



PROGRAMA DE DOCTORADO

CIENCIAS DE LA SALUD

**microRNAs CIRCULANTES COMO BIOMARCADORES EN  
CIRROSIS HEPÁTICA DESCOMPENSADA**

Tesis para optar al grado de doctor de:  
ANA GARCÍA GARCÍA DE PAREDES

Directores:  
AGUSTÍN ALBILLOS MARTÍNEZ  
MARÍA LAURA GARCÍA BERMEJO  
JORDI GRACIA SANCHO

Alcalá de Henares, 2021

## INFORME DE CONFORMIDAD-COORDINADOR PROGRAMA DOCTORADO

## INFORME DE CONFORMIDAD-DIRECTORES TESIS

## INFORME DE DIRECTORES-ANÁLISIS DE COINCIDENCIAS

#### **TUTOR Y DIRECTOR**

##### **Dr. Agustín Albillos Martínez**

Jefe de Servicio de Gastroenterología y Hepatología,  
Hospital Universitario Ramón y Cajal  
Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS)  
Catedrático de Medicina, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares

#### **DIRECTORA**

##### **Dra. María Laura García Bermejo**

Jefa de Grupo de Biomarcadores y Dianas Terapéuticas,  
Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS)  
Directora Científica,  
Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS)  
Profesora Asociada, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares

#### **DIRECTOR**

##### **Dr. Jordi Gracia Sancho**

Jefe de Grupo de Biología Vascul ar Hepática,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

#### **AUTORA**

##### **Ana García García de Paredes**

Médico especialista en Aparato Digestivo  
Servicio de Gastroenterología y Hepatología,  
Hospital Universitario Ramón y Cajal  
Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS)  
Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares

“Es mucho más importante saber qué persona tiene la enfermedad  
que qué enfermedad tiene la persona”  
**Hipócrates de Cos**

*Hacia la medicina personalizada desde la Antigua Grecia*

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera mostrar mi gratitud y reconocimiento a todas las personas involucradas en este proyecto. Sin su trabajo y esfuerzo esta tesis doctoral no hubiera sido posible.

A mis directores. He tenido la gran suerte de contar con tres directores para guiar cada paso de este proyecto traslacional. A Agustín, por su dedicación y por motivar una admiración que impulsa a querer estar "a la altura". A Laura, por descubrirme que existe más de una forma de liderar y representar el necesario referente para creer que es posible. A Jordi, por su entusiasmo, cercanía y disposición para resolver cualquier duda, por tonta que fuera, desde el primer día.

A todos aquellos que han colaborado y hecho posible este proyecto, empezando por el equipo del laboratorio de Jordi en IDIBAPS y de Juan Manuel Falcón en CIC bioGune. A Luis, por "sus pacientes" y por convertirse en rey mago una mañana de enero para solucionar lo imposible. A Carol, por su paciencia, su calidad humana y su Trabajazo con mayúsculas.

Quisiera agradecer también a las personas que son fundamentales para mí, porque sin ellas todo sería mucho más difícil.

A mis padres, por transmitirme con su ejemplo a esforzarme por intentar hacer las cosas "lo mejor que uno puede". A Nesi, por ser mi referente y mi brújula. A Luigi, por mostrarme cuánto puedo llegar a equivocarme. A Lolo, por su generosidad acompañada de tortitas. A mi abuela Rosita, por exprimir la vida hasta la última gota. A Florida y a Lumbrales, por acogerme y quererme como si fuera charra desde el primer día.

A la familia que uno elige. A Bristol, por la felicidad. A mis Chatis, por acercarme a la mujer que me gustaría ser. A Elisa, por la paz. A Inma, por la música. A Lola, por el calor. A Blanca, Chiara, María y demás familia de Burdeos por demostrar que los kilómetros no alejan. A Olga, Elisa y Marta, por querer seguir cerca. A Blanca, por enseñarme a no dar a nadie por sentado.

A Gastroenterología y Hepatología del Ramón y Cajal, por hacerme madrugar con ganas cada día y por cruzar mi camino con gente que entró en mi vida para quedarse. Empezando por Lara y mis R mayores, los Pardos, que me descubrieron el tipo de médico que quiero ser y que la amistad en el trabajo existe, A Edu y Sergio, por ser mi mejor apoyo. A Bea, Marta, Carla, Laura, Paco y Antonio, por todo lo que me aportan dentro y fuera del hospital. A Foru, Bea, Carlos, Elena, Miguel, Antonio, Enrique, y demás compañeros por empujarme a sacar lo mejor de mí y por su apoyo incondicional en la aventura del acino.

A Quique, por formar parte de todo lo anterior, por hacer fácil lo difícil y porque crecer y caminar contigo es mi mayor suerte.

Al Instituto de Salud Carlos III, por promover la investigación dentro del marco de la Sanidad Pública, y a todas aquellas personas que, de una forma u otra, trabajan para mantener y mejorar nuestro mayor tesoro. A Simone, Virginia, Dolores, Sheryl y larga lista de nombres y anónimos que pusieron y ponen cada día su granito de arena sin olvidar que, como decía Marie Curie, "one can only see what remains to be done".





