de AUROC es  $>0,9$ , el AUROC comprendido entre 0,7 a 0,8 en la validación cruzada para los modelos predictivos basados en variables clínicas o en miRNAs, sugieren un rendimiento bajo como biomarcadores circulantes, aunque el modelo basado en los miRNAs (especialmente con los cocientes) funcionó ligeramente mejor. Un enfoque novedoso sería combinar ambos tipos de biomarcadores séricos (los clínicos y los miRNAs) en un solo modelo predictivo. Nuestros resultados preliminares respaldan este punto de vista, pues los modelos combinados de validación cruzada obtuvieron unos valores de AUROC de 0,82 y 0,83 para clasificar los pacientes según el SAF *Activity score* o según el grado de fibrosis grave, respectivamente.

En la mayoría de los estudios previos que hemos tratado de corroborar, los miRNAs biomarcadores postulados no fueron identificados en búsquedas *de novo* (*arrays* o secuenciación). Por ello, realizamos un estudio exploratorio basado en el análisis por RNAseq en el suero de pacientes de EHGNA *versus* EHNA, que sugiere la existencia de nuevos miRNAs adicionales candidatos a biomarcadores de EHNA que todavía no han sido investigados.

Nuestros resultados confirman que la investigación en este campo todavía permanece abierta y que los miRNAs identificados y validados en nuestros estudios podrían convertirse en biomarcadores útiles en el diagnóstico de los pacientes de EHGNA, especialmente complementando y mejorando los algoritmos de predicción actuales o los desarrollados en un futuro.

### **4.2 Búsqueda de biomarcadores de colestasis iatrogénica.**

Los biomarcadores que se utilizan para el DILI tienen limitaciones en cuanto a la especificidad y la sensibilidad. Por ejemplo, los cambios en el nivel sérico de la ALT no son específicos del DILI y puede verse alterado en varios procesos patológicos, tanto hepáticos (hepatitis virales, hígado graso o cáncer hepático), como extrahepáticos (daño muscular, daño miocárdico o ejercicio extremo) (130, 255). En cuanto a la FA las limitaciones de su uso como biomarcador son similares. En el ser humano existen cuatro tipos de FA: intestinal, placentaria, similar a la placenta y hepática/ósea/renal (no específica de tejido). La actividad sérica de la FA resulta principalmente del hígado y del hueso y a veces del tracto intestinal (256). La contribución de la fracción intestinal es mayor tras ingestas de comidas grasas. Con la edad varía la distribución en suero de la enzima y en el embarazo se ve aumentado su nivel sérico normal hasta 4 veces por el aumento de la enzima placentaria. Su actividad también se ve alterada por los fármacos: aumenta por ejemplo con los compuestos antiepilépticos, pero disminuye con el uso de fibratos (257).

En los últimos años se están postulando nuevos candidatos como biomarcadores de DILI más sensibles y con mejor rendimiento pronóstico. La enzima glutamato deshidrogenasa (GLDH) puede mejorar

## **4 Discusión**

la especificidad de los biomarcadores actuales, ya que se expresa principalmente en la región pericentral del hígado. En estudios de hepatotoxicidad por paracetamol, la citoqueratina-18 (Ck-18) y la “*high-mobility group protein 1*” (HMGB1) representan indicadores circulantes de necrosis, mientras que el fragmento de queratina-18 escindido por la caspasa (ccK-18) y la HMGB1 hiperacetilada representan indicadores séricos de apoptosis y de activación de la respuesta inmune celular, respectivamente (258). Sin embargo, la necrosis, la apoptosis y la activación de células inmunes también son procesos comunes en otras patologías hepáticas. Por ejemplo, los niveles de CK-18 y de ccK-18 se encuentran elevados en hepatitis, fibrosis y enfermedad hepática no alcohólica (217), mientras que el aumento de los niveles de GLDH y HMGB1 se asocian también con lesiones hepáticas no relacionadas con el DILI (259, 260). Las técnicas ómicas permiten el análisis de miles de posibles biomarcadores predictivos, como es el caso de los más de 2500 miRNAs maduros del ser humano. De este modo las posibilidades de encontrar moléculas con potencial predictivo específico y discriminante son mucho mayores.

La mayoría de los estudios sobre miRNAs biomarcadores para el diagnóstico del DILI se han centrado en la HTX por sobredosis de paracetamol. La primera evidencia de miRNAs circulantes como biomarcadores de DILI se encontró en ratones tratados con paracetamol, donde se observó que los miRNAs hepáticos más abundantes (miR-122 y miR-192) aumentaban en el plasma de los animales de forma dependiente con la dosis del fármaco y el tiempo de administración, siendo, además, más sensibles que los niveles séricos de ALT (177). En un estudio

## **4 Discusión**

posterior, el incremento de ambos miRNAs se confirmó en humanos con sobredosis por paracetamol (178).

Estudios recientes demuestran que el miR-122 es un biomarcador más sensible para la HTX por paracetamol en humanos que los biomarcadores clínicos convencionales (261, 262). El miR-122, a diferencia de la ALT, permaneció estable en pacientes con lesión muscular (263). En los voluntarios sanos, el aumento temprano del miR-122 se ha asociado a la lesión hepática que desarrollan algunos individuos a dosis terapéuticas de paracetamol (263).

Sin embargo, el paracetamol es un fármaco muy particular dentro del contexto del DILI, pues su mecanismo de acción resulta en un daño hepatocelular de tipo intrínseco y dependiente de la dosis (la mayoría de los casos se asocian a una sobredosis de paracetamol). Por lo tanto, muchas conclusiones extraídas de estos estudios no pueden ser aplicadas al DILI de tipo idiosincrásico, el más frecuente, que es dosis independiente y cuya aparición es imprevisible.

En el DILI idiosincrásico un mismo fármaco puede ser responsable de diferentes manifestaciones clínicas e histopatológicas, lo que supone que la búsqueda de biomarcadores sensibles y específicos para la identificación y clasificación sea más importante. A pesar de su relevancia y del aumento del número de casos, ningún estudio ha abordado la búsqueda de nuevos miRNAs circulantes biomarcadores para el diagnóstico del DILI idiosincrásico, así como para la clasificación de los pacientes. En un estudio reciente se analizó el nivel sérico del miR-122 durante 14 días en individuos sanos que tomaban amoxicilina/ácido

## **4 Discusión**

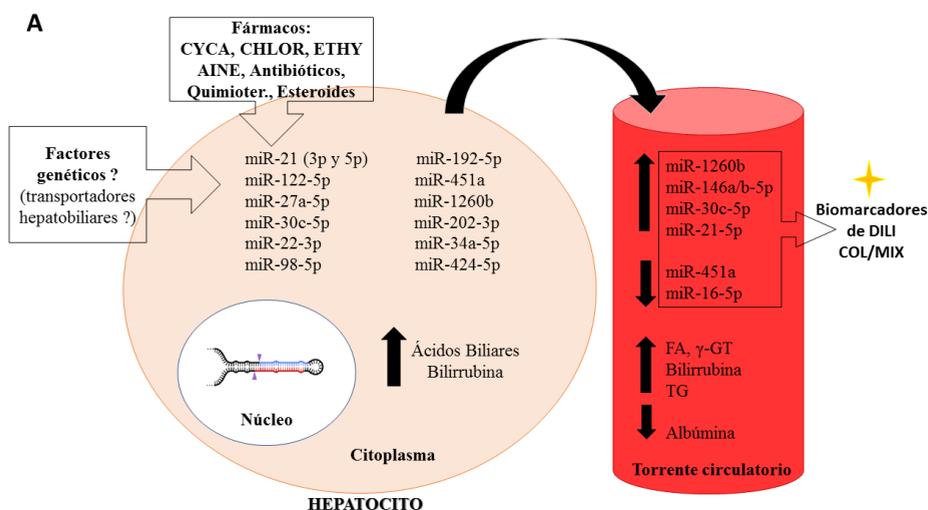
clavulánico. Los resultados mostraron una elevación de los niveles del miR-122. Por el contrario, la ALT sólo mostró pequeñas elevaciones no significativas en algunos pacientes y, además, la FA no se vio alterada (264). En otro estudio se analizó un conjunto de miRNAs en el suero de 78 pacientes con DILI idiosincrásico agudo (59% de tipo hepatocelular y 37% de tipo colestásico/mixto). Once individuos murieron dentro de un periodo de 6 meses tras el inicio del DILI. La mortalidad por DILI idiosincrásico se asoció con unos niveles más bajos de los miR-122, -4463 y -4270, sin embargo, no se investigó el posible potencial de los miRNAs identificados como biomarcadores predictivos de DILI (265).

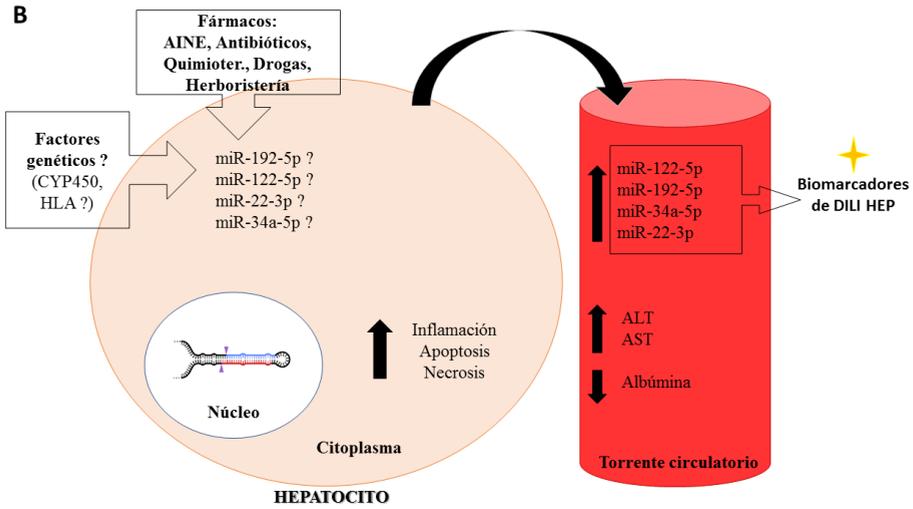
En nuestro estudio, utilizamos CYCA y CHLO como compuestos colestásicos modelo (si bien CYCA también fue utilizado en el estudio de esteatosis porque ha demostrado ser capaz de activar mecanismos esteatóxicos y colestásicos, tanto a nivel clínico como experimental) en cultivos de hepatocitos humanos, y encontramos que veinticinco de los 355 miRNAs identificados en el análisis por RNAseq fueron alterados significativamente por los compuestos colestásicos. Para encontrar una firma común, ampliamos el conjunto de tratamientos tanto de compuestos colestásicos (ANIT, ETHY) como de controles (KETO, MAPR y AMIK). Sin embargo, ningún miRNA mostró una respuesta común a todos los compuestos colestásicos, que puede ser explicado por los diferentes mecanismos de toxicidad de los agentes seleccionados. En cualquier caso, determinamos por primera vez la respuesta de 11 miRNAs a distintos fármacos colestásicos en hepatocitos humanos en cultivo.

Estos hallazgos fueron investigados también en pacientes reales de DILI. Los resultados demuestran, por primera vez, que los miRNAs que

## 4 Discusión

se alteraron por fármacos colestásicos en los ensayos *in vitro* con hepatocitos humanos estaban alterados en el suero de pacientes con DILI. Además, algunos de estos miRNAs circulantes se correlacionan con la ALT, mientras que otros se correlacionan mejor con la FA. Entre los miRNAs que resultaron más específicos para el DILI hepatocelular, identificamos el miR-122 y -192, lo que confirma los resultados en estudios previos de HTX por paracetamol (178). Además, también postulamos por primera vez una asociación entre los miR-34a y miR-22 y el DILI hepatocelular, aunque también fueron inducidos en el suero de pacientes con DILI colestásico/mixto, pero en mucho menor grado. En nuestro estudio también observamos un grupo de miRNAs que se alteraron más significativamente en los pacientes con DILI de tipo colestásico/mixto y que, además, mostraron buenas correlaciones con la FA: miR-1260b, -146a, -21, -30c, -451a y -16.





**Figura 4.3: miRNAs biomarcadores para el diagnóstico y clasificación del DILI.** Los tratamientos de hepatocitos humanos en cultivo con fármacos colestásicos modelo alteraron el nivel de expresión de varios miRNAs. La mayoría de estos también resultaron alterados en el torrente sanguíneo de pacientes con DILI COL/MIX. Cuatro miRNAs resultaron inducidos y 2 inhibidos en el suero de estos pacientes, mostrando perfiles similares al de la FA (A). El DILI HEP se caracteriza por inflamación, apoptosis y necrosis del hepatocito y por niveles circulantes de transaminasas elevados. Cuatro miRNA mostraron un perfil similar al de la ALT en pacientes cn DILI HEP y alcanzaron niveles mucho más elevados que en pacientes con DILI COL/MIX (B).

Varios de los miRNAs identificados en el modelo celular *in vitro* no fueron validados en el suero de pacientes *in vivo*. Esto podría deberse a varias razones: 1) se sabe que el nivel de los miRNAs en suero es mucho más bajo que en las células o los tejidos. Es por ello, que los miRNAs que ya muestran una expresión moderada o baja intracelularmente sean difíciles o imposibles de detectar en el suero. Este podría ser el caso de los miR-27a-5p y miR-21-3p que son hebras pasajeras cuya expresión intracelular es muy inferior respecto a las hebras guía. 2) Los compuestos modelo utilizados en los tratamientos *in vitro* en hepatocitos humanos y

## **4 Discusión**

los fármacos con una relación causal con el DILI colestásico pueden conducir al mismo efecto adverso, pero su mecanismo de acción puede ser diferente. Este sería el caso del compuesto ANIT, que indujo el miR-98-5p en los cultivos de hepatocitos; mientras que los fármacos que causaron DILI clínico no alteraron este miRNA. ANIT realmente es un compuesto hepatotóxico utilizado experimentalmente como modelo de colestasis, pero que produce necrosis del epitelio del conducto biliar, algo poco frecuente en el DILI clínico (107). 3) Las pequeñas diferencias reproducibles y constantes en el modelo *in vitro* puede que no se observen en la población humana mucho más variable. Este sería el caso del miR-424-5p que mostró una pequeña inhibición de su nivel de expresión por parte de todos los fármacos colestásicos *in vitro*, pero, sin embargo, no se alteró significativamente en el suero de los pacientes. El resto de los miRNAs seleccionados en los análisis de RNAseq y/o RT-qPCR *in vitro*, se confirmaron posteriormente en los estudios *in vivo*.

Como ya observamos en los resultados para la búsqueda de biomarcadores de esteatosis iatrogénica, los cocientes de un miRNA inducido y uno reprimido muestran un mejor rendimiento diagnóstico. Así, los cocientes entre el miR-122 (inducido en el DILI hepatocelular) y los miR-451a o miR-16 (reprimidos en el DILI colestásico), podrían constituir un nuevo biomarcador alterado en todos los pacientes DILI pero que discrimina entre ambos fenotipos. Sabemos que nuestro tamaño muestral es pequeño, pero comparable al de otros estudios previos (178, 265, 266). En nuestros estudios, realizamos una pequeña validación en una cohorte independiente que incluyó 9 pacientes de DILI colestásico y 9 pacientes de DILI hepatocelular. Los resultados demostraron que los

## **4 Discusión**

cocientes miR122/451a y miR122/16 separaron correctamente a la mayoría de los pacientes en su fenotipo según los valores de corte ya definidos en la cohorte de estudio. Los análisis de rendimiento mostraron unos valores de AUROC de 0,827 para miR122/451a y de 0,864 para el cociente miR122/16. Aunque los resultados son muy positivos, sin embargo, todavía necesitarían de una validación en cohortes de mayor número de pacientes.

Desde un punto de vista mecanicista, los miRNAs identificados están involucrados en la fisiopatología hepática y podrían ser informativos de las vías de señalización alteradas que se asocian a con la enfermedad. El miR-122 juega un papel fundamental en la regulación del colesterol y el metabolismo de los AG, pero, sobre todo, es esencial en el mantenimiento de la homeostasis y la diferenciación hepática, y por ello, su expresión aberrante en el hígado se asocia a lesiones hepáticas como esteatosis, fibrosis, inflamación y carcinoma hepatocelular (267). En cuanto al miR-192 también está involucrado en el metabolismo lipídico en el hígado y en el carcinoma hepatocelular (268, 269). El miR-34a, represor de sirtuina 1 (SIRT1), aumenta la acetilación y la transcripción de p53, conduciendo a una inducción de genes pro-apoptóticos (270). En este contexto, la ruta reguladora FXR/miR-34a/SIRT1 se ha observado alterada en ratones obesos, asociándose con la esteatosis hepática (271). El miR-22 está involucrado en el control del ciclo celular y en el cáncer de hígado y su desregulación puede influir en genes diana como la ciclina A2 o Sp1 (272, 273). El ácido desoxicólico (un AB secundario), inhibe la expresión del miR-21 en los hepatocitos lo que aumenta la expresión del gen pro-apoptótico PDCD4 (274). El miR-451 regula a IL6R-STAT3 para

suprimir la angiogénesis (275), y a IKK- $\beta$  para inhibir la proliferación en el carcinoma hepatocelular (276). La inducción del miR-16 contribuye a la inhibición de HGF y Smad7 durante el desarrollo de la fibrosis hepática (277). El miR-146a, que se induce por la IL6 (278), se ha identificado como un supresor de tumores pues regula a c-met en metástasis hepáticas en cáncer colorrectal (279). Por último, el miR-30c mejora la esteatosis hepática en ratones deficientes en el receptor de la leptina al inhibir a FASN (280).

Nuestros resultados podrían tener relevancia clínica, ya que la implementación de estos miRNAs biomarcadores en las pruebas de rutina de los laboratorios podrían facilitar y mejorar el diagnóstico y la clasificación de los pacientes de DILI.

### **4.3 Análisis integral y comparativo de los miRNAs biomarcadores identificados en hepatocitos y en el suero de pacientes.**

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido identificar miRNAs biomarcadores predictivos y diagnósticos de dos manifestaciones clínicas de la hepatotoxicidad iatrogénica (esteatosis y colestasis).