I. ABREVIACIONES .....	11
II. RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS .....	14
III. RESUMEN .....	17
IV. INTRODUCCIÓN .....	22
1. microRNAs .....	23
1.1 Generalidades .....	23
1.2 microRNAs como biomarcadores .....	26
1.3 microRNAs en hepatopatía .....	28
2. Vesículas extracelulares .....	34
2.1 Generalidades .....	34
2.2 Vesículas extracelulares como biomarcadores .....	36
2.3 Vesículas extracelulares en hepatopatía .....	36
3. Cirrosis descompensada .....	40
3.1 Historia natural de la cirrosis descompensada .....	40
3.2 Ascitis refractaria .....	42
3.3 Disfunción cardiaca en la cirrosis .....	43
4. $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos en la cirrosis descompensada .....	46
4.1 Indicaciones y beneficios .....	46
4.2 Respuesta hemodinámica .....	46
4.3 Seguridad .....	47
V. JUSTIFICACIÓN.....	49
VI. HIPÓTESIS .....	52
VII. OBJETIVOS .....	54
VIII. MÉTODOS.....	56
1. Diseño del estudio .....	57
1.1 Identificación de una firma de microRNAs en el secretoma de cultivos de hepatocitos humanos .....	59
1.2 Análisis de la firma de microRNAs en muestras de suero de pacientes con cirrosis descompensada y controles no cirróticos.....	60
1.3 Evaluación de la firma de microRNAs como biomarcador sérico en pacientes con cirrosis descompensada .....	62
2. Periodo y lugar de realización del estudio .....	64
3. Aspectos éticos y cumplimiento de la legislación vigente .....	64
4. Estudio bioinformático .....	64
5. Análisis estadístico.....	65
IX. RESULTADOS .....	66

1. Identificación de una firma de microRNAs en el secretoma de hepatocitos humanos primarios .....	67
2. Validación de la firma de microRNAs en muestras de suero de pacientes cirróticos y controles sin cirrosis.....	69
3. Niveles séricos de la firma de microRNAs y correlación clínica en pacientes con cirrosis descompensada .....	73
3.1 Pacientes con cirrosis descompensada: Evaluación basal y tras tratamiento con $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos.....	73
3.2 Niveles séricos de microRNAs y ascitis refractaria .....	75
3.3 Niveles séricos de microRNAs y respuesta hemodinámica .....	79
3.4 Niveles séricos de microRNAs y deterioro de la función sistólica con tratamiento $\beta$ -bloqueante no cardioselectivo en pacientes con ascitis refractaria .....	81
3.5 Significado funcional de los microRNAs integrantes de la firma .....	82
X. DISCUSIÓN.....	85
XI. CONCLUSIONES .....	91
XII. LÍNEAS DE FUTURO .....	93
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	95
XIV. GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	109
XV. ANEXOS.....	113
ANEXO 1. Comunicaciones a congresos nacionales e internacionales directamente relacionadas con esta tesis doctoral. ....	114
ANEXO 2. Publicación relacionada con esta tesis doctoral. ....	116

## I. ABREVIACIONES

**ACLF:** fallo hepático agudo sobre crónico (del inglés, *acute on chronic liver failure*)

**ALT:** alanino aminotransferasa

**AST:** aspartato aminotransferasa

**AUC:** área bajo la curva (del inglés, *area under the curve*)

**BBNS:**  $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos

**BCL2:** del inglés, *B-cell lymphoma 2*

**CBP:** colangitis biliar primaria

**CEP:** colangitis esclerosante primaria

**CIC:** Centro de Investigación Cooperativa

**Ct:** umbral de ciclo o punto de corte (del inglés, *cycle threshold*)

**DILI:** daño hepático inducido por fármacos (del inglés, *drug-induced liver injury*)

**DNA:** ácido desoxirribonucleico (del inglés, *deoxyribonucleic acid*)

**DNAc:** DNA complementario

**DPPI:** derivación portal percutánea intrahepática

**EIVPD:** diferencia pico de presión de eyección intraventricular (del inglés, *ejection intraventricular pressure difference*)

**FEVI:** fracción de eyección ventricular izquierda

**GPVH:** gradiente de presión venosa hepática

**IDIBAPS:** Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer

**INR:** índice normalizado internacional (del inglés, *international normalized ratio*)

**MAFLD:** enfermedad hepática metabólica (del inglés, *metabolic associated fatty liver disease*)

**MELD:** del inglés, *model for end-stage liver disease*

**miRNAs:** microRNAs

**ncRNA:** RNA no codificante

**PBE:** peritonitis bacteriana espontánea

**qRT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (del inglés, *quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction*)

**RNA:** ácido ribonucleico (del inglés, *ribonucleic acid*)

**RIC:** rango intercuartílico

**TFGe:** tasa de filtrado glomerular estimada

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante  $\beta$

**UTR:** región no traducida (del inglés, *untranslated regions*)

**VHB:** virus de la hepatitis B

**VHC:** virus de la hepatitis C

**Vol:** volumen

**XIAP:** inhibidor de la proteína de apoptosis ligado al gen X

## II. RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS

## RELACIÓN DE FIGURAS

**Figura 1.** Dogma central de la biología molecular.

**Figura 2.** Esquema simplificado de la biogénesis de los microRNAs.

**Figura 3.** Localización de los microRNAs.

**Figura 4.** Tipos de vesículas extracelulares.

**Figura 5.** Fisiopatología de la cirrosis descompensada.

**Figura 6.** Disfunción cardiocirculatoria en la ascitis refractaria.

**Figura 7.** Efectos hemodinámicos de los  $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos y su efecto deletéreo en pacientes con ascitis refractaria.

**Figura 8.** Hipótesis del estudio.

**Figura 9.** Diseño del estudio.

**Figura 10.** Mapa de intensidad con todos los microRNAs identificados en la secuenciación.

**Figura 11.** Mapa de intensidad con los 20 microRNAs más desregulados (los 10 más expresados y los 10 menos expresados) tras secuenciar las vesículas extracelulares pequeñas del secretoma de hepatocitos cirróticos y no cirróticos.

**Figura 12.** Niveles séricos de microRNAs en muestras basales y en muestras recogidas un mes tras el inicio de tratamiento  $\beta$ -bloqueante no cardioselectivo.

**Figura 13.** Niveles séricos de la firma de microRNAs y los tres microRNAs control en muestras de sujetos sin cirrosis y pacientes con cirrosis descompensada.

**Figura 14.** Representación del área bajo la curva para determinar el valor de los niveles de microRNAs en suero como biomarcadores en pacientes con cirrosis comparado con sujetos no cirróticos.

**Figura 15.** Niveles séricos de microRNAs en pacientes con ascitis sensible a diuréticos y ascitis refractaria.

**Figura 16.** Representación del área bajo la curva de miR-181b-5p para identificar ascitis refractaria.

**Figura 17.** Correlación de los niveles séricos de miR-181b y parámetros de función renal.

**Figura 18.** Correlación entre los niveles basales de miR-452-5p y miR-885-5p en suero con las resistencias vasculares sistémicas basales en pacientes con ascitis refractaria.

**Figura 19.** Niveles séricos de microRNAs en pacientes con y sin respuesta hemodinámica a tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos.

**Figura 20.** Representación del área bajo la curva de miR-452-5p y miR-429 para identificar de respuesta hemodinámica.

**Figura 21.** Correlación entre los niveles séricos basales de miR-452-5p y miR-885-5p y la caída de la función sistólica con tratamiento  $\beta$ -bloqueante no cardioselectivo en pacientes con ascitis refractaria.

**Figura 22.** Análisis de enriquecimiento funcional de las dianas controladas por los microRNAs evaluados.

**Figura 23.** Red bipartita que representa el patrón de interacción entre los microRNAs estudiados a través de los genes diana regulados.

## **RELACIÓN DE TABLAS**

**Tabla 1.** Clasificación del RNA no codificante en función del tamaño.

**Tabla 2.** microRNAs circulantes como biomarcadores en enfermedad hepática.

**Tabla 3.** Vesículas extracelulares como biomarcadores en enfermedad hepática.

**Tabla 4.** Diferencia en los niveles séricos de microRNAs en muestras de sujetos sin cirrosis y pacientes con cirrosis descompensada (muestra basal y muestra con tratamiento).

**Tabla 5.** Características basales de los pacientes cirróticos.

**Tabla 6.** Correlación de los niveles séricos de microRNAs con las escalas de función hepática.

**Tabla 7.** Correlación de los niveles séricos de miR-181b y parámetros de función renal.

**Tabla 8.** Correlación de los niveles séricos de microRNAs con el gradiente de presión venosa hepática basal.



### **III. RESUMEN**

## INTRODUCCIÓN

La ascitis refractaria representa una fase de descompensación grave de la cirrosis hepática caracterizada por la presencia de disfunción circulatoria y elevada mortalidad. Los  $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos (BBNS) son el pilar fundamental del tratamiento para prevenir el sangrado variceal y su recurrencia y, pese a haber demostrado numerosos beneficios en pacientes con cirrosis, podrían tener un efecto deletéreo en pacientes con ascitis refractaria al comprometer sus mecanismos de compensación cardíaca. Actualmente no disponemos de marcadores no invasivos que permitan identificar a los pacientes con cirrosis descompensada y disfunción circulatoria grave en los que el uso de BBNS podría ser perjudicial. Los microRNAs (miRNAs) están desregulados en distintas patologías y existe un creciente interés en su papel como biomarcadores diagnósticos y pronósticos.

## OBJETIVO

Caracterizar una firma de miRNAs y evaluar su capacidad para distinguir ascitis refractaria, predecir respuesta hemodinámica a BBNS e identificar el desarrollo de disfunción sistólica cardíaca con tratamiento BBNS en pacientes con cirrosis descompensada.

## MÉTODOS

Estudio multicéntrico traslacional con muestras biológicas humanas que se desarrolló en tres fases: 1) Identificación de una firma de miRNAs en base a los niveles diferenciales en el secretoma de hepatocitos humanos primarios procedentes de hígados de pacientes con cirrosis descompensada (n =9) e hígados sin cirrosis (n =9). 2) Análisis de la firma de miRNAs y de 3 miRNAs control descritos previamente como biomarcadores de enfermedad hepática crónica (miR-192-5p, miR-34a-5p y miR-29a-5p) en suero de pacientes con cirrosis descompensada (n =36) y controles no cirróticos apareados por sexo y edad (n =36). 3) Evaluación de la capacidad de la firma de miRNAs para identificar ascitis refractaria, predecir respuesta hemodinámica a BBNS y aparición de disfunción cardíaca en muestras de suero de pacientes con cirrosis descompensada (n =36, 18 con ascitis refractaria). Se analizó la firma de miRNAs mediante qRT-PCR en muestras de suero basales y un mes después de iniciar tratamiento con BBNS para profilaxis de hemorragia variceal. A todos los pacientes se les realizó una medición del gradiente de presión venosa hepática (GPVH) y un ecocardiograma antes y un mes después de iniciar tratamiento con BBNS. Se definió respuesta hemodinámica como una caída en el GPVH  $\geq 10\%$  y la función sistólica cardíaca se evaluó mediante el parámetro ecocardiográfico diferencia pico de presión de eyección intraventricular.