En los estudios *in vitro*, las células HepG2 fueron tratadas con fármacos esteatósicos modelo y un grupo de fármacos que se prescriben comúnmente a pacientes con SM. Ambos tipos de compuestos fueron capaces de inducir la expresión intracelular de 10 miRNAs (Fig. 4.1). Por otra parte, cuando los hepatocitos humanos fueron expuestos a fármacos colestásicos modelo también se observó una alteración en la expresión de 11 miRNAs (Fig. 4.3-A). Sin embargo, el análisis comparativo de ambos

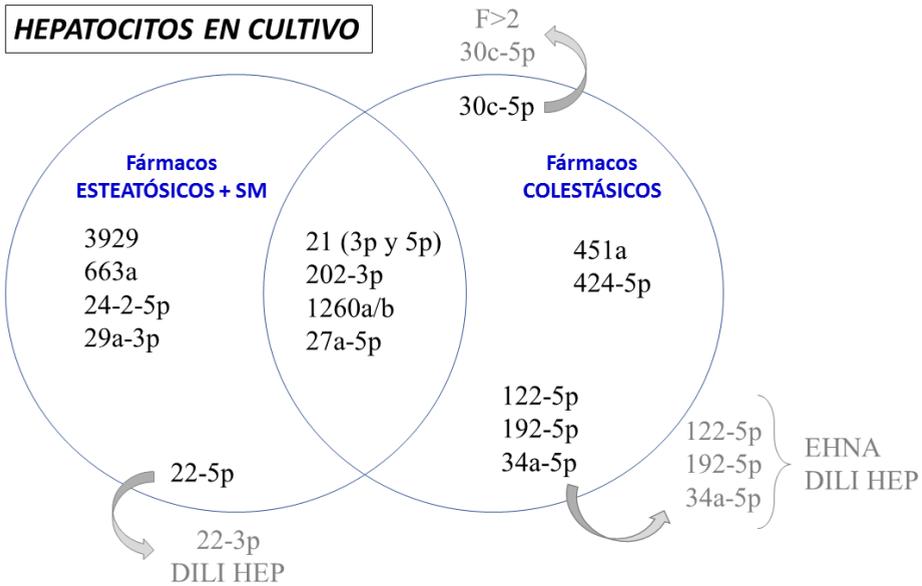
## **4 Discusión**

grupos muestra que algunos de los miRNAs de esteatosis, como el miR-21 (-3p y -5p), -27a-5p, -202-3p y -1260b, también son alterados por fármacos colestásicos, lo que indica que estos miRNA serían perturbados por medicamentos tanto esteatósicos como colestásicos, independientemente de su mecanismo de toxicidad.

Los miRNAs más específicos para fármacos esteatósicos serían -22-5p, -24-2-5p, -29a-3p, -663a y -3929; mientras que para los fármacos colestásicos serían: miR-122, -192-5p, -30c-5p, -34a-5p, -451a y -424-5p.

Una de las limitaciones de este estudio es que dentro de la hepatotoxicidad hay otros mecanismos, además de la esteatosis y la colestasis, que no han sido investigados, y por lo tanto alguno de los miRNAs que postulamos aquí como específicos podrían no serlo. De hecho, si nos fijamos en las alteraciones encontradas en los sueros de enfermos de DILI hepatocelular, podríamos inferir que la hepatotoxicidad necrótica o apoptótica estaría asociada a los miR-122-5p, -192-5p, -34a-5p y -22-3p. Por otra parte, la esteatosis metabólica grave (EHNA y fibrosis avanzada) también altera los niveles circulantes de miR-122-5p, -192-5p, -34a-5p y -22-3p, así como los del miR-27b, -30c, -16 y -197.

Si tenemos en cuenta estas consideraciones, vemos que la lista de candidatos específicos de esteatosis y colestasis iatrogénica *in vitro* se reduce. Los miRNAs más específicos para fármacos esteatósicos serían -24-2-5p, -29a-3p, -663a y -3929; mientras que para los fármacos colestásicos serían: -30c-5p, -451a y -424-5p, con el agravante de que el miR-30c-5p podría no ser específico para enfermos con colestasis por medicamentos si ya tienen una fibrosis hepática avanzada.



**Figura 4.4:** Esquema integrativo de los miRNAs biomarcadores identificados en ensayos in vitro.

En cuanto a los estudios en pacientes, nuestros resultados mostraron que los niveles circulantes de los miR-122-5p, -192-5p, -34a-5p, -22-3p, -27b-3p, -30c-5p, -16-5p y -197-3p estaban alterados en el suero de los pacientes con EHNA, y los de los miR-27b, -30c, -16 y -21, lo estaban en el suero de los pacientes con fibrosis avanzada (Fig. 4.2). En cuanto a los pacientes diagnosticados de DILI colestásico/mixto y hepatocelular, los resultados demuestran que algunos de los miRNAs se ajustan al perfil sérico de la FA y el DILI colestásico (miR-1260b, -146a/b-5p, -21-5p, -30c-5p, -451a y -16) (Fig. 4.3-A), mientras que otros se correlacionan más con la ALT y son más específicos del DILI hepatocelular (miR-122-5p, -192-5p, -34a-5p, -22-3p) (Fig. 4.3-B).

En este caso también podemos observar cómo varios de los miRNAs identificados no son específicos de una manifestación clínica.

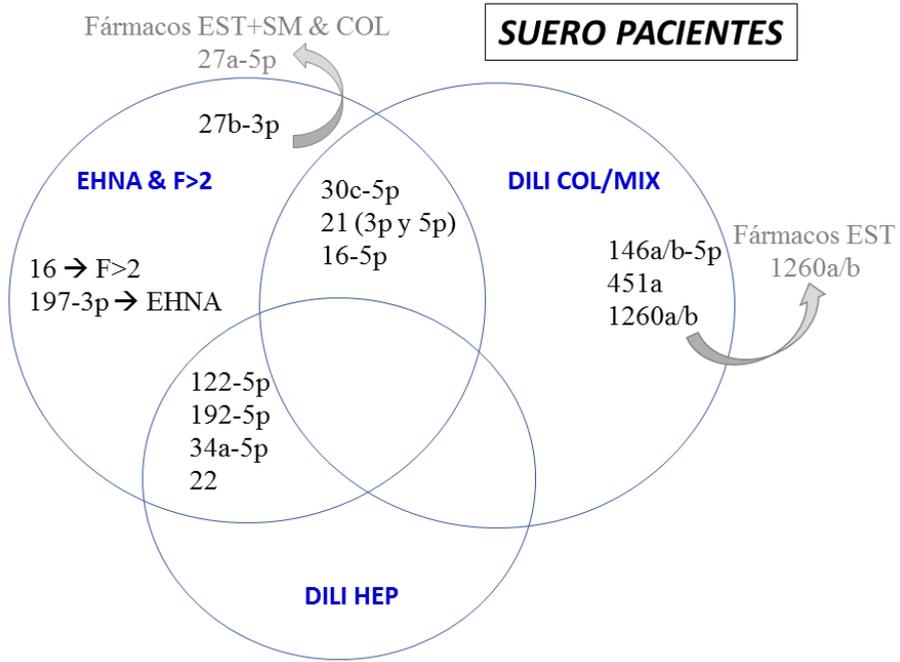
## **4 Discusión**

Así, por ejemplo, los niveles séricos de miR-122, -192-5p, -34a-5p y -22-3p, resultaron inducidos tanto en los pacientes de EHGNA como en los sujetos diagnosticados de DILI hepatocelular. Esto podría indicar que se tratan de miRNAs alterados en lesión hepatocitaria inespecífica.

Por otra parte, los miR-30c, -21 y -16 resultaron alterados tanto en DILI colestásico como en EHNA / fibrosis grave, por lo que al igual que sucede con las conclusiones de los estudios *in vitro*, varios de los miRNAs identificados no son específicos de las hepatopatías estudiadas. En el sentido opuesto cabe destacar, por ejemplo, al miR-451a que resultó alterado sólo por los fármacos colestásicos y su nivel sérico sólo se vio inhibido en el suero de los pacientes con DILI colestásico, pudiendo ser específico de esta condición. Algo similar podemos decir del miR-197 para la EHNA o del miR-16 para la fibrosis avanzada.

Por último, el miR-21 respondió *in vitro* a los tratamientos tanto esteatósicos como colestásicos, y además resultó alterado en el suero de los pacientes con fibrosis avanzada y con DILI colestásico, siendo el miRNA menos específicos de los investigados en este estudio.

Podemos concluir, que no serán los miRNA individualmente si no la huella en su conjunto, o determinaciones relativas como los cocientes de miRNAs, lo que permitiría de modo inequívoco el diagnóstico de la esteatosis y la colestasis por fármacos.



*Figura 4.5: Esquema integrativo de los miRNAs biomarcadores identificados en el suero de pacientes de las distintas cohortes de estudio.*

## **5- CONCLUSIONES**



## 5 Conclusiones

Del trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral podemos extraer las siguientes conclusiones:

- 1- Los fármacos esteatósicos modelo producen una huella común en el perfil de expresión de 10 miRNAs en cultivos de células HepG2 humanas. Además, también incrementan la liberación de estos miRNAs al medio extracelular.
- 2- Algunos fármacos comunes prescritos a pacientes con síndrome metabólico también inducen, en células HepG2, los miRNAs biomarcadores de esteatosis por fármacos, especialmente cuando están cambiando. Además, su potencial esteatogénico se confirma por la acumulación de lípidos (sobre todo TG) que inducen en células HepG2.
- 3- Algunos de los miRNAs biomarcadores de esteatosis por fármacos identificados *in vitro* se pueden cuantificar de forma fiable en el suero de los pacientes con hígado graso. Además, la mayoría guardan una buena relación entre el nivel de expresión en el hepatocito y el nivel circulante detectado en el suero.
- 4- De los 18 miRNAs postulados en 14 estudios previos como miRNAs circulantes predictivos de EHGNA sólo se han confirmado 9 como biomarcadores no invasivos asociados con la gravedad de la enfermedad.
- 5- Los rendimientos de los miRNAs validados para predecir la EHNA son mejores (AUROC = 0,79-0,81) que los de los biomarcadores séricos convencionales (AUROC AST= 0,75), sin embargo, estos miRNAs no demostraron mejor rendimiento que el

## 5 Conclusiones

algoritmo FIB-4 para la predicción de fibrosis avanzada (AUROC FIB-4= 0,85).

- 6- Los compuestos colestásicos modelo alteran la expresión de 11 miRNAs en los hepatocitos humanos en cultivo. Sin embargo, no se observó ninguna respuesta común a todos los compuestos colestásicos analizados.
- 7- Algunos de los miRNAs identificados *in vitro* se encontraron significativamente alterados en el suero de pacientes de DILI de tipo colestásico/mixto, y correlacionaron con el perfil de la FA (miR-1260b, -146a/b, -451a y -16); mientras que otros fueron inducidos preferentemente en los pacientes de DILI hepatocelular, y correlacionaron con la ALT (miR-122, -192, -34a y -22).
- 8- Los cocientes de miR122/451 y miR122/16 mostraron rendimientos excelentes para predecir el DILI y clasificar los dos fenotipos clínicos del DILI (AUROC= 0,96 y 0,94, respectivamente), tanto en una cohorte de estudio como en una cohorte independiente de validación.

## **6-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## **6 Referencias Bibliográficas**

1. Tortora GJ, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología 11ª ed 2006. 1280 p.
2. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. The Surgical clinics of North America. 2010;90(4):643-53.
3. Juza RM, Pauli EM. Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians. Clinical anatomy. 2014;27(5):764-9.
4. Adams DH, Eksteen B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. Nature reviews Immunology. 2006;6(3):244-51.
5. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer cells in the liver. Comprehensive Physiology. 2013;3(2):785-97.
6. Adeva-Andany MM, Perez-Felpete N, Fernandez-Fernandez C, Donapetry-Garcia C, Pazos-Garcia C. Liver glucose metabolism in humans. Bioscience reports. 2016;36(6).
7. Gonzalez JT, Fuchs CJ, Betts JA, van Loon LJ. Liver glycogen metabolism during and after prolonged endurance-type exercise. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2016;311(3):E543-53.
8. Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. Experimental & molecular medicine. 2016;48:e218.
9. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, et al. Liver lipid metabolism. Journal of animal physiology and animal nutrition. 2008;92(3):272-83.
10. Kraft G, Coate KC, Winnick JJ, Dardevet D, Donahue EP, Cherrington AD, et al. Glucagon's effect on liver protein metabolism in vivo. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2017;313(3):E263-E72.
11. Virović-Jukić L, Živković M. Liver Function: Humana Press, Cham; 2018.
12. Almazroo OA, Miah MK, Venkataramanan R. Drug Metabolism in the Liver. Clinics in liver disease. 2017;21(1):1-20.
13. Manterola C, Del Sol M, Ottone N, Otzen T. Anatomía quirúrgica y radiológica del hígado. Fundamentos para las resecciones hepáticas. International Journal of Morphology. 2017;35:1525-39.
14. Chiang JY. Negative feedback regulation of bile acid metabolism: impact on liver metabolism and diseases. Hepatology. 2015;62(4):1315-7.
15. Di Ciaula A, Garruti G, Lunardi Baccetto R, Molina-Molina E, Bonfrate L, Wang DQ, et al. Bile Acid Physiology. Annals of hepatology. 2017;16(Suppl. 1: s3-105.):s4-s14.
16. Li T, Chiang JY. Bile acids as metabolic regulators. Current opinion in gastroenterology. 2015;31(2):159-65.

## **6 Referencias Bibliográficas**

17. Hofmann AF. The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. *Frontiers in bioscience*. 2009;14:2584-98.
18. Ferrebee CB, Dawson PA. Metabolic effects of intestinal absorption and enterohepatic cycling of bile acids. *Acta pharmaceutica Sinica B*. 2015;5(2):129-34.
19. Jones H, Alpini G, Francis H. Bile acid signaling and biliary functions. *Acta pharmaceutica Sinica B*. 2015;5(2):123-8.
20. Dawson PA, Karpen SJ. Intestinal transport and metabolism of bile acids. *Journal of lipid research*. 2015;56(6):1085-99.
21. Liang Y, Li S, Chen L. The physiological role of drug transporters. *Protein & cell*. 2015;6(5):334-50.
22. Patel M, Taskar KS, Zamek-Gliszczynski MJ. Importance of Hepatic Transporters in Clinical Disposition of Drugs and Their Metabolites. *Journal of clinical pharmacology*. 2016;56 Suppl 7:S23-39.
23. Jetter A, Kullak-Ublick GA. Drugs and hepatic transporters: A review. *Pharmacological research*. 2019.
24. Slijepcevic D, van de Graaf SF. Bile Acid Uptake Transporters as Targets for Therapy. *Digestive diseases*. 2017;35(3):251-8.
25. Suga T, Yamaguchi H, Sato T, Maekawa M, Goto J, Mano N. Preference of Conjugated Bile Acids over Unconjugated Bile Acids as Substrates for OATP1B1 and OATP1B3. *PLoS one*. 2017;12(1):e0169719.
26. Jani M, Beery E, Heslop T, Toth B, Jagota B, Kis E, et al. Kinetic characterization of bile salt transport by human NTCP (SLC10A1). *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2018;46:189-93.
27. Belleville-Rolland T, Sassi Y, Decouture B, Dreano E, Hulot JS, Gaussem P, et al. MRP4 (ABCC4) as a potential pharmacologic target for cardiovascular disease. *Pharmacological research*. 2016;107:381-9.
28. van der Schoor LW, Verkade HJ, Kuipers F, Jonker JW. New insights in the biology of ABC transporters ABCC2 and ABCC3: impact on drug disposition. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2015;11(2):273-93.
29. Malinen MM, Ali I, Bezencon J, Beaudoin JJ, Brouwer KLR. Organic solute transporter OSTalpha/beta is overexpressed in nonalcoholic steatohepatitis and modulated by drugs associated with liver injury. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2018;314(5):G597-G609.
30. Suga T, Yamaguchi H, Ogura J, Mano N. Characterization of conjugated and unconjugated bile acid transport via human organic solute transporter alpha/beta. *Biochimica et biophysica acta Biomembranes*. 2019;1861(5):1023-9.

## **6 Referencias Bibliográficas**

31. Fujikura K, Yamasaki T, Otani K, Kanzawa M, Fukumoto T, Ku Y, et al. BSEP and MDR3: Useful Immunohistochemical Markers to Discriminate Hepatocellular Carcinomas From Intrahepatic Cholangiocarcinomas and Hepatoid Carcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 2016;40(5):689-96.
32. Telbisz A, Homolya L. Recent advances in the exploration of the bile salt export pump (BSEP/ABCB11) function. Expert opinion on therapeutic targets. 2016;20(4):501-14.
33. Lee JY, Kinch LN, Borek DM, Wang J, Wang J, Urbatsch IL, et al. Crystal structure of the human sterol transporter ABCG5/ABCG8. *Nature*. 2016;533(7604):561-4.
34. Patel SB, Graf GA, Temel RE. ABCG5 and ABCG8: more than a defense against xenosterols. *Journal of lipid research*. 2018;59(7):1103-13.
35. Khunweeraphong N, Stockner T, Kuchler K. The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion. *Scientific reports*. 2017;7(1):13767.
36. Arab J, Glasinovic E, Arrese M. Colestasis: fisiopatología y tratamiento. In: Arróspide MT, Rivera AB, editors. *Avances en Hepatología 2012*. Universidad Peruana Cayetano Heredia 2012.
37. Tejada F. Hepatotoxicidad por fármacos. *Revista Clínica de Medicina de Familia* 2010;3(3):177-91.
38. Russmann S, Kullak-Ublick GA, Grattagliano I. Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. *Current medicinal chemistry*. 2009;16(23):3041-53.
39. Cullen JM. Mechanistic classification of liver injury. *Toxicologic pathology*. 2005;33(1):6-8.
40. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *The New England journal of medicine*. 2003;349(5):474-85.
41. Holt M, Ju C. Drug-induced liver injury. *Handbook of experimental pharmacology*. 2010(196):3-27.
42. Singh D, Cho WC, Upadhyay G. Drug-Induced Liver Toxicity and Prevention by Herbal Antioxidants: An Overview. *Frontiers in physiology*. 2015;6:363.
43. Thomas AM, Lewis JH. Nonacetaminophen Drug-Induced Acute Liver Failure. *Clinics in liver disease*. 2018;22(2):301-24.
44. Meier Y, Cavallaro M, Roos M, Pauli-Magnus C, Folkers G, Meier PJ, et al. Incidence of drug-induced liver injury in medical inpatients. *European journal of clinical pharmacology*. 2005;61(2):135-43.
45. Hillman L, Gottfried M, Whitsett M, Rakela J, Schilsky M, Lee WM, et al. Clinical Features and Outcomes of Complementary and Alternative Medicine

## **6 Referencias Bibliográficas**

Induced Acute Liver Failure and Injury. *The American journal of gastroenterology*. 2016;111(7):958-65.

46. Moreno Otero R. Hepatotoxicidad por fármacos. *Revista Española de Reumatología Suplementos*. 2002;1(1).

47. Stickel F, Patsenker E, Schuppan D. Herbal hepatotoxicity. *Journal of hepatology*. 2005;43(5):901-10.

48. Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. *The New England journal of medicine*. 2006;354(7):731-9.

49. Bjornsson ES. Hepatotoxicity by Drugs: The Most Common Implicated Agents. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(2):224.

50. Andrade RJ, Lucena MI, Fernandez MC, Pelaez G, Pachkoria K, Garcia-Ruiz E, et al. Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology*. 2005;129(2):512-21.

51. Chang CY, Schiano TD. Review article: drug hepatotoxicity. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007;25(10):1135-51.

52. Ahmad J, Odin JA. Epidemiology and Genetic Risk Factors of Drug Hepatotoxicity. *Clinics in liver disease*. 2017;21(1):55-72.

53. Larrey D, Ursic-Beyoda J, Meunier L. Drug-Induced Hepatotoxicity. In: Reddy ERSWCMKR, editor. *Schiff's Diseases of the Liver*. 12 ed 2017.

54. Bjornsson ES. Epidemiology and risk factors for idiosyncratic drug-induced liver injury. *Seminars in liver disease*. 2014;34(2):115-22.

55. Sgro C, Clinard F, Ouazir K, Chanay H, Allard C, Guilleminet C, et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. *Hepatology*. 2002;36(2):451-5.