## RESULTADOS

Se caracterizó una firma de 5 miRNAs (miR-452-5p, miR-429, miR-885-5p, miR-181b-5p y miR-122-5p) que presentaron unos niveles significativamente diferentes en el secretoma de hepatocitos cirróticos. Al analizar la firma de 5 miRNAs y los 3 miRNAs control en muestras de suero de pacientes con cirrosis descompensada y controles, los pacientes cirróticos presentaron niveles más bajos de miR-429, miR-885-5p, miR-181b-5p, miR-122-5p, miR-192-5p y miR-29a-5p (p <0,05). Al evaluar en suero la firma de miRNAs en pacientes con cirrosis descompensada, los pacientes con ascitis refractaria presentaron niveles de miR-181b-5p

significativamente superiores a los de pacientes con ascitis sensible a diuréticos ( $p = 0,008$ ). Los niveles basales de miR-452-5p y miR-429 en suero fueron significativamente menores en los pacientes que presentaron respuesta hemodinámica a BBNS ( $p = 0,006$ ). En pacientes con ascitis refractaria, los niveles séricos basales de miR-452-5p y miR-885-5p se correlacionaron inversamente con las resistencias vasculares sistémicas basales ( $\rho = -0,46$ ,  $p = 0,007$ ; y  $\rho = -0,41$ ,  $p = 0,01$ , respectivamente) y con la reducción de la función sistólica cardíaca con tratamiento BBNS ( $\rho = -0,55$ ,  $p = 0,02$ ; y  $\rho = -0,55$ ,  $p = 0,02$ , respectivamente). Los 3 miRNAs control no presentaron diferencias significativas en ninguno de los escenarios evaluados en pacientes con cirrosis descompensada.

## **CONCLUSIONES**

La firma de miRNAs identificada permite distinguir a los pacientes con cirrosis descompensada con mayor probabilidad de presentar respuesta hemodinámica y riesgo de compromiso de la función sistólica cardíaca con tratamiento BBNS. En la cirrosis descompensada, los niveles séricos de miRNAs podrían ser una herramienta no invasiva útil para predecir respuesta a BBNS e identificar pacientes con enfermedad hepática más avanzada en los que los BBNS deberían evitarse.

## **BACKGROUND**

Refractory ascites represents a phase of severe decompensation in liver cirrhosis characterized by the presence of significant circulatory dysfunction and high mortality. Non-cardioselective  $\beta$ -blockers (NSBB) are the cornerstone treatment to prevent variceal bleeding and its recurrence. Despite having shown numerous benefits in patients with cirrhosis, NSBB could have a deleterious effect in patients with refractory ascites by compromising their cardiac compensatory mechanisms. Non-invasive staging of decompensated cirrhosis is an unmet clinical need, and there is a lack of non-invasive markers to identify those patients with decompensated cirrhosis and severe circulatory dysfunction in whom the use of NSBB could be harmful. MicroRNAs (miRNAs) are deregulated in different diseases and there is growing interest in their role as diagnostic and prognostic biomarkers.

## **AIM**

To characterize a miRNA signature and evaluate its ability to distinguish refractory ascites, predict hemodynamic response to NSBB, and identify the development of systolic cardiac dysfunction under NSBB treatment in patients with decompensated cirrhosis.

## **METHODS**

This was a collaborative translational study with human biological samples that was developed in three phases: 1) Identification of a miRNA signature based on its differential levels in the secretome of primary human hepatocytes from livers of patients with decompensated cirrhosis ( $n = 9$ ) and livers without cirrhosis ( $n = 9$ ). 2) Analysis of the signature of miRNAs and 3 control miRNAs previously discovered as biomarkers of chronic liver disease (miR-192-5p, miR-34a-5p, and miR-29a-5p) in serum of patients with decompensated cirrhosis ( $n = 36$ ) and controls matched for sex and age ( $n = 36$ ). 3) Evaluation of the ability of the miRNA signature to identify refractory ascites, predict hemodynamic response, and the appearance of cardiac dysfunction in serum samples from patients with decompensated cirrhosis ( $n = 36$ , 18 with refractory ascites). The signature of miRNAs was analyzed by RT-qPCR in serum samples at baseline and one month after starting treatment with NSBB for variceal bleeding prophylaxis. All patients underwent a hepatic venous pressure gradient (HVPG) and an echocardiogram before and one month after starting treatment with NSBB. Hemodynamic response was defined as a decrease in HVPG  $\geq 10\%$  and cardiac systolic function was evaluated using the echocardiographic parameter ejection intraventricular pressure difference.

## **RESULTS**

A signature of 5 miRNAs (miR-452-5p, miR-429, miR-885-5p, miR-181b-5p, and miR-122-5p) was characterized by its significant different levels in the secretome of cirrhotic hepatocytes. When analyzing the signature of 5 miRNAs and the 3 control miRNAs in serum samples from patients with decompensated cirrhosis and controls, cirrhotic patients had lower levels of miR-429, miR-885-5p, miR-181b-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, and miR-29a-5p ( $p < 0.05$ ). When evaluating the serum levels of the miRNA signature in patients with decompensated cirrhosis, patients with refractory ascites had higher levels of miR-181b-5p than patients with diuretic-sensitive ascites ( $p = 0.008$ ). Baseline serum levels of miR-452-5p and miR-429 were

significantly lower in patients who presented hemodynamic response to NSBB ( $p = 0.006$ ). Serum levels of miR-452-5p and miR-885-5p at baseline inversely correlated with basal systemic vascular resistance ( $\rho = -0.46$ ,  $p = 0.007$ ; and  $\rho = -0.41$ ,  $p = 0.01$ , respectively) and with the decrease in cardiac systolic function under NSBB treatment in patients with refractory ascites ( $\rho = -0.55$ ,  $p = 0.02$ ; and  $\rho = -0.55$ ,  $p = 0.02$ , respectively). The 3 control miRNAs did not show significant differences in any of the scenarios evaluated in patients with decompensated cirrhosis.

## **CONCLUSIONS**

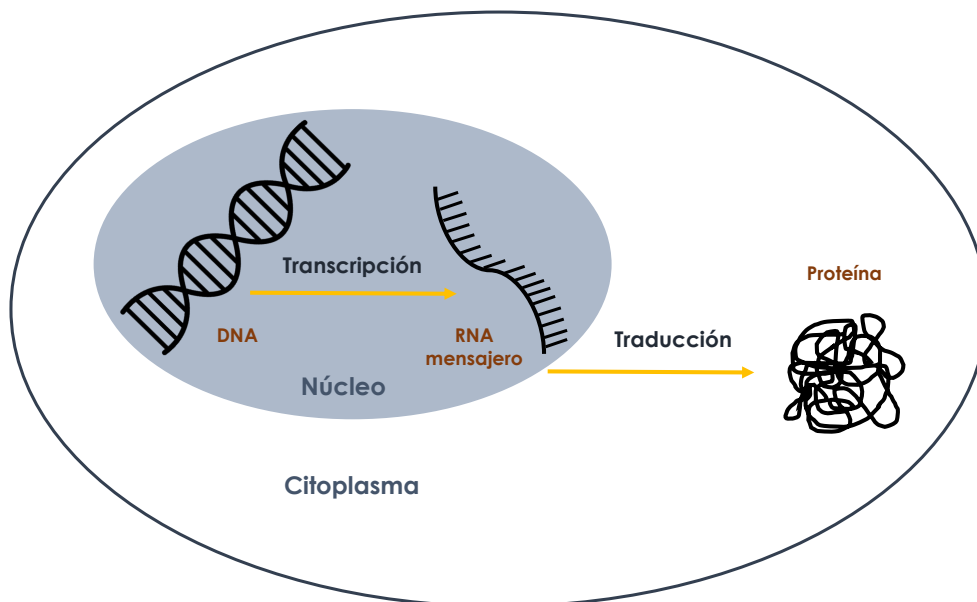
The novel miRNA signature allows to distinguish patients with decompensated cirrhosis who are more likely to have a hemodynamic response to NSBB and those patients with more severe systemic circulatory dysfunction and at risk of cardiac systolic impairment under NSBB. In decompensated cirrhosis, the serum levels of miRNAs could be a useful non-invasive tool to predict response to NSBB and identify patients with more advanced liver disease in whom NSBB should be avoided.

## IV. INTRODUCCIÓN

## 1. microRNAs

### 1.1 Generalidades

El ácido desoxirribonucleico, conocido por las siglas DNA (del inglés, *deoxyribonucleic acid*), contiene las instrucciones necesarias para el desarrollo y funcionamiento del ser humano y de la mayoría de los seres vivos. Para ello, la información contenida en el DNA y organizada en genes se transcribe a una molécula de ácido ribonucleico (RNA, del inglés *ribonucleic acid*) conocida como RNA mensajero que a su vez se traduce a una proteína. Este proceso constituye el “dogma central de la biología molecular” descrito por Francis Crick en 1957: los genes codifican proteínas (**figura 1**) (1). Sin embargo, menos del 2% del genoma humano codifica proteínas (2). Durante décadas, el genoma restante, el DNA no codificante, se consideró “DNA basura” al estimarlo carente de función. A pesar de que la mayor parte del genoma no codifica proteínas si se transcribe al llamado RNA no codificante (ncRNA). Los ncRNA son un grupo heterogéneo de moléculas en cuanto a su longitud, conformación y función celular. En la **tabla 1** se recoge la clasificación de ncRNA en función del tamaño (3). Aunque no se conoce con detalle la funcionalidad de la mayoría de los ncRNA, parecen ser clave en la regulación de múltiples procesos biológicos y representan uno de los principales mecanismos epigenéticos (cambios en la expresión génica que no implican un cambio permanente en la secuencia de DNA) (4).



**Figura 1. Dogma central de la biología molecular.** DNA: ácido desoxirribonucleico (del inglés, *deoxyribonucleic acid*); RNA: ácido ribonucleico (del inglés, *ribonucleic acid*).