56. Bjornsson ES, Bergmann OM, Bjornsson HK, Kvaran RB, Olafsson S. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland. *Gastroenterology*. 2013;144(7):1419-25, 25 e1-3; quiz e19-20.

57. Lancaster EM, Hiatt JR, Zarrinpar A. Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review. *Archives of toxicology*. 2015;89(2):193-9.

58. Dara L, Liu ZX, Kaplowitz N. Mechanisms of adaptation and progression in idiosyncratic drug induced liver injury, clinical implications. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2016;36(2):158-65.

59. Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nature reviews Drug discovery*. 2005;4(6):489-99.

60. Dara L, Liu Z-X, Kaplowitz N. Pathogenesis of Idiosyncratic Drug Induced Liver Injury. In: Muriel P, editor. *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants* 2017.

## **6 Referencias Bibliográficas**

61. Belay ED, Bresee JS, Holman RC, Khan AS, Shahriari A, Schonberger LB. Reye's syndrome in the United States from 1981 through 1997. *The New England journal of medicine*. 1999;340(18):1377-82.
62. Langman G, De La M Hall P, Todd G. Role of non-alcoholic steatohepatitis in methotrexate-induced liver injury. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2001;16:1395-401.
63. Amacher DE, Chalasani N. Drug-induced hepatic steatosis. *Seminars in liver disease*. 2014;34(2):205-14.
64. Leitner JM, Graninger W, Thalhammer F. Hepatotoxicity of antibacterials: Pathomechanisms and clinical. *Infection*. 2010;38(1):3-11.
65. Jaeschke H. Acetaminophen: Dose-Dependent Drug Hepatotoxicity and Acute Liver Failure in Patients. *Digestive diseases*. 2015;33(4):464-71.
66. Tracy TS, Chaudhry AS, Prasad B, Thummel KE, Schuetz EG, Zhong XB, et al. Interindividual Variability in Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2016;44(3):343-51.
67. Kaplowitz N, Aw TY, Simon FR, Stolz A. Drug-induced hepatotoxicity. *Annals of internal medicine*. 1986;104(6):826-39.
68. Schulze-Bergkamen H, Schuchmann M, Fleischer B, Galle PR. The role of apoptosis versus oncotic necrosis in liver injury: facts or faith? *Journal of hepatology*. 2006;44(5):984-93.
69. Iorga A, Dara L, Kaplowitz N. Drug-Induced Liver Injury: Cascade of Events Leading to Cell Death, Apoptosis or Necrosis. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(5).
70. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *Journal of hepatology*. 2013;58(3):593-608.
71. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011;332(6037):1519-23.
72. Levene AP, Goldin RD. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology*. 2012;61(2):141-52.
73. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2017;37 Suppl 1:81-4.
74. Caballeria L, Pera G, Rodriguez L, Auladell MA, Bernad J, Canut S, et al. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease in a Spanish population: influence of the diagnostic criteria used. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2012;24(9):1007-11.
75. McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clinics in liver disease*. 2004;8(3):521-33, viii.

## **6 Referencias Bibliográficas**

76. Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and fibrosis progression: the good, the bad, and the unknown. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2015;13(4):655-7.
77. Yang M, Gong S, Ye SQ, Lyman B, Geng L, Chen P, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in children: focus on nutritional interventions. *Nutrients*. 2014;6(11):4691-705.
78. Koppe SW. Obesity and the liver: nonalcoholic fatty liver disease. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2014;164(4):312-22.
79. Tor J, Muga R. El hígado graso y el síndrome metabólico. *Medicina Clínica* 2013;141:252-3.
80. Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, Angulo P, Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2015;47(3):181-90.
81. Brea A, Puzo J. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *International journal of cardiology*. 2013;167(4):1109-17.
82. Sass DA, Chang P, Chopra KB. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Digestive diseases and sciences*. 2005;50(1):171-80.
83. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S99-S112.
84. McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of clinical gastroenterology*. 2006;40 Suppl 1:S17-29.
85. Martín Domínguez V, González Casas R, Mendoza Jiménez-Ridruejo J, García Buey L, Moreno-Otero R. Etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 2013;105(7):409-20.
86. Yeh MM, Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *American journal of clinical pathology*. 2007;128(5):837-47.
87. Larrain S, Rinella ME. A myriad of pathways to NASH. *Clinics in liver disease*. 2012;16(3):525-48.
88. Stojavljevic S, Gomercic Palic M, Virovic Jukic L, Smircic Duvnjak L, Duvnjak M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(48):18070-91.
89. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.

## **6 Referencias Bibliográficas**

90. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental*. 2016;65(8):1038-48.
91. Grieco A, Forgione A, Miele L, Vero V, Greco AV, Gasbarrini A, et al. Fatty liver and drugs. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2005;9(5):261-3.
92. Peters TS. Do preclinical testing strategies help predict human hepatotoxic potentials? *Toxicologic pathology*. 2005;33(1):146-54.
93. Ramachandran R, Kakar S. Histological patterns in drug-induced liver disease. *Journal of clinical pathology*. 2009;62(6):481-92.
94. Chiang JYL. Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy. *Liver research*. 2017;1(1):3-9.
95. Bjornsson ES, Jonasson JG. Drug-induced cholestasis. *Clinics in liver disease*. 2013;17(2):191-209.
96. Lewis JH. Drug-induced liver disease. *The Medical clinics of North America*. 2000;84(5):1275-311, x.
97. Vinken M. In vitro prediction of drug-induced cholestatic liver injury: a challenge for the toxicologist. *Archives of toxicology*. 2018;92(5):1909-12.
98. Airthal GP, Daly AK. Drug-Induced Cholestasis: Mechanisms and Importance. In: Hirschfield G, Liaskou E, Adams DH, editors. *Biliary Disease: From Science to Clinic* 2017. p. 117-28.
99. Pauli-Magnus C, Meier PJ. Hepatobiliary transporters and drug-induced cholestasis. *Hepatology*. 2006;44(4):778-87.
100. Sundaram V, Bjornsson ES. Drug-induced cholestasis. *Hepatology communications*. 2017;1(8):726-35.
101. Jansen PL, Ghallab A, Vartak N, Reif R, Schaap FG, Hampe J, et al. The ascending pathophysiology of cholestatic liver disease. *Hepatology*. 2017;65(2):722-38.
102. Fernandez-Murga ML, Petrov PD, Conde I, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Jover R. Advances in drug-induced cholestasis: Clinical perspectives, potential mechanisms and in vitro systems. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2018;120:196-212.
103. Erlinger S. Drug-induced cholestasis. *Journal of hepatology*. 1997;26 Suppl 1:1-4.
104. Padda MS, Sanchez M, Akhtar AJ, Boyer JL. Drug-induced cholestasis. *Hepatology*. 2011;53(4):1377-87.
105. Dambach DM. Drug-induced hepatotoxicity: advances in preclinical predictive strategies and tools In: Wang J, Urban L, editors. *Predictive ADMET: Integrative Approaches in Drug Discovery and Development* 2014. p. 433-65.

## **6 Referencias Bibliográficas**

106. Petrov PD, Fernandez-Murga ML, Lopez-Riera M, Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Jover R. Predicting drug-induced cholestasis: preclinical models. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2018;14(7):721-38.
107. Cui YJ, Aleksunes LM, Tanaka Y, Goedken MJ, Klaassen CD. Compensatory induction of liver efflux transporters in response to ANIT-induced liver injury is impaired in FXR-null mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2009;110(1):47-60.
108. Van Herck MA, Vonghia L, Francque SM. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. *Nutrients*. 2017;9(10).
109. Cole BK, Feaver RE, Wamhoff BR, Dash A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) models in drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*. 2018;13(2):193-205.
110. Febbraio MA, Reibe S, Shalapour S, Ooi GJ, Watt MJ, Karin M. Preclinical Models for Studying NASH-Driven HCC: How Useful Are They? *Cell metabolism*. 2019;29(1):18-26.
111. Davila J, Xu J, Hoffmaster K, O'Brien P, Strom S. Current in vitro Models to Study Drug-Induced Liver Injury. In: Sahu SC, editor. *Hepatotoxicity: From Genomics to In Vitro and In Vivo Models*2008.
112. Han W, Wu Q, Zhang X, Duan Z. Innovation for hepatotoxicity in vitro research models: A review. *Journal of applied toxicology : JAT*. 2019;39(1):146-62.
113. Burkard A, Dahn C, Heinz S, Zutavern A, Sonntag-Buck V, Maltman D, et al. Generation of proliferating human hepatocytes using Upcyte(R) technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 2012;42(10):939-56.
114. Norenberg A, Heinz S, Scheller K, Hewitt NJ, Braspenning J, Ott M. Optimization of upcyte(R) human hepatocytes for the in vitro micronucleus assay. *Mutation research*. 2013;758(1-2):69-79.
115. Tolosa L, Gomez-Lechon MJ, Lopez S, Guzman C, Castell JV, Donato MT, et al. Human Upcyte Hepatocytes: Characterization of the Hepatic Phenotype and Evaluation for Acute and Long-Term Hepatotoxicity Routine Testing. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2016;152(1):214-29.
116. Donato MT, Tolosa L, Gomez-Lechon MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods in molecular biology*. 2015;1250:77-93.
117. Gomez-Lechon MJ, Tolosa L, Conde I, Donato MT. Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2014;10(11):1553-68.

## **6 Referencias Bibliográficas**

118. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(24):15655-60.
119. Le Vee M, Noel G, Jouan E, Stieger B, Fardel O. Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2013;27(6):1979-86.
120. Gao X, Liu Y. A transcriptomic study suggesting human iPSC-derived hepatocytes potentially offer a better in vitro model of hepatotoxicity than most hepatoma cell lines. *Cell biology and toxicology*. 2017;33(4):407-21.
121. Burkhardt B, Martinez-Sanchez JJ, Bachmann A, Ladurner R, Nussler AK. Long-term culture of primary hepatocytes: new matrices and microfluidic devices. *Hepatology international*. 2014;8(1):14-22.
122. Bachmann A, Moll M, Gottwald E, Nies C, Zantl R, Wagner H, et al. 3D Cultivation Techniques for Primary Human Hepatocytes. *Microarrays*. 2015;4(1):64-83.
123. Licata A, Minissale MG, Calvaruso V, Craxi A. A focus on epidemiology of drug-induced liver injury: analysis of a prospective cohort. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2017;21(1 Suppl):112-21.
124. Benichou C, Danan G, Flahault A. Causality assessment of adverse reactions to drugs--II. An original model for validation of drug causality assessment methods: case reports with positive rechallenge. *Journal of clinical epidemiology*. 1993;46(11):1331-6.
125. Danan G, Benichou C. Causality assessment of adverse reactions to drugs--I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: application to drug-induced liver injuries. *Journal of clinical epidemiology*. 1993;46(11):1323-30.
126. Kullak-Ublick GA, Andrade RJ, Merz M, End P, Benesic A, Gerbes AL, et al. Drug-induced liver injury: recent advances in diagnosis and risk assessment. *Gut*. 2017;66(6):1154-64.
127. Aithal GP, Watkins PB, Andrade RJ, Larrey D, Molokhia M, Takikawa H, et al. Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2011;89(6):806-15.
128. Church RJ, Kullak-Ublick GA, Aubrecht J, Bonkovsky HL, Chalasani N, Fontana RJ, et al. Candidate biomarkers for the diagnosis and prognosis of drug-induced liver injury: An international collaborative effort. *Hepatology*. 2019;69(2):760-73.
129. Benichou C. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *Journal of hepatology*. 1990;11(2):272-6.

## **6 Referencias Bibliográficas**

130. Antoine D. Translational and mechanistic biomarkers of drug-induced liver injury – candidates and qualification strategies. In: Chen M, Will Y, editors. *Methods in Pharmacology and Toxicology*. New York 2018. p. 533-53.
131. Aller R, Fernandez-Rodriguez C, Lo Iacono O, Banares R, Abad J, Carrion JA, et al. Consensus document. Management of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Clinical practice guideline. *Gastroenterologia y hepatologia*. 2018;41(5):328-49.
132. Fierbinteanu-Braticevici C, Dina I, Petrisor A, Tribus L, Negreanu L, Carstoiu C. Noninvasive investigations for non alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis. *World journal of gastroenterology*. 2010;16(38):4784-91.
133. Castera L, Vilgrain V, Angulo P. Noninvasive evaluation of NAFLD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013;10(11):666-75.
134. Calleja J, Crespo J. Asociación Española para el Estudio del Hígado. Libro blanco de la Hepatología en España. 1ª ed. Madrid, España: AEEH; 2015.
135. Friedrich-Rust M, Romen D, Vermehren J, Kriener S, Sadet D, Herrmann E, et al. Acoustic radiation force impulse-imaging and transient elastography for non-invasive assessment of liver fibrosis and steatosis in NAFLD. *European journal of radiology*. 2012;81(3):e325-31.
136. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
137. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012;55(6):2005-23.
138. Álvarez Cañas C. Liver biopsy in NAFLD. In: Olcoz Goñi J, Jorquera Plaza J, editors. *Fatty liver disease A reality with many questions* 2018.
139. Tapper EB, Lok ASF. Use of Liver Imaging and Biopsy in Clinical Practice. *The New England journal of medicine*. 2017;377(23):2296-7.
140. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2011;54(1):344-53.
141. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American journal of gastroenterology*. 1999;94(9):2467-74.
142. Vizuete J, Camero A, Malakouti M, Garapati K, Gutierrez J. Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview of Present and Future Therapies. *Journal of clinical and translational hepatology*. 2017;5(1):67-75.

## **6 Referencias Bibliográficas**

143. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012;56(5):1751-9.
144. Bedossa P, Consortium FP. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;60(2):565-75.
145. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
146. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*. 2009;11(3):228-34.
147. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(5):5451-65.
148. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018;173(1):20-51.
149. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*. 2004;10(12):1957-66.
150. Hirose T, Mishima Y, Tomari Y. Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy. *EMBO reports*. 2014;15(5):489-507.
151. Creugny A, Fender A, Pfeffer S. Regulation of primary microRNA processing. *FEBS letters*. 2018;592(12):1980-96.
152. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;87:3-14.
153. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:402.
154. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-8.
155. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development*. 2004;18(24):3016-27.
156. Shen J, Hung MC. Signaling-mediated regulation of MicroRNA processing. *Cancer research*. 2015;75(5):783-91.
157. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115(2):199-208.
158. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003;115(2):209-16.

## **6 Referencias Bibliográficas**

159. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nature structural & molecular biology*. 2008;15(4):346-53.
160. Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology*. 2012;19(6):586-93.
161. Eichhorn SW, Guo H, McGeary SE, Rodriguez-Mias RA, Shin C, Baek D, et al. mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Molecular cell*. 2014;56(1):104-15.
162. Yang JX, Rastetter RH, Wilhelm D. Non-coding RNAs: An Introduction. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;886:13-32.
163. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thrombosis and haemostasis*. 2012;107(4):605-10.
164. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005;435(7043):839-43.
165. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007;447(7148):1130-4.
166. Finnegan EF, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2013;48(1):51-68.
167. Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*. 2008;320(5872):97-100.
168. Chatterjee S, Grosshans H. Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2009;461(7263):546-9.
169. Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W, et al. An analysis of human microRNA and disease associations. *PloS one*. 2008;3(10):e3420.
170. Beg MS, Brenner AJ, Sachdev J, Borad M, Kang YK, Stoudemire J, et al. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Investigational new drugs*. 2017;35(2):180-8.
171. Yang X, Greenhaw J, Shi Q, Su Z, Qian F, Davis K, et al. Identification of urinary microRNA profiles in rats that may diagnose hepatotoxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2012;125(2):335-44.
172. Burgos KL, Javaherian A, Bompreszi R, Ghaffari L, Rhodes S, Courtright A, et al. Identification of extracellular miRNA in human cerebrospinal fluid by next-generation sequencing. *Rna*. 2013;19(5):712-22.

## **6 Referencias Bibliográficas**

173. Costa MC, Leitaó AL, Enguita FJ. MicroRNA profiling in plasma or serum using quantitative RT-PCR. *Methods in molecular biology*. 2014;1182:121-9.
174. Pirola CJ, Fernandez Gianotti T, Castano GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut*. 2015;64(5):800-12.
175. Pogribny IP. MicroRNAs as biomarkers for clinical studies. *Experimental biology and medicine*. 2018;243(3):283-90.
176. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PloS one*. 2012;7(3):e30679.
177. Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(11):4402-7.
178. Starkey Lewis PJ, Dear J, Platt V, Simpson KJ, Craig DG, Antoine DJ, et al. Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2011;54(5):1767-76.
179. Miyaaki H, Ichikawa T, Kamo Y, Taura N, Honda T, Shibata H, et al. Significance of serum and hepatic microRNA-122 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2014;34(7):e302-7.
180. Salvoza NC, Klinzing DC, Gopez-Cervantes J, Baclig MO. Association of Circulating Serum miR-34a and miR-122 with Dyslipidemia among Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PloS one*. 2016;11(4):e0153497.
181. Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*. 2017;542(7642):450-5.
182. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Martinez-Romero A, Jimenez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chemico-biological interactions*. 2007;165(2):106-16.
183. Donato MT, Gomez-Lechon MJ. Drug-induced liver steatosis and phospholipidosis: cell-based assays for early screening of drug candidates. *Current drug metabolism*. 2012;13(8):1160-73.
184. Benet M, Moya M, Donato MT, Lahoz A, Hervas D, Guzman C, et al. A simple transcriptomic signature able to predict drug-induced hepatic steatosis. *Archives of toxicology*. 2014;88(4):967-82.
185. Donato MT, Lopez-Riera M, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Jover R. Both cholestatic and steatotic drugs trigger extensive alterations in the mRNA level

## **6 Referencias Bibliográficas**

of biliary transporters in rat hepatocytes: Application to develop new predictive biomarkers for early drug development. *Toxicology letters*. 2016;263:58-67.

186. Levy G, Bomze D, Heinz S, Ramachandran SD, Noerenberg A, Cohen M, et al. Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes. *Nature biotechnology*. 2015;33(12):1264-71.

187. Koebe HG, Pahernik S, Eyer P, Schildberg FW. Collagen gel immobilization: a useful cell culture technique for long-term metabolic studies on human hepatocytes. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 1994;24(2):95-107.

188. Gomez-Lechon MJ, Lahoz A, Jimenez N, Vicente Castell J, Donato MT. Cryopreservation of rat, dog and human hepatocytes: influence of preculture and cryoprotectants on recovery, cytochrome P450 activities and induction upon thawing. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 2006;36(6):457-72.

189. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Current drug metabolism*. 2003;4(4):292-312.

190. Danan G, Teschke R. RUCAM in Drug and Herb Induced Liver Injury: The Update. *International journal of molecular sciences*. 2015;17(1).

191. Turchinovich A, Weiz L, Langheinze A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research*. 2011;39(16):7223-33.

192. Balcells I, Cirera S, Busk PK. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC biotechnology*. 2011;11:70.

193. Luo X, Zhang J, Wang H, Du Y, Yang L, Zheng F, et al. PolyA RT-PCR-based quantification of microRNA by using universal TaqMan probe. *Biotechnology letters*. 2012;34(4):627-33.

194. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

195. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*. 2004;64(15):5245-50.

196. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002;3(7):RESEARCH0034.