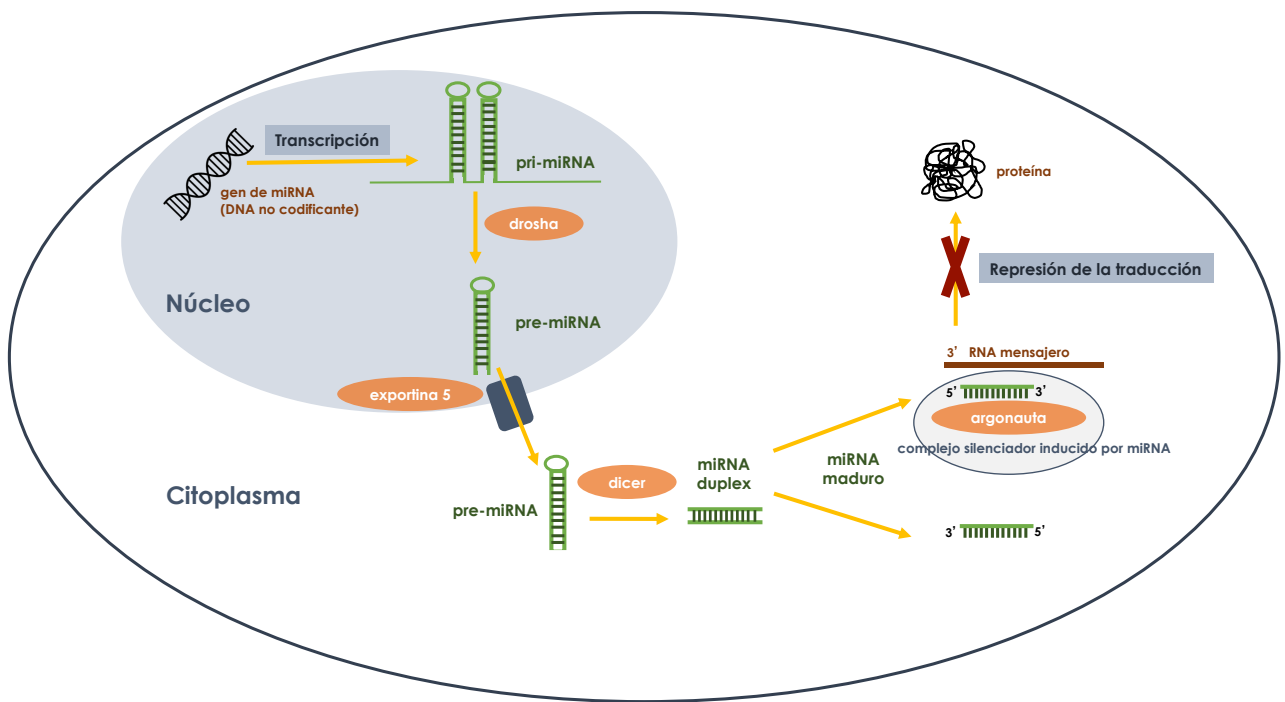
<b>ncRNA</b>	<b>ncRNA estructurales</b>	rRNA tRNA	
	<b>ncRNA reguladores</b>	<b>ncRNA largos</b> (>200 nucleótidos)	Circular Lineal
		<b>ncRNA medianos</b> (30-200 nucleótidos)	SnoRNA tiRNA SnRNA ScRNA PROMPTs
		<b>ncRNA pequeños</b> (18-30 nucleótidos)	<b>miRNA</b> PiRNA SiRNA CraSiRNA TelsRNA

**Tabla 1. Clasificación del RNA no codificante en función del tamaño.** ncRNA: RNA no codificante; rRNA: RNA ribosomal; tRNA: RNA de transferencia; SnoRNA: RNA nucleolar pequeño; tiRNA: RNA iniciador de la transcripción; SnRNA: RNA nuclear pequeño; ScRNA: RNA citoplásmico pequeño; PROMPTs: promotor de transcripción *upstream*; miRNA: microRNA; piRNA: piwi RNA; SiRNA: RNA interferente pequeño; CraSiRNA: RNA iniciador de transcripción; telsRNA: RNA pequeño de interacción asociado a repetición de centrómero.

Los microRNAs (miRNAs) constituyen la clase de ncRNA más estudiados. Son moléculas monocatenarias de pequeño tamaño (18-25 nucleótidos) implicadas en la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional (5). Su biogénesis tiene lugar preferentemente a partir de la vía canónica. De forma simplificada, su síntesis se inicia en el núcleo celular donde los genes que codifican miRNAs (generalmente partir de intrones) se transcriben de DNA a una molécula que contiene varias estructuras en horquilla llamada pri-microRNA (500-3000 nucleótidos) mayoritariamente mediante la RNA polimerasa II. El pri-microRNA posteriormente se procesa mediante la proteína drosha a una molécula más corta de una única horquilla llamada pre-microRNA (70 nucleótidos). A continuación, el pre-miRNA se exporta al citoplasma mediante exportina 5, donde la enzima dicer fragmenta el pre-miRNA cerca del bucle dando lugar a un miRNA bicatenario o dúplex. Finalmente, una de las dos cadenas de RNA monocatenario del dúplex, generalmente la 5' por ser más estable, se acopla a la proteína argonauta y se convierte en un miRNA maduro monocatenario (22 nucleótidos de media) mientras que la otra cadena, la 3', se degrada. El complejo miRNA maduro-argonauta constituye el componente clave del complejo silenciador inducido por miRNA que reconoce y se une, gracias a la hebra de miRNA maduro, al RNA mensajero diana. La unión tiene lugar a nivel de la región 3' no traducida (3' UTR, del inglés *untranslated regions*) del RNA mensajero, aunque en humanos no hay una complementariedad perfecta, provocando su desestabilización y la represión de la traducción (**figura 2**) (5, 6).