## **6 Referencias Bibliográficas**

197. Tolosa L, Carmona A, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Donato MT. High-content screening of drug-induced mitochondrial impairment in hepatic cells: effects of statins. *Archives of toxicology*. 2015;89(10):1847-60.
198. Tolosa L, Gomez-Lechon MJ, Donato MT. A Multi-Parametric Fluorescent Assay for the Screening and Mechanistic Study of Drug-Induced Steatosis in Liver Cells in Culture. *Current protocols in toxicology*. 2017;72:14 5 1- 5 1.
199. Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic acids research*. 2018;46(W1):W486-W94.
200. Wold M, Sjöström M, Eriksson L. PLS regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom Intell Lab Syst*. 2001;58:109-30.
201. Guzman C, Benet M, Pisonero-Vaquero S, Moya M, Garcia-Mediavilla MV, Martinez-Chantar ML, et al. The human liver fatty acid binding protein (FABP1) gene is activated by FOXA1 and PPARalpha; and repressed by C/EBPalpha: Implications in FABP1 down-regulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1831(4):803-18.
202. Moya M, Benet M, Guzman C, Tolosa L, Garcia-Monzon C, Pareja E, et al. Foxa1 reduces lipid accumulation in human hepatocytes and is down-regulated in nonalcoholic fatty liver. *PLoS one*. 2012;7(1):e30014.
203. Kurtz CL, Peck BC, Fannin EE, Beyesen C, Miao J, Landstreet SR, et al. MicroRNA-29 fine-tunes the expression of key FOXA2-activated lipid metabolism genes and is dysregulated in animal models of insulin resistance and diabetes. *Diabetes*. 2014;63(9):3141-8.
204. Kurtz CL, Fannin EE, Toth CL, Pearson DS, Vickers KC, Sethupathy P. Inhibition of miR-29 has a significant lipid-lowering benefit through suppression of lipogenic programs in liver. *Scientific reports*. 2015;5:12911.
205. Liu J, Ye C, Liu W, Zhao W, Zhang YJ, Zhang H, et al. AICAR enhances insulin signaling via downregulation of miR-29. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2016;94(2):199-205.
206. Ru P, Hu P, Geng F, Mo X, Cheng C, Yoo JY, et al. Feedback Loop Regulation of SCAP/SREBP-1 by miR-29 Modulates EGFR Signaling-Driven Glioblastoma Growth. *Cell reports*. 2016;16(6):1527-35.
207. Mehta R, Otgonsuren M, Younoszai Z, Allawi H, Raybuck B, Younoszi Z. Circulating miRNA in patients with non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease. *BMJ open gastroenterology*. 2016;3(1):e000096.
208. Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D, Gan J. A pilot study of serum microRNAs panel as potential biomarkers for diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS one*. 2014;9(8):e105192.

## **6 Referencias Bibliográficas**

209. Zarrinpar A, Gupta S, Maurya MR, Subramaniam S, Loomba R. Serum microRNAs explain discordance of non-alcoholic fatty liver disease in monozygotic and dizygotic twins: a prospective study. *Gut*. 2016;65(9):1546-54.
210. Akuta N, Kawamura Y, Suzuki F, Saitoh S, Arase Y, Fujiyama S, et al. Analysis of association between circulating miR-122 and histopathological features of nonalcoholic fatty liver disease in patients free of hepatocellular carcinoma. *BMC gastroenterology*. 2016;16(1):141.
211. Sun C, Huang F, Liu X, Xiao X, Yang M, Hu G, et al. miR-21 regulates triglyceride and cholesterol metabolism in non-alcoholic fatty liver disease by targeting HMGCR. *International journal of molecular medicine*. 2015;35(3):847-53.
212. Akuta N, Kawamura Y, Suzuki F, Saitoh S, Arase Y, Kunimoto H, et al. Impact of circulating miR-122 for histological features and hepatocellular carcinoma of nonalcoholic fatty liver disease in Japan. *Hepatology international*. 2016;10(4):647-56.
213. Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013;424:99-103.
214. Yang Y, Chen L, Gu J, Zhang H, Yuan J, Lian Q, et al. Recurrently deregulated lncRNAs in hepatocellular carcinoma. *Nature communications*. 2017;8:14421.
215. Wojcicka A, Swierniak M, Kornasiewicz O, Gierlikowski W, Maciag M, Kolanowska M, et al. Next generation sequencing reveals microRNA isoforms in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;53:208-17.
216. Lopez-Riera M, Conde I, Tolosa L, Zaragoza A, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, et al. New microRNA Biomarkers for Drug-Induced Steatosis and Their Potential to Predict the Contribution of Drugs to Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:3.
217. Vilar-Gomez E, Chalasani N. Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease: Clinical prediction rules and blood-based biomarkers. *Journal of hepatology*. 2018;68(2):305-15.
218. Yang K, Kock K, Sedykh A, Tropsha A, Brouwer KL. An updated review on drug-induced cholestasis: mechanisms and investigation of physicochemical properties and pharmacokinetic parameters. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2013;102(9):3037-57.
219. Chen M, Suzuki A, Borlak J, Andrade RJ, Lucena MI. Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors. *Journal of hepatology*. 2015;63(2):503-14.

## **6 Referencias Bibliográficas**

220. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(2):193-9.
221. Fromenty B, Pessayre D. Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. Effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines. *Journal of hepatology*. 1997;26 Suppl 2:43-53.
222. Sathiya Priya C, Bhavani K, Anuradha CV. High-calorie diet inflates steatogenic effects of valproic acid in mice. *Toxicology mechanisms and methods*. 2016;26(2):112-21.
223. Van den Hof WF, Ruiz-Aracama A, Van Summeren A, Jennen DG, Gaj S, Coonen ML, et al. Integrating multiple omics to unravel mechanisms of Cyclosporin A induced hepatotoxicity in vitro. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2015;29(3):489-501.
224. Rezzani R. Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. *Progress in histochemistry and cytochemistry*. 2004;39(2):85-128.
225. Yang Z, Cappello T, Wang L. Emerging role of microRNAs in lipid metabolism. *Acta pharmaceutica Sinica B*. 2015;5(2):145-50.
226. Koufaris C, Valbuena GN, Pomyen Y, Tredwell GD, Nevedomskaya E, Lau CH, et al. Systematic integration of molecular profiles identifies miR-22 as a regulator of lipid and folate metabolism in breast cancer cells. *Oncogene*. 2016;35(21):2766-76.
227. Koturbash I, Melnyk S, James SJ, Beland FA, Pogribny IP. Role of epigenetic and miR-22 and miR-29b alterations in the downregulation of Mat1a and Mthfr genes in early preneoplastic livers in rats induced by 2-acetylaminofluorene. *Molecular carcinogenesis*. 2013;52(4):318-27.
228. Bar N, Dikstein R. miR-22 forms a regulatory loop in PTEN/AKT pathway and modulates signaling kinetics. *PloS one*. 2010;5(5):e10859.
229. Wang H, Luo J, Chen Z, Cao WT, Xu HF, Gou DM, et al. MicroRNA-24 can control triacylglycerol synthesis in goat mammary epithelial cells by targeting the fatty acid synthase gene. *Journal of dairy science*. 2015;98(12):9001-14.
230. Ng R, Wu H, Xiao H, Chen X, Willenbring H, Steer CJ, et al. Inhibition of microRNA-24 expression in liver prevents hepatic lipid accumulation and hyperlipidemia. *Hepatology*. 2014;60(2):554-64.
231. Oda Y, Nakajima M, Mohri T, Takamiya M, Aoki Y, Fukami T, et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in human liver is regulated by miR-24. *Toxicology and applied pharmacology*. 2012;260(3):222-31.
232. Alvarez ML, Khosroheidari M, Eddy E, Done SC. MicroRNA-27a decreases the level and efficiency of the LDL receptor and contributes to the dysregulation of cholesterol homeostasis. *Atherosclerosis*. 2015;242(2):595-604.

## **6 Referencias Bibliográficas**

233. Ji J, Zhang J, Huang G, Qian J, Wang X, Mei S. Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation. *FEBS letters*. 2009;583(4):759-66.
234. Li S, Li J, Fei BY, Shao D, Pan Y, Mo ZH, et al. MiR-27a promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation through suppression of its target gene peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Chinese medical journal*. 2015;128(7):941-7.
235. Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, et al. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *Journal of virology*. 2013;87(9):5270-86.
236. Mattis AN, Song G, Hitchner K, Kim RY, Lee AY, Sharma AD, et al. A screen in mice uncovers repression of lipoprotein lipase by microRNA-29a as a mechanism for lipid distribution away from the liver. *Hepatology*. 2015;61(1):141-52.
237. Kong G, Zhang J, Zhang S, Shan C, Ye L, Zhang X. Upregulated microRNA-29a by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell migration by targeting PTEN in cell culture model. *PloS one*. 2011;6(5):e19518.
238. Li J, Zhang Y, Kuruba R, Gao X, Gandhi CR, Xie W, et al. Roles of microRNA-29a in the antifibrotic effect of farnesoid X receptor in hepatic stellate cells. *Molecular pharmacology*. 2011;80(1):191-200.
239. Bai Y, Xue Y, Xie X, Yu T, Zhu Y, Ge Q, et al. The RNA expression signature of the HepG2 cell line as determined by the integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles. *Gene*. 2014;548(1):91-100.
240. Harano Y, Yasui K, Toyama T, Nakajima T, Mitsuyoshi H, Mimani M, et al. Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, reduces hepatic steatosis and lipid peroxidation in fatty liver Shionogi mice with hereditary fatty liver. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2006;26(5):613-20.
241. Yan F, Wang Q, Xu C, Cao M, Zhou X, Wang T, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation induces hepatic steatosis, suggesting an adverse effect. *PloS one*. 2014;9(6):e99245.
242. Rull A, Geeraert B, Aragones G, Beltran-Debon R, Rodriguez-Gallego E, Garcia-Heredia A, et al. Rosiglitazone and fenofibrate exacerbate liver steatosis in a mouse model of obesity and hyperlipidemia. A transcriptomic and metabolomic study. *Journal of proteome research*. 2014;13(3):1731-43.
243. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PloS one*. 2011;6(8):e23937.

## **6 Referencias Bibliográficas**

244. Becker PP, Rau M, Schmitt J, Malsch C, Hammer C, Bantel H, et al. Performance of Serum microRNAs -122, -192 and -21 as Biomarkers in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PloS one*. 2015;10(11):e0142661.
245. Auguet T, Aragonés G, Berlanga A, Guiu-Jurado E, Martí A, Martínez S, et al. miR33a/miR33b\* and miR122 as Possible Contributors to Hepatic Lipid Metabolism in Obese Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(10).
246. Liu XL, Pan Q, Zhang RN, Shen F, Yan SY, Sun C, et al. Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of non-alcoholic steatohepatitis in a Chinese population. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(44):9844-52.
247. Lopez-Riera M, Conde I, Quintas G, Pedrola L, Zaragoza A, Perez-Rojas J, et al. Non-invasive prediction of NAFLD severity: a comprehensive, independent validation of previously postulated serum microRNA biomarkers. *Scientific reports*. 2018;8(1):10606.
248. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
249. Hu J, Xu Y, Hao J, Wang S, Li C, Meng S. MiR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein & cell*. 2012;3(5):364-71.
250. Roderburg C, Benz F, Vargas Cardenas D, Koch A, Janssen J, Vucur M, et al. Elevated miR-122 serum levels are an independent marker of liver injury in inflammatory diseases. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2015;35(4):1172-84.
251. López-Riera M, Sáez E, Conde I, Blázquez T, Benlloch S, Prieto M, et al. New microRNAs for the non-invasive prediction of steatosis, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. In: *Meet ASASLSa*, editor. 2016.
252. Celikbilek M, Baskol M, Taheri S, Deniz K, Dogan S, Zararsiz G, et al. Circulating microRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of hepatology*. 2014;6(8):613-20.
253. Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ, Armstrong NJ, Vallely MP, van Zandwijk N, et al. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PloS one*. 2011;6(9):e24145.
254. Di Mauro S, Ragusa M, Urbano F, Filippello A, Di Pino A, Scamporrino A, et al. Intracellular and extracellular miRNome deregulation in cellular models of NAFLD or NASH: Clinical implications. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2016;26(12):1129-39.
255. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*. 2008;245(3):194-205.
256. Poupon R. Liver alkaline phosphatase: a missing link between cholestasis and biliary inflammation. *Hepatology*. 2015;61(6):2080-90.

## **6 Referencias Bibliográficas**

257. Fernandez NJ, Kidney BA. Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Veterinary clinical pathology*. 2007;36(3):223-33.
258. Antoine DJ, Jenkins RE, Dear JW, Williams DP, McGill MR, Sharpe MR, et al. Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity. *Journal of hepatology*. 2012;56(5):1070-9.
259. Albayrak A, Uyanik MH, Cerrah S, Altas S, Dursun H, Demir M, et al. Is HMGB1 a new indirect marker for revealing fibrosis in chronic hepatitis and a new therapeutic target in treatment? *Viral immunology*. 2010;23(6):633-8.
260. Schomaker S, Warner R, Bock J, Johnson K, Potter D, Van Winkle J, et al. Assessment of emerging biomarkers of liver injury in human subjects. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2013;132(2):276-83.
261. Antoine DJ, Dear JW, Lewis PS, Platt V, Coyle J, Masson M, et al. Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. *Hepatology*. 2013;58(2):777-87.
262. Dear JW, Clarke JI, Francis B, Allen L, Wraight J, Shen J, et al. Risk stratification after paracetamol overdose using mechanistic biomarkers: results from two prospective cohort studies. *The lancet Gastroenterology & hepatology*. 2018;3(2):104-13.
263. Thulin P, Nordahl G, Gry M, Yimer G, Aklillu E, Makonnen E, et al. Keratin-18 and microRNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2014;34(3):367-78.
264. Lee J, Ji SC, Kim B, Yi S, Shin KH, Cho JY, et al. Exploration of Biomarkers for Amoxicillin/Clavulanate-Induced Liver Injury: Multi-Omics Approaches. *Clinical and translational science*. 2017;10(3):163-71.
265. Russo MW, Steuerwald N, Norton HJ, Anderson WE, Foureau D, Chalasani N, et al. Profiles of miRNAs in serum in severe acute drug induced liver injury and their prognostic significance. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2017;37(5):757-64.
266. Kakisaka K, Yoshida Y, Suzuki Y, Sato T, Kuroda H, Miyasaka A, et al. Serum markers for mitochondrial dysfunction and cell death are possible predictive indicators for drug-induced liver injury by direct acting antivirals. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2018;48(1):78-86.
267. Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB. miR-122--a key factor and therapeutic target in liver disease. *Journal of hepatology*. 2015;62(2):448-57.

## **6 Referencias Bibliográficas**

268. Lian J, Jing Y, Dong Q, Huan L, Chen D, Bao C, et al. miR-192, a prognostic indicator, targets the SLC39A6/SNAIL pathway to reduce tumor metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(3):2672-83.
269. Lin Y, Ding D, Huang Q, Liu Q, Lu H, Lu Y, et al. Downregulation of miR-192 causes hepatic steatosis and lipid accumulation by inducing SREBF1: Novel mechanism for bisphenol A-triggered non-alcoholic fatty liver disease. *Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids*. 2017;1862(9):869-82.
270. Castro RE, Ferreira DM, Afonso MB, Borralho PM, Machado MV, Cortez-Pinto H, et al. miR-34a/SIRT1/p53 is suppressed by ursodeoxycholic acid in the rat liver and activated by disease severity in human non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*. 2013;58(1):119-25.
271. Lim JY, Liu C, Hu KQ, Smith DE, Wang XD. Ablation of carotenoid cleavage enzymes (BCO1 and BCO2) induced hepatic steatosis by altering the farnesoid X receptor/miR-34a/sirtuin 1 pathway. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2018;654:1-9.
272. Yang F, Gong J, Wang G, Chen P, Yang L, Wang Z. Waltonitone inhibits proliferation of hepatoma cells and tumorigenesis via FXR-miR-22-CCNA2 signaling pathway. *Oncotarget*. 2016;7(46):75165-75.
273. Chen J, Wu FX, Luo HL, Liu JJ, Luo T, Bai T, et al. Berberine upregulates miR-22-3p to suppress hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting Sp1. *American journal of translational research*. 2016;8(11):4932-41.
274. Rodrigues PM, Afonso MB, Simao AL, Borralho PM, Rodrigues CMP, Castro RE. Inhibition of NF-kappaB by deoxycholic acid induces miR-21/PDCD4-dependent hepatocellular apoptosis. *Scientific reports*. 2015;5:17528.
275. Liu X, Zhang A, Xiang J, Lv Y, Zhang X. miR-451 acts as a suppressor of angiogenesis in hepatocellular carcinoma by targeting the IL-6R-STAT3 pathway. *Oncology reports*. 2016;36(3):1385-92.
276. Li HP, Zeng XC, Zhang B, Long JT, Zhou B, Tan GS, et al. miR-451 inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma through direct suppression of IKK-beta. *Carcinogenesis*. 2013;34(11):2443-51.
277. Zhu B, Wei XX, Wang TB, Zhou YC, Liu AM, Zhang GW. Increased miR-16 expression induced by hepatitis C virus infection promotes liver fibrosis through downregulation of hepatocyte growth factor and Smad7. *Archives of virology*. 2015;160(8):2043-50.
278. Kirchmeyer M, Servais FA, Hamdorf M, Nazarov PV, Ginolhac A, Halder R, et al. Cytokine-mediated modulation of the hepatic miRNome: miR-146b-5p is an IL-6-inducible miRNA with multiple targets. *Journal of leukocyte biology*. 2018;104(5):987-1002.

## **6 Referencias Bibliográficas**

279. Bleau AM, Redrado M, Nistal-Villan E, Villalba M, Exposito F, Redin E, et al. miR-146a targets c-met and abolishes colorectal cancer liver metastasis. *Cancer letters*. 2018;414:257-67.
280. Fan J, Li H, Nie X, Yin Z, Zhao Y, Chen C, et al. MiR-30c-5p ameliorates hepatic steatosis in leptin receptor-deficient (db/db) mice via down-regulating FASN. *Oncotarget*. 2017;8(8):13450-63.
281. O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, Howard-Cofield E, Krejsa CM, Slaughter MR, et al. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Archives of toxicology*. 2006;80(9):580-604.

## **7- ANEXO I**



**Tabla 1: Componentes y concentraciones de la mezcla de ácidos biliares empleada en los tratamientos celulares *in vitro*.**  
La concentración de la mezcla stock es de 30mM.