Aunque los miRNAs generalmente conducen a la represión o desintegración del RNA mensajero diana, los miRNAs también pueden estimular la expresión de genes. La biogénesis de los miRNAs se puede regular a nivel transcripcional por factores de transcripción específicos y a nivel postranscripcional por cambios en el procesamiento (7).



**Figura 2. Esquema simplificado de la biogénesis de los microRNAs.** miRNA: microRNA; DNA: ácido desoxirribonucleico (del inglés, *deoxyribonucleic acid*).

Mediante su unión a regiones complementarias de RNA mensajero, los miRNAs llevan a cabo una regulación postranscripcional de la expresión génica al interferir en el proceso de traducción, bien induciendo la degradación del RNA mensajero o inhibiendo su traducción a proteína. Es decir, los miRNAs pueden disminuir la expresión de determinadas proteínas, lo que les otorga un papel clave en la regulación de procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, el desarrollo y la apoptosis (8). Se estima que más del 60% de todos los RNA mensajeros contienen sitios de unión para miRNAs en su región 3' UTR, de forma que los miRNAs regulan de forma directa o indirecta más de la mitad de los genes de ser humano (9). Por otra parte, cada miRNA puede regular a varios cientos de RNA mensajeros diferentes y a su vez un RNA mensajero determinado puede estar modulado por varios miRNAs, dando lugar a complejas redes de regulación implicadas en procesos biológicos fundamentales (10, 11).

El primer miRNA, lin-4, se describió en el nematodo *Caenorhabditis elegans* en el año 1993 (12). Desde entonces se han identificado más de 2500 miRNAs humanos que se encuentran registrados en el repositorio público miRBASE (<http://www.mirbase.org/>) (13). Por consenso se establece que el nombre de los miRNAs se compone de un prefijo de tres letras que indica la especie de origen ("hsa" hace referencia a miRNAs humanos, *Homo sapiens*), seguido del prefijo "miR" que denota miRNA maduro y finalmente un número de identificación único. Las secuencias 5' y 3' se indican con los sufijos -5p y -3p respectivamente. De esta forma, "hsa-miR-122-5p" corresponde a la secuencia 5' del miR-122 maduro en *Homo sapiens* (14). Dado que solo nos referiremos a miRNAs humanos, de ahora en adelante se omitirá el prefijo "hsa".

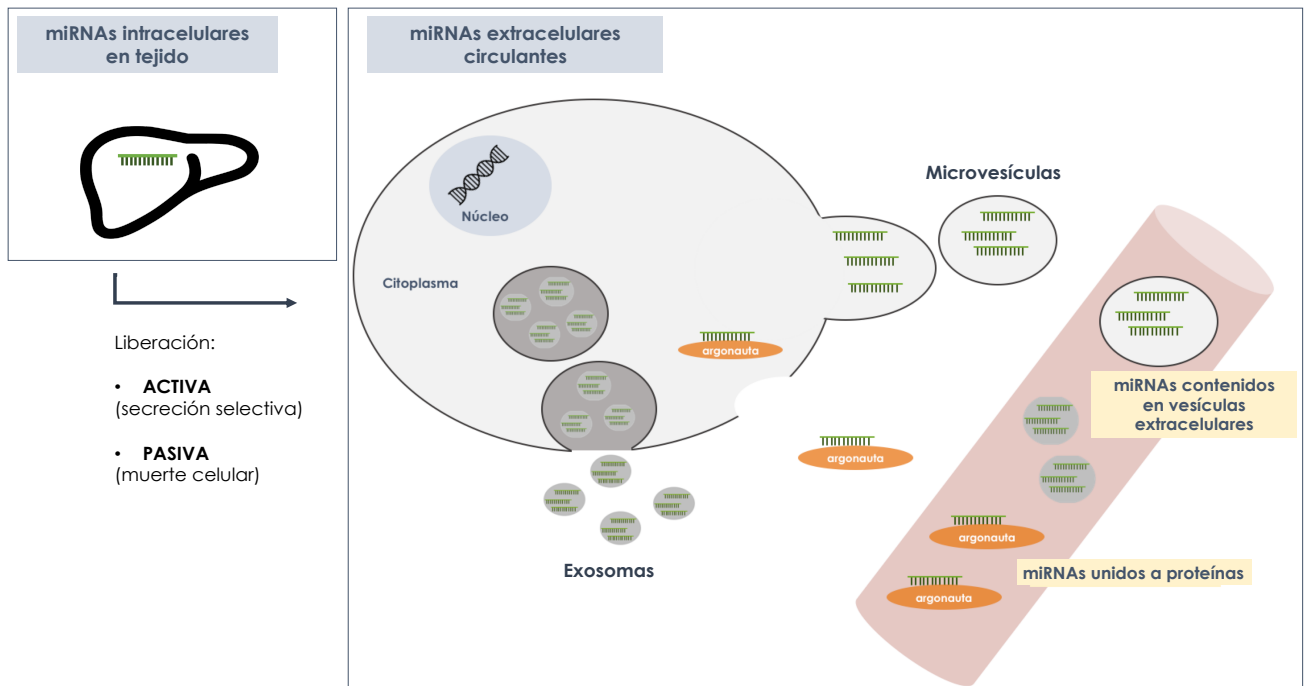
## 1.2 microRNAs como biomarcadores

Un biomarcador o marcador biológico se define como "aquella molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros líquidos o tejidos del cuerpo y es un indicador de un proceso normal o anormal, o de una afección o enfermedad. Un marcador biológico se utiliza a veces para determinar la respuesta del cuerpo a un tratamiento para una enfermedad o afección" (15). Hay distintos tipos de biomarcadores, siendo los más habituales los predictores, diagnósticos y pronósticos.