<b>Compuesto</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Conc. en plasma (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Conc. en la mezcla (mM)</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Conc. individual (mM)</b>	<b>Vol para la mezcla (<math>\mu</math>L)</b>
Colato de sodio	CA	0,3	2,78	430,6	45	309
Glicocolato de sodio	GCA	0,3	2,87	487,6	45	319
Hidrato de taurocolato de sodio	TCA	0,04	0,36	537,7	45	40
Chenodeoxicolato de sodio	CDCA	0,4	3,89	414,6	45	433
Glico-chenodeoxicolato de sodio	GCDCA	1,1	11,03	471,6	45	1225
Tauro-chenodeoxicolato de sodio	TCDCA	0,2	1,66	521,7	45	184
Deoxicolato de sodio	DCA	0,4	3,79	414,6	45	421
Glico-deoxicolato de sodio	GDCA	0,3	2,58	471,6	45	286
Hidrato de taurodeoxicolato de sodio	TDCA	0,04	0,45	521,7	45	50
Ácido litocólico	LCA	0,02	0,18	376,6	45	20
Taurolitocolato de sodio	TLCA	0,01	0,10	505,7	45	11

**Tabla 2: Concentraciones terapéuticas y subcitotóxicas de los fármacos y compuestos utilizados en los distintos ensayos *in vitro*.**

Compuesto	Grupo terapéutico	Abreviatura	Conc Terapéut C <sub>max</sub> ( $\mu$ M)	200 x C <sub>max</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>10</sub> ( $\mu$ M)	Dosis <i>HIGH</i> ( $\mu$ M)	Dosis <i>LOW</i> ( $\mu$ M)
Ácido acetilsalicílico	Analgésico y antipirético	ASPI	1650	330000	ND	6000	2000
Amikacina	Antibiótico	AMIK	34,3	6860	>4000	4000	2000
Amiodarona	Antiarrítmico	AMIO	2,2	440	26	25	12,5
Amitriptilina	Antidepresivo	AMIT	0,19	38	47	25	12,5
Amlodipino	Antihipertensivo	AMLO	0,16	32	50	15	5
$\alpha$ -naftilisotiocianato	-	ANIT	NA	NA	NA	50	20
Atorvastatina	Hipolipemiente	ATOR	0,013	2,6	2	1	0,3
Ciclosporina	Inmunosupresor	CYCA	0,77	154	14	25	12,5
Citrato	-	CITR	NA	NA	>1000	500	250
Clorpromazina	Antipsicóticos	CHLO	0,5	100	30	25	12,5
Diazepam	Ansiofíticos	DIAZ	7	1400	500	500	170
Doxiciclina	Antibiótico	DOXY	8,77	1754	538	500	250
Etinilestradiol	Hormona	ETHY	0,003	0,6	ND	25	12,5
Fenofibrato	Hipolipemiente	FENO	83,1	16620	>2500	2000	850
Hidroclorotiazida	Antihipertensivo	HDCT	7	1400	50	50	17
Irbesartan	Antihipertensivo	IRBE	7,7	1540	150	150	50
Ketotifeno	Antihistamínico	KETO	0,0001	0,02	130	75	37,5
Lorazepam	Ansiofítico	LORA	0,8	160	>250	250	80
Maprotilina	Antidepresivo	MAPR	0,16	32	ND	15	3

## 7 Anexo I

Metformina	Antidiabético	METF	7,8	1560	>300	300	100
Omeprazol	Inhibidor de la bomba de H <sup>+</sup>	OMEP	11,6	2320	500	300	170
Paracetamol	Analgésico y antipirético	PARA	130	26000	5000	4500	1500
Paroxetina	Antidepresivo	PARO	0,3	60	125	20	10
Simvastatina	Hipolipemiente	SIMV	0,02	4	>7,5	7,5	2,5
Sitagliptina	Antidiabético	SITA	3,95	790	>1000	1000	300
Tamoxifeno	Quimioterápico	TAMO	0,27	54	35	30	15
Tramadol	Analgésico	TRAM	1,7	340	>500	500	170
Valproato	Antiepiléptico	VALP	481	96200	8870	1000	500
Venlafaxina	Antidepresivo	VENL	1,3	260	ND	400	130

IC<sub>10</sub>, *Inhibitory concentration 10*; ND, no determinada; NA, no aplicable

Referencias: (184, 185, 281)

**Tabla 3: miRNAs con una expresión alterada en células HepG2 tratadas con CYCA. Affymetrix GeneChip® miRNA 3.0 Arrays**

<b>A</b>	<b>ID transcrito</b>	<b>p-valor (CYCA vs DMSO)</b>	<b>Cociente (CYCA vs DMSO)</b>		<b>ID transcrito</b>	<b>p-valor (CYCA vs DMSO)</b>	<b>Cociente (CYCA vs DMSO)</b>
<b>Significativamente inducidos</b>							
1	<b>hsa-miR-27a-5p</b>	0,003	14,62	20	hsa-miR-4721	0,01	2,37
2	hsa-miR-4417	0,02	9,27	21	<b>hsa-miR-628-3p</b>	0,08	2,34
3	<b>hsa-miR-23a-5p</b>	0,003	6,39	22	hsa-miR-4497	0,01	2,34
4	<b>hsa-miR-1231</b>	0,005	5,85	23	<b>hsa-mir-663b</b>	0,02	2,33
5	<b>hsa-miR-200a-5p</b>	0,04	5,05	24	<b>hsa-mir-663b</b>	0,01	2,31
6	<b>hsa-miR-92b-5p</b>	0,05	5,04	25	hsa-miR-6836-5p	0,02	2,16
7	<b>hsa-miR-29b-1-5p</b>	0,00003	4,69	26	hsa-mir-6746	0,04	2,11
8	<b>hsa-miR-21-3p</b>	0,002	4,38	27	hsa-miR-3178	0,002	2,01
9	<b>hsa-miR-22-5p</b>	0,004	3,72	28	hsa-miR-181b-5p	0,04	2,00
10	<b>hsa-miR-1260a</b>	0,002	3,48	29	<b>hsa-miR-24-2-5p</b>	0,002	1,98
11	<b>hsa-miR-3929</b>	0,002	3,28	30	hsa-miR-148a-5p	0,04	1,97
12	<b>hsa-miR-346</b>	0,05	3,11	31	hsa-miR-4299	0,02	1,91
13	<b>hsa-mir-21</b>	0,03	3,07	32	hsa-mir-4767	0,05	1,91
14	hsa-miR-3195	0,02	3,07	33	hsa-mir-3180-1	0,001	1,84
15	hsa-miR-4443	0,0004	2,71	34	hsa-mir-3180-2	0,001	1,84
16	hsa-miR-6768-5p	0,04	2,52	35	hsa-mir-3180-3	0,001	1,84
17	<b>hsa-mir-663a</b>	0,03	2,49	36	<b>hsa-miR-27a-3p</b>	0,02	1,80
18	hsa-miR-4428	0,04	2,42	37	hsa-miR-4749-5p	0,03	1,75
19	hsa-miR-1343-5p	0,01	2,38	38	hsa-miR-4783-3p	0,04	1,75

39	<b>hsa-miR-22-3p</b>	0,0002	1,75	48	hsa-miR-550a-3-5p	0,04	1,61
40	hsa-miR-5100	0,02	1,74	49	hsa-miR-3651	0,03	1,61
41	hsa-miR-92a-1-5p	0,02	1,73	50	hsa-mir-658	0,03	1,57
42	hsa-mir-5095	0,01	1,70	51	hsa-miR-23a-3p	0,002	1,57
43	hsa-miR-4786-3p	0,01	1,70	52	hsa-miR-615-5p	0,01	1,56
44	hsa-miR-4758-5p	0,02	1,70	53	hsa-miR-6884-3p	0,03	1,52
45	hsa-miR-486-3p	0,04	1,67	54	<b>hsa-miR-29a-3p</b>	0,05	1,31
46	hsa-mir-4734	0,03	1,64				
47	hsa-miR-942-3p	0,04	1,62				

<b>B</b>	ID transcrito	<i>p</i> -valor (CYCA vs DMSO)	Cociente (CYCA vs DMSO)	ID transcrito	<i>p</i> -valor (CYCA vs DMSO)	Cociente (CYCA vs DMSO)	
<b>Significativamente inhibidos</b>							
1	hsa-miR-1257	0,02	0,67	12	hsa-miR-551b-5p	0,05	0,59
2	<b>hsa-miR-16-5p</b>	0,04	0,64	13	<b>hsa-miR-15a-5p</b>	0,04	0,56
3	hsa-mir-550a-1	0,02	0,63	14	hsa-miR-4521	0,03	0,53
4	hsa-mir-550a-2	0,02	0,63	15	hsa-miR-6880-5p	0,03	0,51
5	hsa-mir-550a-3	0,02	0,63	16	hsa-miR-6740-5p	0,04	0,49
6	hsa-miR-18b-5p	0,01	0,63	17	hsa-miR-6779-5p	0,005	0,49
7	hsa-let-7g-5p	0,01	0,63	18	<b>hsa-miR-15b-5p</b>	0,01	0,49
8	hsa-mir-8084	0,03	0,62	19	hsa-miR-4732-5p	0,01	0,48
9	hsa-miR-6777-5p	0,02	0,61	20	hsa-miR-3149	0,001	0,45
10	hsa-miR-6778-5p	0,01	0,60	21	hsa-miR-6511b-5p	0,004	0,41
11	hsa-mir-4521	0,03	0,60	22	hsa-miR-6769a-5p	0,01	0,41

**7 Anexo I**

23	hsa-miR-1244	0,03	0,14
24	<b>hsa-miR-628-5p</b>	0,001	0,13

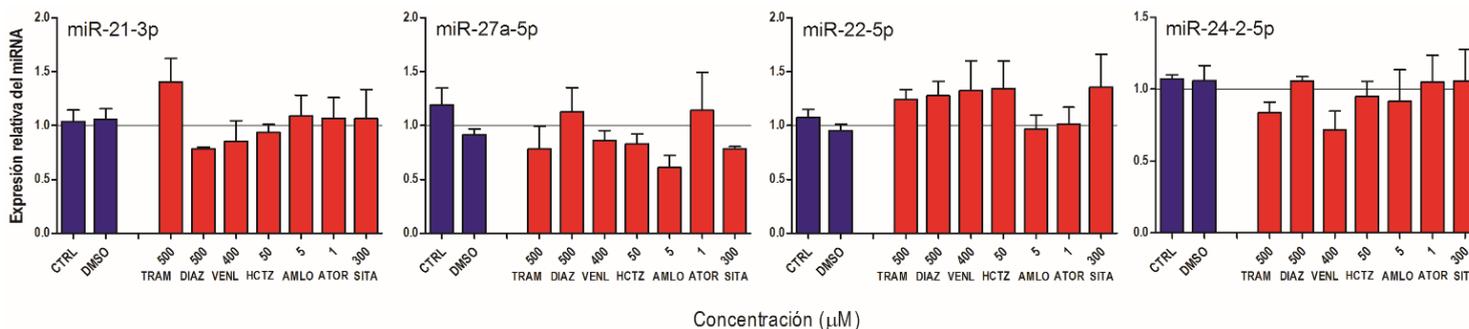
25	<b>hsa-miR-1298-3p</b>	0,02	0,05
----	------------------------	------	------

**C**

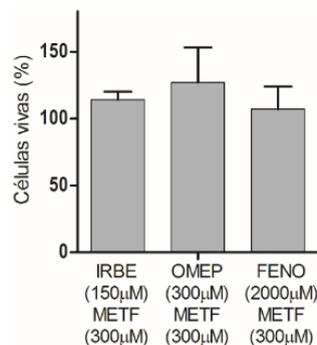
	ID transcrito	<i>p</i> -valor (CYCA vs DMSO)	Cociente (CYCA vs DMSO)
<b>Inhibidos (sin significación estadística)</b>			
1	<b>hsa-miR-202-3p</b>	0,11	<b>0,53</b>
2	<b>hsa-miR-126-3p</b>	0,39	<b>0,43</b>
3	<b>hsa-miR-126-5p</b>	0,38	<b>0,35</b>
4	<b>hsa-miR-376c-5p</b>	0,33	<b>0,22</b>
5	<b>hsa-miR-16-2-3p</b>	0,25	<b>0,13</b>
6	<b>hsa-miR-335-5p</b>	0,08	<b>0,10</b>
7	<b>hsa-miR-548a-3p</b>	0,14	<b>0,06</b>

	ID transcrito	<i>p</i> -valor (CYCA vs DMSO)	Cociente (CYCA vs DMSO)
<b>miRNAs importantes en el metabolismo lipídico del hígado</b>			
1	<b>hsa-miR-21-5p</b>	0,70	1,10
2	<b>hsa-miR-122-5p</b>	0,23	0,86
3	<b>hsa-miR-33a-5p</b>	0,30	0,82
4	<b>hsa-miR-34a-5p</b>	0,24	0,80

**Figura 1: Algunos fármacos de SM no alteran la expresión de los miRNAs biomarcadores de esteatosis iatrogénica.** Las células HepG2 se expusieron a concentraciones subcitotóxicas de varios medicamentos comunes para SM durante 24h. Los niveles intracelulares de los miRNAs se analizaron por RT-qPCR.



**Figura 2: Citotoxicidad de algunas combinaciones de fármacos de SM en células HepG2.** Las células HepG2 fueron incubadas durante 24h con combinaciones de 2 o 3 compuestos de SM a las concentraciones seleccionadas a partir de los anteriores ensayos de MTT (Fig.3.7).



**Tabla 4: Resumen de los estudios clínicos que evalúan miRNAs en suero como biomarcadores predictivos de EHGNA.**

<b>Pacientes Estudio + (Validación)</b>	<b>Biopsia</b>	<b>Enfoque</b>	<b>miRNAs inducidos</b>	<b>miRNAs inhibidos</b>	<b>Correlación (con)</b>	<b>AUROC (predecir)</b>	<b>Ref Año</b>
19 Controles  34 EHGNA [16 NAS $\geq$ 5]	SI	RT-PCR	-122, -34a (EHNA)  -16 (EHGNA)		-122, -34a (ALT, AST, NAS y Fib)	-122/-16/ALT $\rightarrow$ 0,93/0,96/0,91 (HGNA)  -34a/-122 $\rightarrow$ 0,75/0,70 (EHNA)	(243) 2011
311 Controles  92 EHGNA	NO	RT-PCR	-21, -34a, -122, -451 (EHGNA)		-122 (Esteatosis)		(213) 2013
90+(80) Controles  152+(103) EGNA	SI	NGS Illumina/ RT-PCR	-122, - 1290, - 27b, -192 (EHGNA)			Panel 4-miR/ALT $\rightarrow$ 0,89 /0,79 (EHGNA)	(208) 2014
20 Controles  20 EHGNA	SI	RT-PCR		-181d, - 99a, -197, -146b (EGHNA)	-197 (Inflamac)	-197/-146b/-181d/-99a $\rightarrow$ 0,77/ 0,75/ 0,86/0,76 (EHGNA)	(252) 2014
52 EHGNA	SI	RT-PCR	-122 (esteat)	-122 (Fib)	-122 (Fib)	-122/ hialuronato/ colageno IV $\rightarrow$ 0,82/0,74/0,72 (Fib.)	(179) 2014

## 7 Anexo I

16+(19) Controles	SI	miRNAs PCR- basado array (n=84) / RT-PCR	-122, - 192, -375 (EHNA)		-122, -192 (AST, GGT, TG y CK18)	-122/-192/-375 → 0,69/0,68/0,72 (NAS>5)	(174) 2015
16+(30) HGNA			-122 (Fib)			-122/ ALT/ AST/CK18 → 0,71/0,66/0,68/0,65 (EHNA)	
16+(47) EHNA						0,61/0,60/0,64/0,50 (Fib.)	
61 Controles	SI	RT-PCR	-122, - 192, -21 (EHNA)		-122, -192 (ALT y CK18) -21 (Inflam.)	Panel 3-miR/ CK18/ALT → 0,81/0,81/0,77 (EHNA)	(244) 2015
50 HGNA							
87 EHNA							
12 Controles	NO	RT-PCR		-21 (EHGNA)			(211) 2015
25 EHGNA							
37 Controles	SI	RT-PCR	-122, - 192, -34a (EHNA)		-122, -192, - 34a (Inflamac. y Balonizac.)	-34a /ALT/CK18/FIB4 /APRI → 0,81/0,68/0,71/0,68 /0,73 (EHNA)	(246) 2016
17 HGNA			-16, -21, - 146 (EHGNA)		-16 (Fib.)	-16/FIB4/APRI → 0,71/0,84/0,85 (Fib.)	
31 EHNA							
62 Controles	NO	Open Array RT-PCR System (n=818)	-122, - 34a* (EHGNA)	-331, -30c (EHGNA)			(209) 2016
18 EHGNA							

## 7 Anexo I

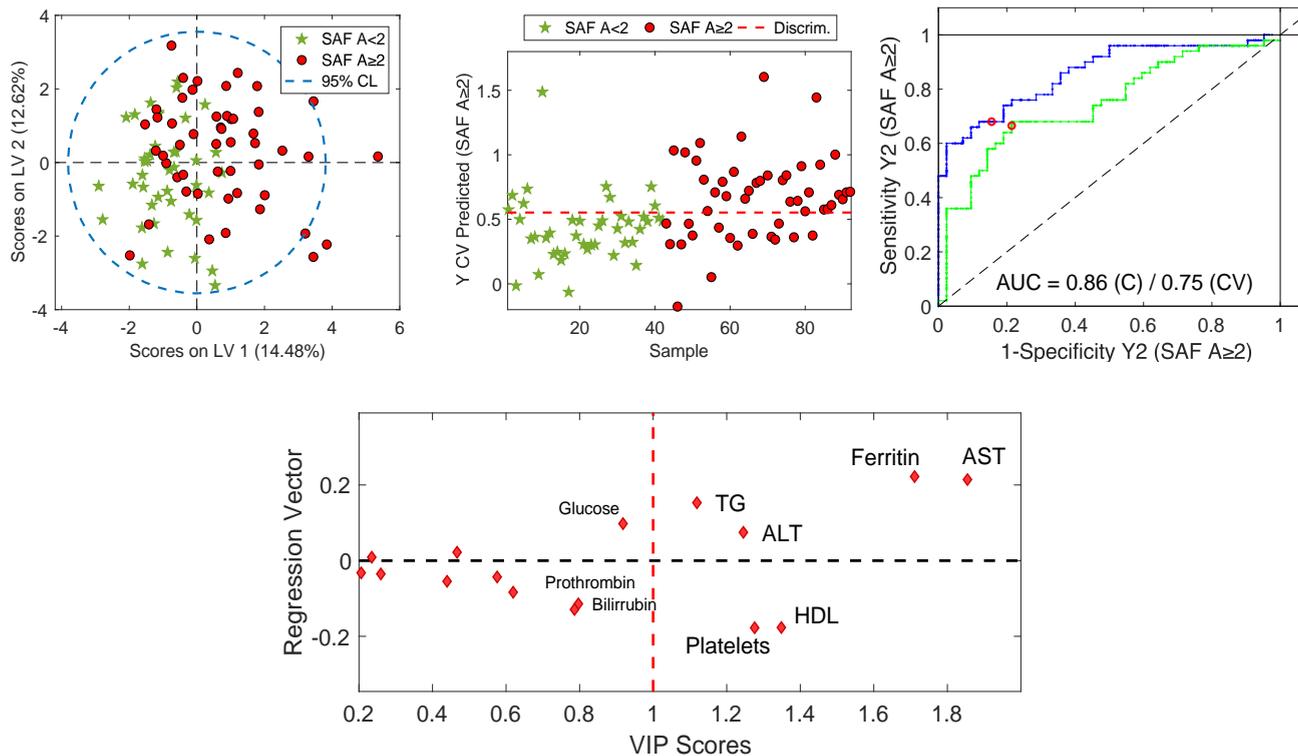
28 Controles 36 EHGNA	SI	RT-PCR	-122, -34a (EHGNA)		-34a (VLDL y TG)	-34a/-122/ALT → 0,78/0,86/0,83 (EHGNA)	(180) 2016
305 EHGNA (139 NAS $\geq$ 5)	SI	RT-PCR	-122 (Steatosis, Inflam., Baloniz., Fib.)		-122 (AST, ALT, Inflam., Baloniz., y Fib.)		(212) 2016
31 Controles 27 HGNA 34 EHNA	SI	RT-PCR	-122 (EHNA)		-122 (Glucosa, HDL, AST, ALT, Inflam. y Balonizac.)	-122 → 0,82 (EHGNA) / 0,76 (Inflam. y Baloniz.)	(245) 2016
10 Controles 43 EHGNA	SI	RT-PCR	-22, -29a (EHNA) -663a (EHGNA)		-22, -29a (Fib.) -22 (NAS)		(216, 251) 2016 /2017

**Tabla 5: Correlaciones entre los miRNAs séricos y las variables clínicas.** Los miRNAs que se encontraron inducidos en el suero de los pacientes graves de EHGNA correlacionan consistentemente con las transaminasas, la ferritina y el *score* de fibrosis APRI. Sin embargo, los miRNAs inhibidos en el suero correlacionaron con el FIB-4, el BARD y el “*NAFLD Fibrosis score*”.

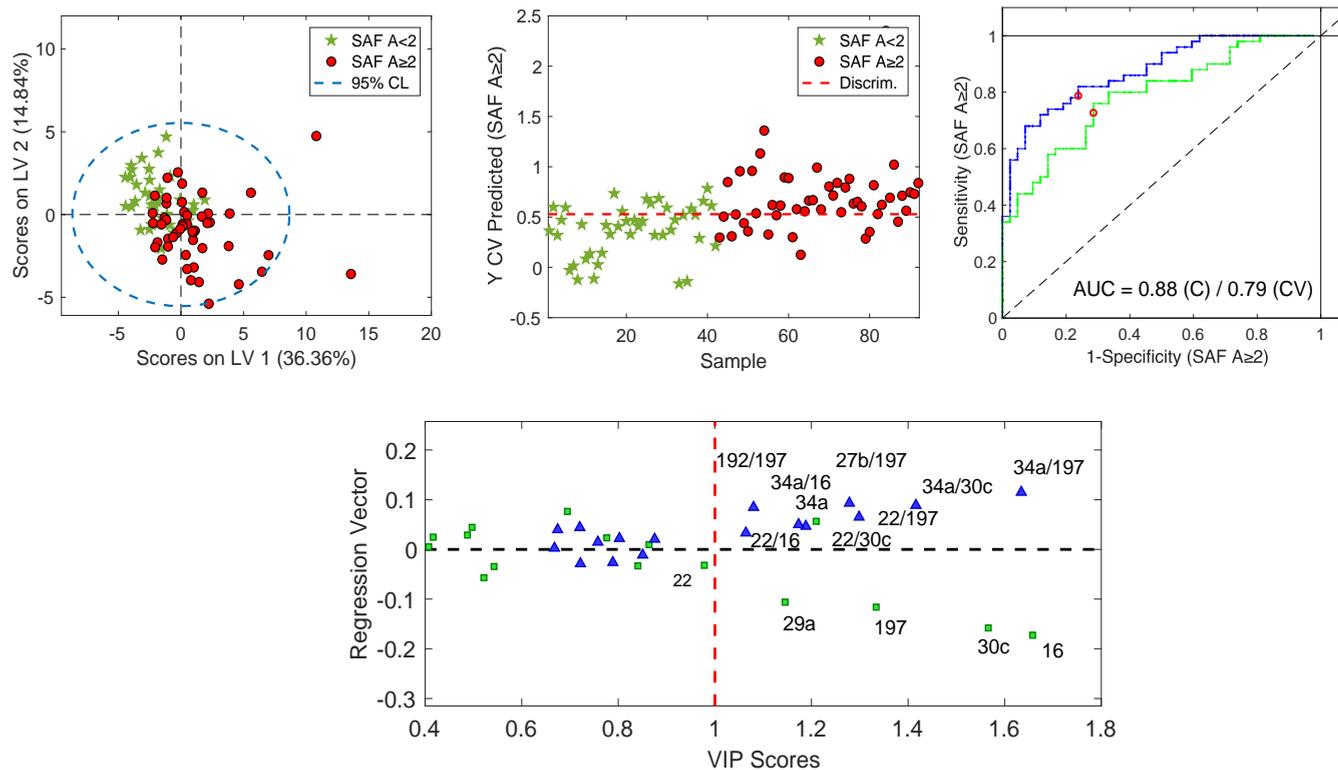
	AST	ALT	Ferritina	APRI	FIB4	BARD	NAFLD_FS
<b>miR-21-5p (r)</b>	0,30**	0,34**	0,19	0,30**	0,12	-0,05	0,03
<b>miR-22-3p (r)</b>	0,29**	0,26*	0,24*	0,29**	0,18	0,04	0,04
<b>miR-122-5p (r)</b>	0,67***	0,82***	0,33**	0,54***	0,07	-0,33**	-0,14
<b>miR-34a-5p (r)</b>	0,39***	0,24*	0,34**	0,36***	0,22*	0,17	0,11
<b>miR-192-5p (r)</b>	0,72***	0,84***	0,31**	0,62***	0,13	-0,29**	-0,06
<b>miR-27b-3p (r)</b>	0,66***	0,68***	0,35**	0,61***	0,25*	-0,15	0,02
<b>miR-30c-5p (r)</b>	-0,11	0,04	-0,01	-0,17	-0,29**	-0,24*	-0,34**
<b>miR-16-5p (r)</b>	-0,24*	-0,10	-0,08	-0,25*	-0,27**	-0,24*	-0,22*

(r) Coeficiente de correlación de Pearson. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

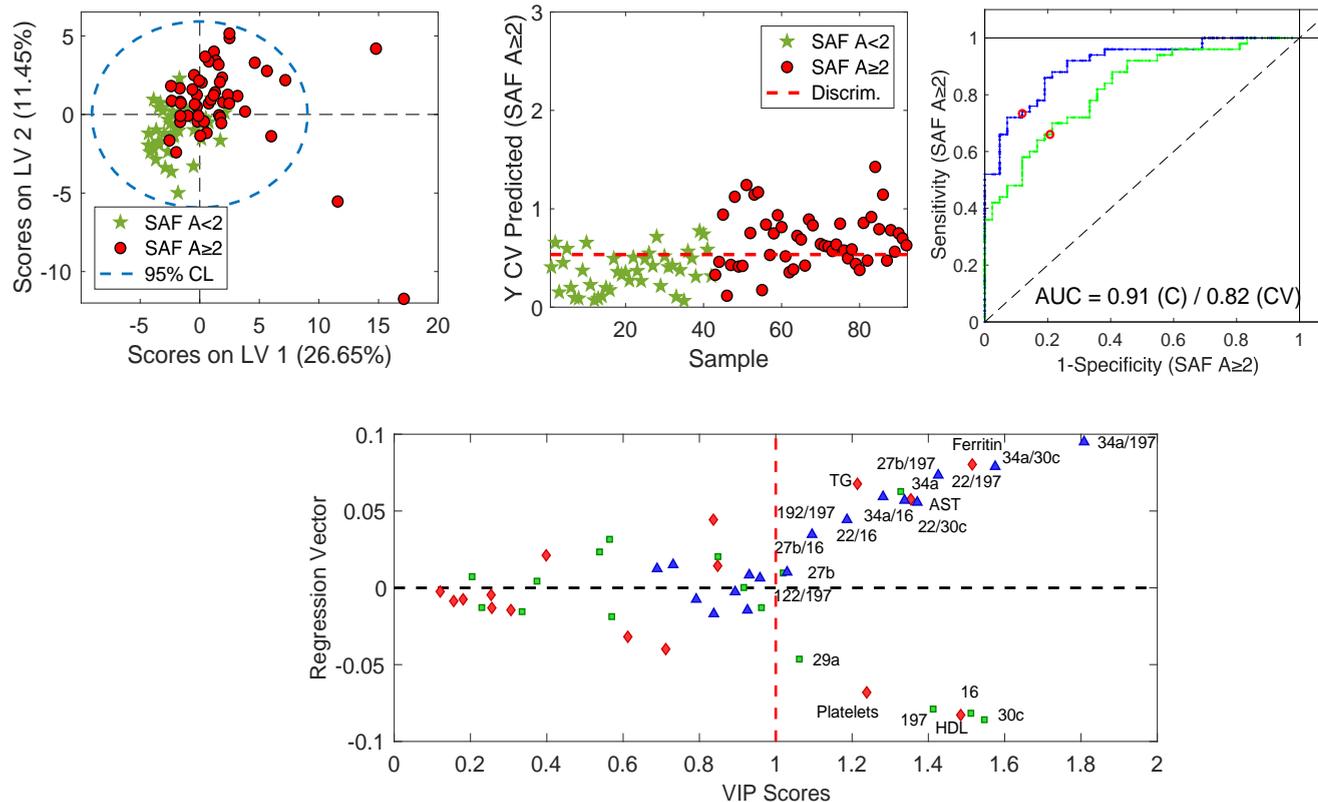
**A. Modelo PLS-DA creado para SAF  $A \geq 2$  utilizando variables clínicas en suero y evaluación de rendimiento mediante LOO-CV.**



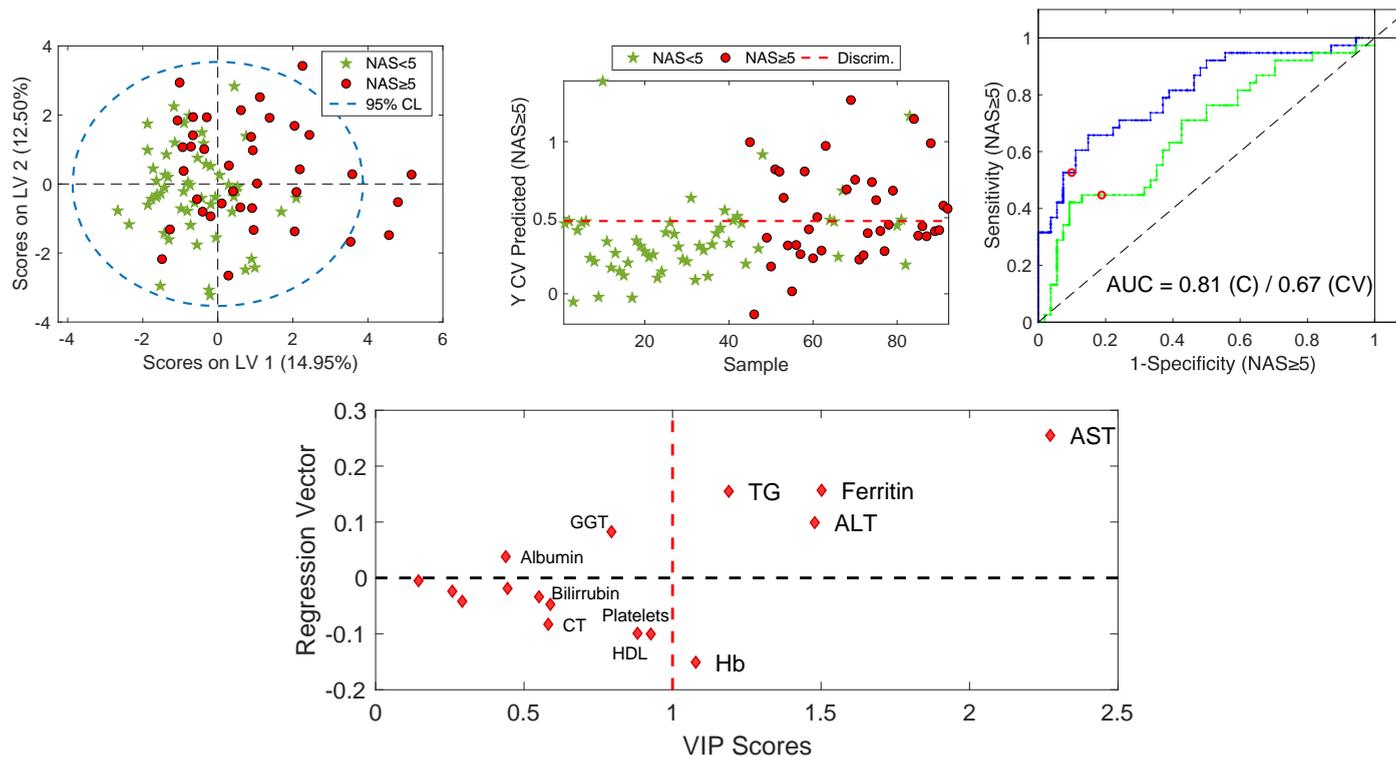
**B. Modelo PLS-DA creado para SAF  $A \geq 2$  utilizando miRNAs en suero y evaluación de rendimiento mediante LOO-CV.**



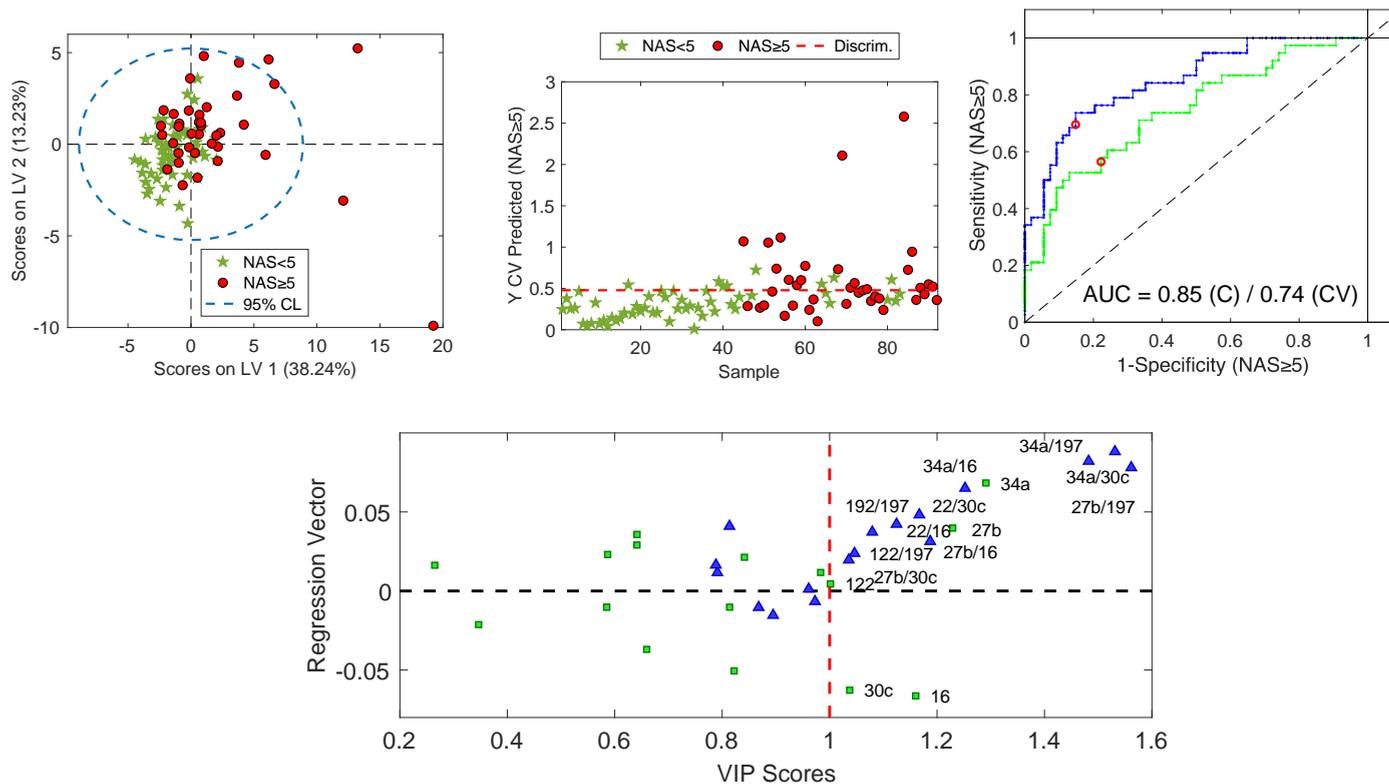
**C. Modelo PLS-DA creado para SAF  $A \geq 2$  utilizando variables clínicas y miRNAs en suero y evaluación de rendimiento mediante LOO-CV.**



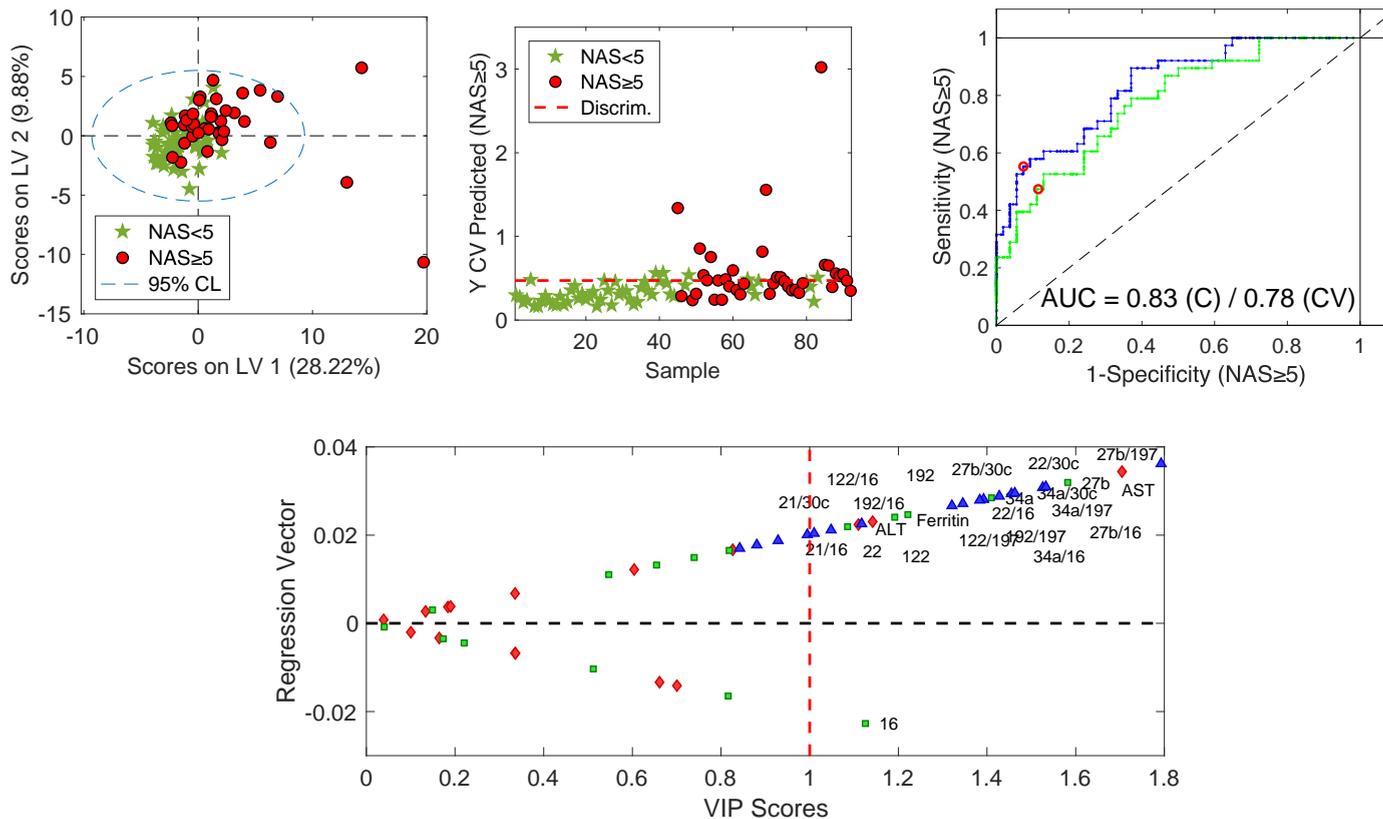
**D. Modelo PLS-DA creado para  $NAS \geq 5$  utilizando variables clínicas en suero y evaluación de rendimiento mediante LOO-CV.**



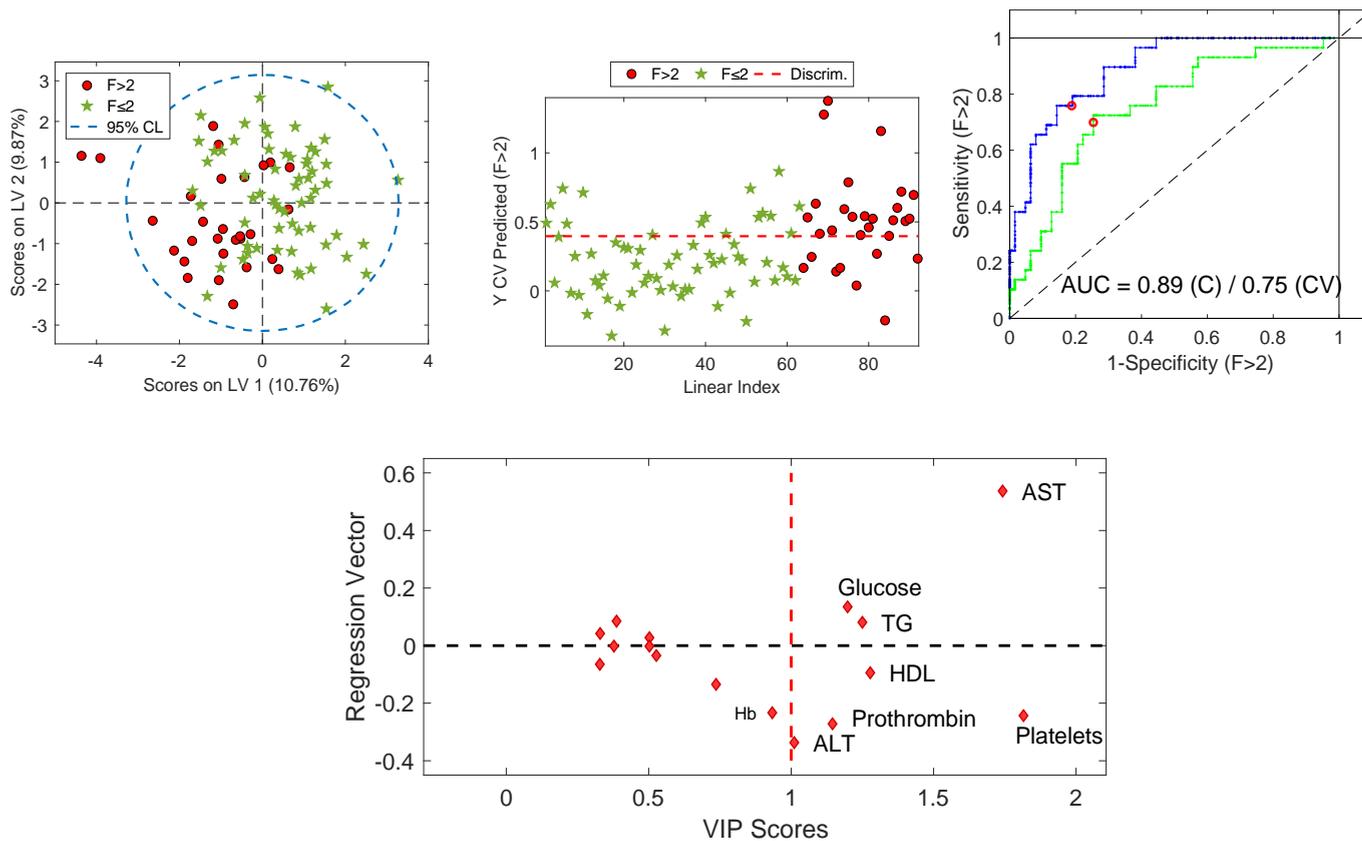
E. Modelo PLS-DA creado para  $NAS \geq 5$  utilizando miRNAs en suero y evaluación de rendimiento mediante LOO-CV.



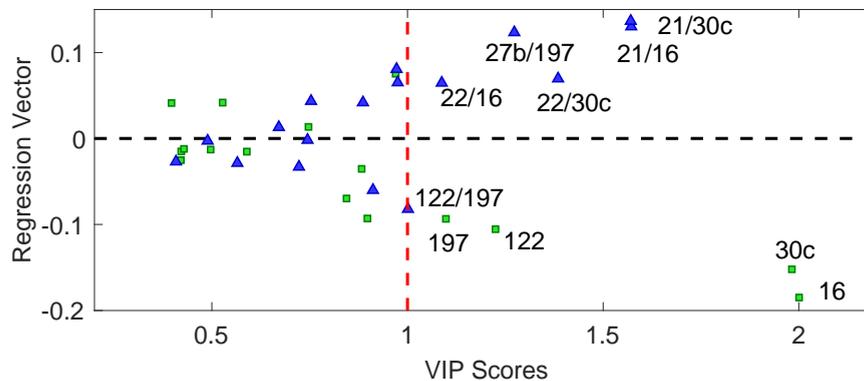
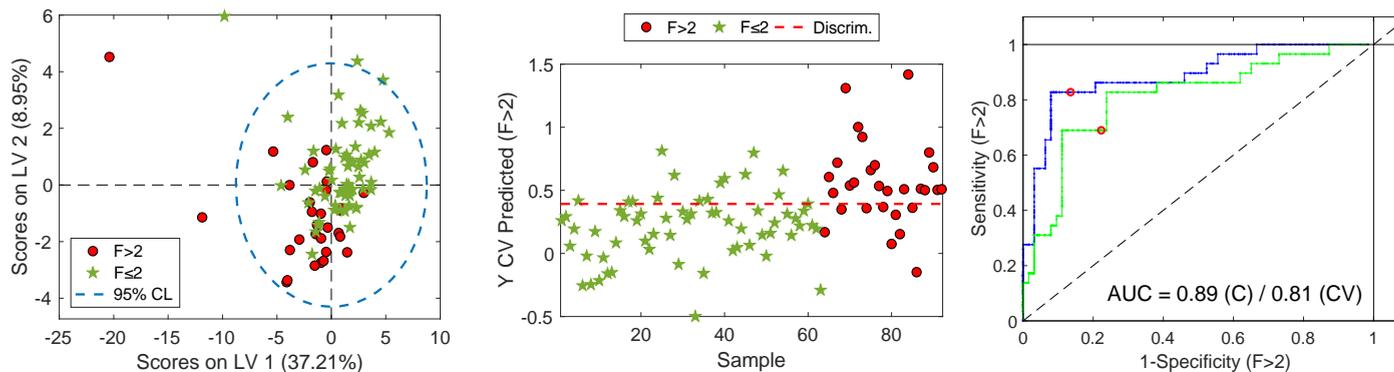
**F. Modelo PLS-DA creado para  $NAS \geq 5$  utilizando variables clínicas y miRNAs en suero y evaluación de rendimiento mediante LOO-CV.**



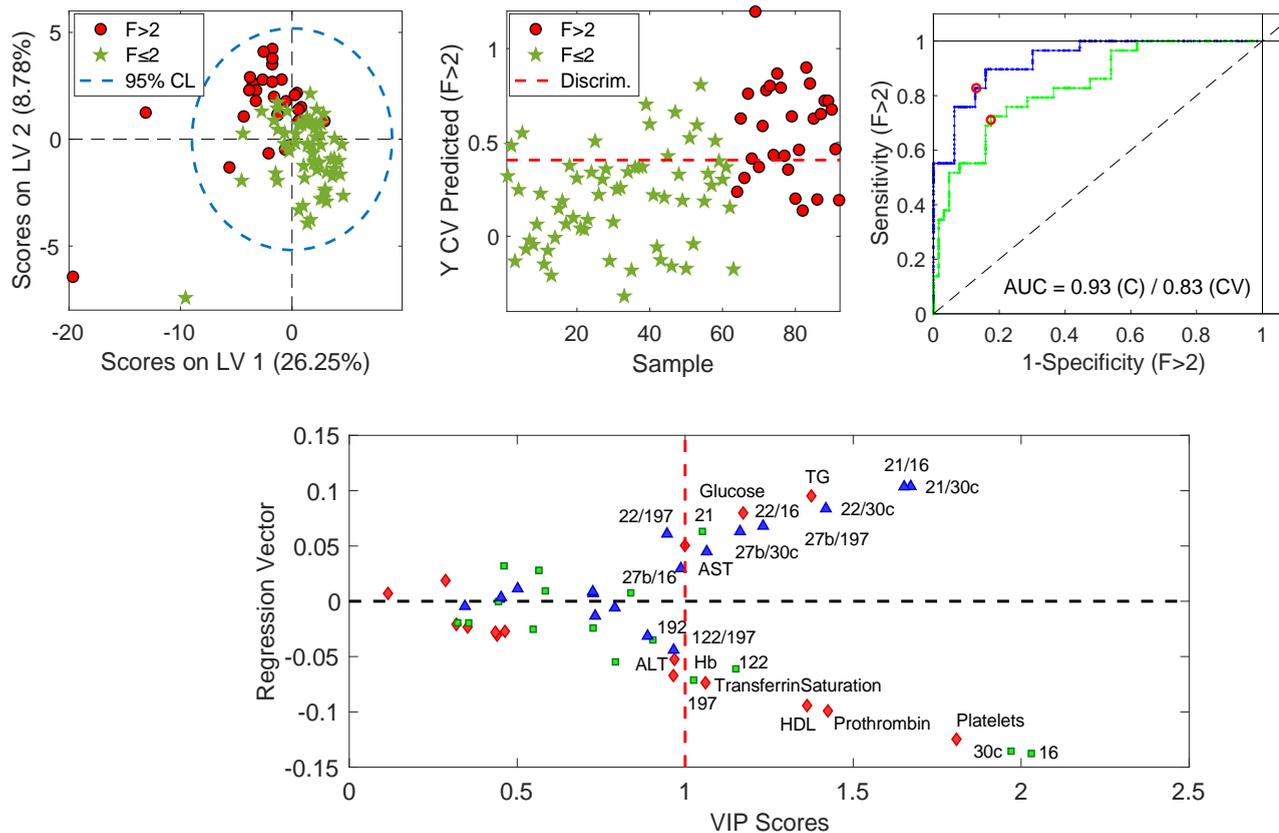
**G. Modelo PLS-DA creado para  $F > 2$  utilizando variables clínicas en suero y evaluación de rendimiento mediante LOO-CV.**



H. Modelo PLS-DA creado para F >2 utilizando miRNAs en suero y evaluación de rendimiento mediante LOO-CV.



I. Modelo PLS-DA creado para  $F > 2$  utilizando variables clínicas y miRNAs en suero y evaluación de rendimiento mediante LOO-CV.



*Figura 3: Modelos PLS-DA multivariados para la discriminación de pacientes con SAF A  $\geq 2$  (AC), NAS  $\geq 5$  (D-F) o F > 2 (G - I) y evaluación del modelo mediante validación cruzada leave-one-out (LOO-CV). Para cada panel, de izquierda a derecha: 1) gráfico de puntuaciones PLS-DA que muestra la distribución de las muestras; 2) Clases previstas por LOO-CV. Las muestras con valores pronosticados de CV por encima del umbral discriminante se clasifican como enfermedad (es decir, SAF A  $\geq 2$ , NAS  $\geq 5$  o F > 2); 3) Curvas ROC estimadas a partir de datos de calibración (línea azul) y validación cruzada (línea verde); 4) Gráfico de las puntuaciones VIP y el valor en la regresión de cada variable incluida en el modelo PLS-DA. El color indica el tipo de variable (rojo: clínico; verde: miRNA; azul: ratio miRNA). Un umbral de puntaje VIP igual a 1 se usa generalmente para identificar las variables más discriminantes en un modelo PLS-DA.*



## **8- ANEXO II**





# New microRNA Biomarkers for Drug-Induced Steatosis and Their Potential to Predict the Contribution of Drugs to Non-alcoholic Fatty Liver Disease

Mireia López-Riera<sup>1</sup>, Isabel Conde<sup>1,2</sup>, Laia Tolosa<sup>1</sup>, Ángela Zaragoza<sup>2</sup>, José V. Castell<sup>1,3,4</sup>, María J. Gómez-Lechón<sup>1,3</sup> and Ramiro Jover<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Hepatología Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain, <sup>2</sup> Servicio Medicina Digestiva, Sección Hepatología, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain, <sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, <sup>4</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universitat de València, Valencia, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Thomas Hartung,  
University of Konstanz, Germany

### Reviewed by:

Marina Evans,  
United States Environmental  
Protection Agency, USA

Laura Gribaldo,  
European Commission-Joint  
Research Centre, Italy

### \*Correspondence:

Ramiro Jover  
ramiro.jover@uv.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Predictive Toxicology,  
a section of the journal  
Frontiers in Pharmacology

**Received:** 02 November 2016

**Accepted:** 04 January 2017

**Published:** 25 January 2017

### Citation:

López-Riera M, Conde I, Tolosa L,  
Zaragoza Á, Castell JV,  
Gómez-Lechón MJ and Jover R  
(2017) New microRNA Biomarkers  
for Drug-Induced Steatosis and Their  
Potential to Predict the Contribution  
of Drugs to Non-alcoholic Fatty Liver  
Disease. *Front. Pharmacol.* 8:3.  
doi: 10.3389/fphar.2017.00003

**Background and Aims:** Drug-induced steatosis is a major reason for drug failure in clinical trials and post-marketing withdrawal; and therefore, predictive biomarkers are essential. These could be particularly relevant in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), where most patients show features of the metabolic syndrome and are prescribed with combined chronic therapies, which can contribute to fatty liver. However, specific biomarkers to assess the contribution of drugs to NAFLD are lacking. We aimed to find microRNAs (miRNAs) responsive to steatotic drugs and to investigate if they could become circulating biomarkers for drug-induced steatosis.

**Methods:** Human HepG2 cells were treated with drugs and changes in miRNA levels were measured by microarray and qRT-PCR. Drug-induced fat accumulation in HepG2 was analyzed by high-content screening and enzymatic methods. miRNA biomarkers were also analyzed in the sera of 44 biopsy-proven NAFLD patients and in 10 controls.

**Results:** We found a set of 10 miRNAs [miR-22-5p, -3929, -24-2-5p, -663a, -29a-3p, -21 (5p and 3p), -27a-5p, -1260 and -202-3p] that were induced in human HepG2 cells and secreted to the culture medium upon incubation with model steatotic drugs (valproate, doxycycline, cyclosporin A and tamoxifen). Moreover, cell exposure to 17 common drugs for NAFLD patients showed that some of them (e.g., irbesartan, fenofibrate, and omeprazole) also induced these miRNAs and increased intracellular triglycerides, particularly in combinations. Finally, we found that most of these miRNAs (60%) were detected in human serum, and that NAFLD patients under fibrates showed both induction of these miRNAs and a more severe steatosis grade.

**Conclusion:** Steatotic drugs induce a common set of hepatic miRNAs that could be used in drug screening during preclinical development. Moreover, most of these miRNAs are serum circulating biomarkers that could become useful in the diagnosis of iatrogenic steatosis.

**Keywords:** drug-induced steatosis, predictive biomarker, microRNA, metabolic syndrome drug, hepatosteatosis, non-alcoholic fatty liver disease

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Non-invasive prediction of NAFLD severity: a comprehensive, independent validation of previously postulated serum microRNA biomarkers

Mireia López-Riera<sup>1</sup>, Isabel Conde<sup>1,2</sup>, Guillermo Quintas<sup>1,3</sup>, Laia Pedrola<sup>4</sup>, Ángela Zaragoza<sup>2</sup>, Judith Perez-Rojas<sup>5</sup>, Mario Salcedo<sup>6</sup>, Salvador Benlloch<sup>2</sup>, José V. Castell<sup>1,7,8</sup> & Ramiro Jover<sup>1,7,8</sup>

Liver biopsy is currently the only reliable method to establish nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) severity. However, this technique is invasive and occasionally associated with severe complications. Thus, non-invasive diagnostic markers for NAFLD are needed. Former studies have postulated 18 different serum microRNA biomarkers with altered levels in NAFLD patients. In the present study, we have re-examined the predictive value of these serum microRNAs and found that 9 of them (miR-34a, -192, -27b, -122, -22, -21, -197, -30c and -16) associated to NAFLD severity in our independent cohort. Moreover, miR-192, -27b, -22, -197 and -30c appeared specific for NAFLD, when compared with patients with drug-induced liver injury. Preliminary serum RNAseq analysis allowed identifying novel potential miRNA biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis (NASH). The classification performance of validated miRNAs (and their ratios) for NASH was better than that reached by AST, whereas for advanced fibrosis prediction miRNAs did not perform better than the FIB-4 algorithm. Cross-validated models combining both clinical and miRNA variables showed enhanced predictivity. In conclusion, the circulating microRNAs validated demonstrate a better diagnostic potential than conventional serum markers to identify NASH patients and could complement and improve current fibrosis prediction algorithms. The research in this field is still open.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most important causes of liver disease worldwide and will likely emerge as the leading reason of end-stage liver disease in the near future, thus placing a growing strain on health-care systems. NAFLD has a global prevalence of 24% and involves a high risk of liver-related morbidity and mortality along with metabolic comorbidities<sup>1</sup>. NAFLD covers a wide spectrum of histologic lesions, ranging from isolated hepatic steatosis (nonalcoholic fatty liver; NAFL) to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), the latter characterized by the presence of lobular inflammation and hepatocyte ballooning, with or without fibrosis<sup>2</sup>. NASH, with a prevalence among biopsied NAFLD patients of 59%<sup>3</sup>, and advanced fibrosis have been associated with a risk of evolution to cirrhosis and hepatocellular carcinoma, and increased liver-related and cardiovascular mortality<sup>2,4</sup>. Therefore, identifying patients with NASH is a key clinical issue.

The diagnosis of NAFLD severity (i.e. NASH and advanced fibrosis) is established from a liver biopsy, where hepatosteatosis, lobular inflammation, ballooning and fibrosis are semi-quantitatively scored. Thus, liver biopsy allows for grading and staging, and provides information about prognosis. Two semiquantitative histological scoring systems are currently used. One is the NAFLD activity score (NAS) proposed by the NASH Clinical

<sup>1</sup>Hepatología Experimental, IIS Hospital La Fe, Valencia, Spain. <sup>2</sup>Medicina Digestiva, Sección Hepatología, Hospital La Fe, Valencia, Spain. <sup>3</sup>Health and Biomedicine, Leitat Technological Center, Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Unidad de Genómica, Servicio de Secuenciación, IIS Hospital La Fe, Valencia, Spain. <sup>5</sup>Anatomía Patológica, Sección Hepatología, Hospital La Fe, Valencia, Spain. <sup>6</sup>Medicina Interna, Hospital La Fe, Valencia, Spain. <sup>7</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. <sup>8</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.J. (email: ramiro.jover@uv.es)

# A Novel MicroRNA Signature for Cholestatic Drugs in Human Hepatocytes and Its Translation into Novel Circulating Biomarkers for Drug-Induced Liver Injury Patients

Mireia López-Riera,<sup>\*</sup> Isabel Conde,<sup>\*†</sup> José V. Castell,<sup>\*‡,§</sup> and Ramiro Jover<sup>\*‡,§,1</sup>

<sup>\*</sup>Unidad Mixta en Hepatología Experimental, IIS Hospital La Fe, 46026 Valencia, Spain; <sup>†</sup>Medicina Digestiva, Sección Hepatología, Hospital La Fe, 46026 Valencia, Spain; <sup>‡</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain; and <sup>§</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, 46010 Valencia, Spain

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed at Unidad de Hepatología Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), Av Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, Spain. Fax: +34 96 386 4186. E-mail: ramiro.jover@uv.es.

## ABSTRACT

Drug-induced liver injury (DILI) diagnosis and classification (hepatocellular, cholestatic, and mixed) relies on traditional clinical biomarkers (eg ALT and ALP), despite limitations such as extrahepatic interferences, narrow dynamic ranges, and low mechanistic value. microRNAs may be very useful for complementing traditional DILI biomarkers but most studies in this direction have considered only paracetamol poisoning. Thus the value of microRNAs (miRNAs) as biomarkers for idiosyncratic DILI has not yet been demonstrated. In this study, we first examined the effect of model cholestatic drugs on the human hepatocyte miRNome by RNAseq and RT-qPCR. Results demonstrated that chlorpromazine, cyclosporin A, and ANIT induced (miR-21-3p, -21-5p, -22-3p, -27a-5p, -1260b, -34a-5p, and -98-5p) and repressed (-122-5p, -192-5p, -30c-5p, -424-5p, and -16-5p) specific miRNAs in sandwich-cultured upcyte hepatocytes. However, no common signature was found for cholestatic drugs. Next we investigated the levels of these miRNA in human serum and found that most were also significantly altered in cholestatic/mixed DILI patients upon hospital/ambulatory admission. However, miR-122-5p, -192-5p, -34a-5p, and -22-3p demonstrated a much more significant induction in patients with hepatocellular DILI, thus revealing better specificity for hepatocellular damage. Time-course analyses demonstrated that -1260b and -146 had a very similar profile to ALP, but with wider dynamic ranges, while -16-5p and -451a showed a negative correlation. Conversely, -122-5p and -192-5p correlated with ALT but with wider dynamic ranges and faster recoveries. Finally, the 122/451a and 122/16 ratios showed excellent prediction performances in both the study [area under the receiver operating characteristic curve (AUROC) >0.93] and the validation cohort (AUROC > 0.82), and can, therefore, be postulated for the first time as circulating miRNA biomarkers for idiosyncratic DILI.

**Key words:** drug-induced liver injury; drug-induced cholestasis; microRNA; human hepatocyte; serum; predictive biomarker.

Drug-induced liver injury (DILI) may account for approximately 50% of all acute liver failures, 10% of all cases of acute hepatitis, and 5% of all hospital admissions (Singh et al., 2016; Thomas and Lewis, 2018). Furthermore, it is calculated that DILI develops

in 1 in 100 patients during hospitalization (Meier et al., 2005). According to studies in France and Iceland, DILI has an annual incidence of 14–19 per 100,000 inhabitants (Bjornsson et al., 2013; Sgro et al., 2002). However, DILI has raised more awareness



## Both cholestatic and steatotic drugs trigger extensive alterations in the mRNA level of biliary transporters in rat hepatocytes: Application to develop new predictive biomarkers for early drug development



M.Teresa Donato<sup>a,b,c</sup>, Mireia López-Riera<sup>a</sup>, José V. Castell<sup>a,b,c</sup>, María J. Gómez-Lechón<sup>a,b</sup>, Ramiro Jover, PhD<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Hepatología Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, 46026-Valencia, Spain

<sup>b</sup>CIBERehd, ISCIII, Madrid, Spain

<sup>c</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, 46010-Valencia, Spain

### HIGHLIGHTS

- The mechanisms responsible for drug-induced cholestasis are not fully understood.
- Cholestatic drugs disturb the mRNA level of most hepatocyte biliary transporters.
- The majority of steatotic drugs also affect the expression of these genes.
- OATP1A1 mRNA could be a biomarker for predicting new cholestatic/steatotic drugs.
- The mechanisms for iatrogenic cholestasis and steatosis may have common features.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 July 2016

Received in revised form 11 October 2016

Accepted 14 October 2016

Available online 17 October 2016

#### Keywords:

Drug-induced liver injury

Cholestasis

Steatosis

Biliary transporter

Predictive biomarker

Sandwich-cultured rat hepatocytes

### ABSTRACT

Disruption of the vectorial bile acid transport in the liver is a key feature of cholestatic drugs, although many causal and mechanistic aspects are still unknown. The aim of the present study was to explore if cholestatic drugs can repress or induce the expression of hepatic transporters. To this end, sandwich-cultured rat hepatocytes were treated with cholestatic and non-cholestatic (steatotic, non-hepatotoxic, etc.) drugs and the mRNA expression of 10 uptake and efflux biliary transporters was measured. Results evidenced that all cholestatic drugs cause extensive alterations in the mRNA expression of most biliary transporters. Surprisingly, nearly all steatotic drugs also affected the expression of these genes. The most frequent alterations triggered by both types of drugs were the repression of OATP1A1, NTCP and BSEP, and the induction of MRP2/3/4, MDR2 and ABCG5/8. The majority of these alterations were also observed *in vivo*, in the livers of treated rats. The common signature of cholestatic and steatotic drugs was the repression of OATP1A1. Indeed, ROC curve analysis indicated that OATP1A1 mRNA is a very sensitive marker to identify drugs with cholestatic or steatotic potential, with a maximal sensitivity and specificity of 0.917 and 0.941, respectively. We conclude that alteration of expression of hepatobiliary transporters is a hallmark of both cholestatic and steatotic drugs, lending support to a connection between these two mechanisms of hepatotoxicity. Moreover, OATP1A1 mRNA is proposed as a very simple and useful screening biomarker for the prediction of new cholestatic or steatotic drugs in early drug development.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Abbreviations:** ANIT,  $\alpha$ -Naphthyl isothiocyanate; AMIK, amikacin; AMIO, amiodarone hydrochloride; AMIT, amitriptyline; AUC, area under the curve; AZAT, azathioprine; BA, bile acid; BOSE, Bosentan; C, cholestatic drug; CHLO, chlorpromazine; CITR, citrate; CYCA, cyclosporine A; DILI, drug-induced liver injury; DOXY, doxycycline; DMSO, dimethyl sulfoxide; ETHY, ethynilestradiol; FENO, fenofibrate; GLYB, glyburide; KETO, ketotifen; MAPR, maprotiline; METF, metformin; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NCNS, non-cholestatic/non-steatotic compound; NPV, negative predictive values; PERH, perhexiline; NR, nuclear receptors; PPV, positive predictive values; SCH, sandwich-cultured hepatocytes; ROC, receiver operating characteristic; SIMV, simvastatin; S, steatotic drugs; TAMO, tamoxifen; TICL, ticlopidine; TROG, troglitazone; TETR, tetracycline hydrochloride; TIAN, tianeptine; VALP, sodium valproate; ZIDO, zidovudine.

\* Corresponding author at: Unidad Mixta Hepatología Experimental, Instituto Investigación Sanitaria Hospital La Fe (IIS La Fe), Av Fernando Abril Martorell 106, 46026-Valencia, Spain.

E-mail address: [ramiro.jover@uv.es](mailto:ramiro.jover@uv.es) (R. Jover).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.10.008>

0378-4274/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

REVIEW



## Predicting drug-induced cholestasis: preclinical models

Petar D. Petrov <sup>a,b,\*</sup>, M. Leonor Fernández-Murga <sup>a,\*</sup>, Mireia López-Riera<sup>a</sup>, M. José Gómez-Lechón<sup>a,b</sup>,  
Jose V. Castell <sup>a,b,c</sup> and Ramiro Jover <sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), Unidad de Hepatología Experimental, Valencia, Spain; <sup>b</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Madrid, Spain; <sup>c</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

### ABSTRACT

**Introduction:** In almost 50% of patients with drug-induced liver injury (DILI), the bile flow from the liver to the duodenum is impaired, a condition known as cholestasis. However, this toxic response only appears in a small percentage of the treated patients (idiosyncrasy). Prediction of drug-induced cholestasis (DIC) is challenging and emerges as a safety issue that requires attention by professionals in clinical practice, regulatory authorities, pharmaceutical companies, and research institutions.

**Area covered:** The current synopsis focuses on the state-of-the-art in preclinical models for cholestatic DILI prediction. These models differ in their goal, complexity, availability, and applicability, and can widely be classified in experimental animals and *in vitro* models.

**Expert opinion:** Drugs are a growing cause of cholestasis, but the progress made in explaining mechanisms and differences in susceptibility is not growing at the same rate. We need reliable models able to recapitulate the features of DIC, particularly its idiosyncrasy. The homogeneity and the species-specific differences move animal models away from a fair predictability. However, *in vitro* human models are improving and getting closer to the real hepatocyte phenotype, and they will likely be the choice in the near future. Progress in this area will not only need reliable predictive models but also mechanistic insights.

### ARTICLE HISTORY

Received 30 January 2018  
Accepted 7 June 2018

### KEYWORDS

Cholestatic drug; DILI; preclinical models; hepatocyte; bile acid; drug transporters; cell lines; cholestasis

## 1. Introduction

The liver is the major organ responsible for the metabolism, biotransformation, and excretion of xenobiotics, and this key physiological role makes the liver a major target for drug-induced toxicity. Liver injury in the context of drug-induced liver injury (DILI) has been defined as an elevation in the serum concentration of alanine aminotransferase (ALT), conjugated bilirubin, or alkaline phosphatase (ALP) exceeding 2× the upper limit of normal (ULN). The most common clinical presentations of DILI are hepatocellular, cholestatic, and mixed. These patterns are defined using the *R* value, where  $R = (ALT/ULN)/(ALP/ULN)$ , and are classified as hepatocellular when  $R \geq 5$ , cholestatic when  $R \leq 2$ , and mixed when  $R > 2$  and  $< 5$  [1]. In clinical DILI studies, a cholestatic pattern has been found in 18–32% of patients, a mixed pattern in 21–26%, and a hepatocellular one in 42–58%. Thus, cholestasis, defined as an impairment of the bile flow from the liver to the duodenum, appears in 41–58% of DILI cases (pure + mixed), though in mixed DILI it is not clear whether the cholestatic component is a cause or a consequence of hepatocellular liver injury [2–5].

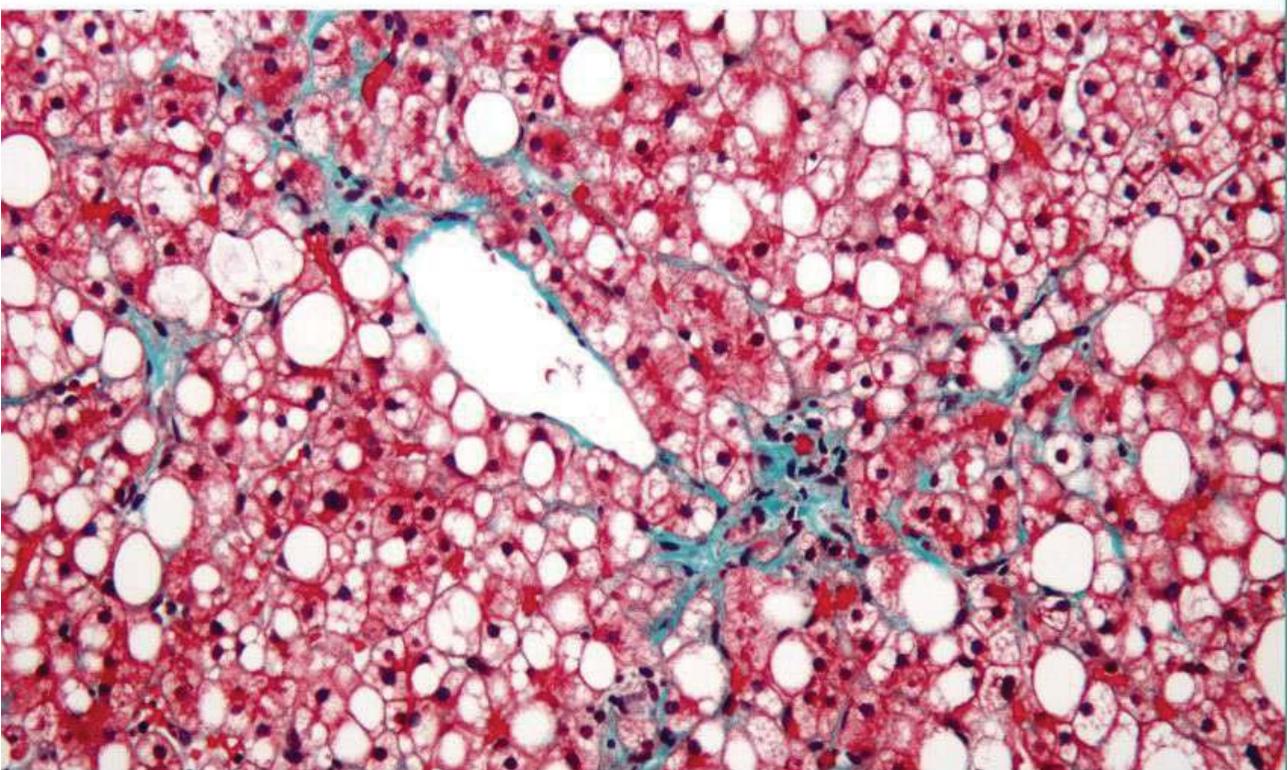
From a different point of view, DILI can be classified as intrinsic or idiosyncratic. The former includes hepatotoxic events which are predictable, reproducible, and dose-dependent. In

contrast, most instances of DILI seen in clinical practice are termed idiosyncratic because they are not clearly related to the dose or treatment period and are, consequently, unpredictable and affect only susceptible individuals. Clinical evidence suggests that most cases of drug-induced cholestasis (DIC) can be considered idiosyncratic. Intrinsic-DILI drug acetaminophen, for instance, does not trigger cholestatic liver damage, and only some drugs, such as fluorodeoxyuridines and 5-fluorouracil, which selectively damage large bile ducts (e.g. the common hepatic duct) in a dose-dependent way, can be considered intrinsic cholestatic drugs [6].

The precise molecular mechanisms leading to drug-induced bile flow impairment and its idiosyncratic nature are not completely understood and, very likely, some mechanisms are not known yet. One potential reason for this slow-advancing knowledge may come from the lack of suitable predictive preclinical models. Experimental animals, while proven useful for studying the dose-dependent and predictable hepatotoxicity, do not show the characteristic idiosyncrasy of DIC and, on top of that, they have many species-specific issues that prevent from a faultless predictability. Promising preclinical alternatives are the human *in vitro* models, which have recently demonstrated important improvements and developments that will be reviewed here.

**CONTACT** Ramiro Jover  ramiro.jover@uv.es; Jose V. Castell  jose.castell@uv.es  Avenida Fernando Abril Martorell, 106 Torre A, 46026, Valencia, Spain Unidad de Hepatología Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe)

\*These authors contributed equally to this work.



Jose Luis Olcoz Goñi / Francisco Jorquera Plaza

# Fatty liver disease

A reality with many questions

EOLAS  
ediciones

---

# 11 | TRANSCRIPTION FACTORS AND MICRORNAS INVOLVED IN LIVER LIPID METABOLISM AND THEIR INFLUENCE IN NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

---

*Mireia López-Riera and Ramiro Jover\**

Unidad Mixta en Hepatología Experimental. IIS Hospital La Fe. Avenida Fernando Abril Martorell, 106. E-46026 Valencia. Departamento Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina y Odontología. Universitat de València. Avda. Blasco Ibañez 15, E-46010 Valencia. CIBERehd. ISCIII. Madrid

## **1- INTRODUCTION - LIPID METABOLISM IN THE LIVER**

The liver is a central organ in lipid metabolism. During the postprandial period, hepatocytes take up fatty acids (FAs) mainly from the hydrolysis of triglycerides (TGs) in chylomicrons. Lipoprotein lipase (LPL), that hydrolyzes TG-rich lipoproteins, is synthesized mainly in the muscle and adipose tissue and transported to capillary endothelial cells. LPL hydrolyze dietary fats packed into chylomicrons, thus releasing FAs, of which approximately 20% are delivered to the liver bound to albumin. Degradation of TGs in chylomicrons results in their conversion into chylomicron remnants, which are also imported into hepatocytes by remnant receptors through interaction with the ApoE of the remnants. During fasting periods, hepatocytes take up non-esterified free FAs derived from lipolysis of adipose tissue.<sup>1</sup>

In addition, hepatocytes have the ability to synthesize FAs from excess glucose (de novo lipogenesis) and to hydrolyze intracellular TGs into FAs (lipolysis). These FAs, derived from various sources, are used for many important cellular events,

such as the synthesis of cellular membranes and intracellular signaling pathways. In addition, FAs can be oxidized to produce acetyl-CoA, which can be further oxidized to generate NADH and ATP, or used to synthesize ketone bodies. FAs can also be derived to the synthesis/reconstruction of TGs, which are stored in lipid droplets (LDs) within hepatocytes, or secreted into plasma as very low-density lipoprotein (VLDL) particles. VLDL particles can deliver liver TGs to adipose tissue for storage and to muscle as a source of energy. In summary, in the liver, FAs derived from peripheral tissue or diet, as well as endogenously synthesized FAs, can be used for: 1) energy and ketone body production via mitochondrial  $\beta$ -oxidation, 2) esterification into TGs and storage in liver LDs, or 3) TG synthesis and VLDL formation, along with ApoB, for secretion into the circulation.<sup>2</sup> Additionally, the liver plays an important role in cholesterol and phospholipid metabolism.

The regulation of lipid metabolism in the liver is a complex issue and malfunction of the fine-tuned transcriptional and post-transcriptional mechanisms can contribute to the settings and progression of several liver diseases such as NAFLD. The identification of the key players involved in the regulation of lipid metabolism in the liver could contribute to a better understanding of the pathogenesis of NAFLD and to pave the way for novel therapeutic strategies.

## **2. LIPID UPTAKE**

Hepatocyte uptake of FA was thought to occur through passive diffusion due to the hydrophobicity of FAs. However, recent studies indicate that the transport of FAs, particularly long-chain FAs, is regulated by plasma membrane translocases and transporters.<sup>3</sup> The rate of FA uptake into hepatocytes depends on the plasma FA level as well as the hepatocellular capacity for FA uptake. In the fasting state, a reduction in insulin levels stimulates TG hydrolysis in adipose tissue. FAs are thereby released and transported to the liver. The process of FA uptake depends on the number and activity of transporter expressed on the sinusoidal plasma membrane of the hepatocytes, which include the FA transporter proteins (FATPs), caveolins, FA translocase (FAT)/CD36 and the FABPpm.