Dilucidar la función biológica individual en la que está implicado cada miRNA es complejo, aunque puede realizarse mediante modelos *in vitro* en los que se module el miRNA y modelos animales *knockout* y transgénicos. Por ejemplo, para determinar el papel biológico de miR-122, muy relevante en la fisiopatología hepática, se generaron ratones con delección de miR122 que provocó que los ratones desarrollaran esteatohepatitis y carcinoma hepatocelular (16). El hecho de que los miRNAs tengan múltiples dianas y que los RNA mensajeros sean modulados por múltiples miRNAs complica aún más la interpretación de los resultados. Diferentes miRNAs tienden a actuar de manera cooperativa para reprimir un gen específico o varios genes dentro de la misma vía (17). Independientemente de su función y, aunque la mayoría de miRNAs no son específicos, determinados miRNAs tienen un perfil de expresión predominante en ciertos órganos o tejidos. Así, miR-122-5p es el más expresado en el hígado representando más de la mitad de los miRNAs hepatocitarios (18). Es más, la expresión desregulada de distintos miRNAs se ha asociado a numerosas enfermedades, lo que ha propiciado que se explore su potencial como biomarcador diagnóstico o pronóstico (19). Por otra parte, la modulación de miRNAs podrían usarse como potenciales tratamientos (agonistas de miRNAs, que realizarían la misma función que el miRNA endógeno), tras constituirse los miRNAs como dianas terapéuticas (anti-miRNA, oligonucleótidos antisentido que se unirían a un miRNA concreto inactivándolo) (20).

En el año 2008 se describió la detección de miRNAs extracelulares (21). A nivel extracelular los miRNAs pueden circular unidos a proteínas y lipoproteínas (frecuentemente a argonauta 2 y lipoproteínas de alta densidad) o contenidos en el interior de vesículas extracelulares como microvesículas o exosomas (**figura 3**) (22-25). La distribución de los miRNAs circulantes ha sido objeto de controversia, de forma que algunos estudios han sugerido que la mayor

parte de los miRNAs en suero o plasma se concentran en vesículas extracelulares, fundamentalmente exosomas, mientras que otros grupos han sugerido que el 90% de los miRNAs circulantes estarían asociados a proteínas (26, 27). Estas observaciones contradictorias podrían deberse a diferencias técnicas en el aislamiento de vesículas extracelulares, o diferencias entre suero y plasma.



**Figura 3. Localización de los microRNAs.** miRNAs: microRNAs.

El descubrimiento de la localización de miRNAs en fluidos biológicos abrió un intenso debate acerca de su origen y funcionalidad. Por un lado, algunos autores sostienen que los miRNAs extracelulares pasarían a la circulación durante el daño celular o tisular, liberados de forma pasiva por las células como productos de deshecho tras la muerte celular, fundamentalmente en forma de cuerpos apoptóticos, por lo que carecerían de función biológica (27, 28). Por otro lado, la mayoría de autores consideran que la presencia de miRNAs extracelulares, o al menos parte, sería el resultado de un proceso activo de secreción por parte de las células bien unidos a proteínas o bien contenidos en vesículas extracelulares. Los miRNAs tendrían por tanto un papel como moléculas de señalización y participarían en la comunicación intercelular de forma que podrían modular la expresión génica de otras células de forma paracrina o endocrina, es decir tendrían el potencial de influir en células a distancia (29, 30). Los miRNAs extracelulares asociados a vesículas entrarían a las células dianas por endocitosis, fagocitosis o fusión directa con las membranas

plasmáticas, mientras que los secretados sin vesículas serían captados por receptores específicos en la superficie celular (31). Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que los miRNAs extracelulares parecen ser funcionalmente activos en las células receptoras. Además, el perfil de miRNAs contenido en vesículas extracelulares difiere de los miRNAs localizados a nivel intracelular en las células generadoras de las vesículas (32). Sin embargo, no se conocen los mecanismos exactos que conducirían a la incorporación selectiva de determinados miRNAs en las vesículas extracelulares.

Por otra parte, es importante destacar la estabilidad de los miRNAs en muestras clínicas. Los miRNAs extracelulares, tanto los contenidos en vesículas extracelulares como los unidos a proteínas, son altamente resistentes a la degradación por actividad de RNAsas endógenas. Asimismo, permanecen estables hasta cuatro días a temperatura ambiente, son resistentes a ciclos de congelación-descongelación y cambios de pH y permanecen inalterados en muestras de suero a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante años (33, 34).

La alteración en el perfil de expresión de miRNAs circulantes se ha puesto de manifiesto en diversas patologías y ha propiciado, junto con su pequeño tamaño y estabilidad, su estudio en distintos fluidos (plasma, suero, orina, ascitis, bilis, saliva, etc.). Todo ello, ha conducido a que los miRNAs detectados en suero o plasma, también llamados miRNAs circulantes, se hayan postulado como biomarcadores diagnósticos o pronósticos, así como predictores de respuesta a fármacos (35). Por tanto, los miRNAs no codifican proteínas, pero están implicados en la regulación de procesos celulares fundamentales relacionados con una amplia variedad de situaciones fisiológicas y patológicas, presentando un interesante papel como biomarcadores no invasivos.

### **1.3 microRNAs en hepatopatía**

Los miRNAs están implicados en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos en el hígado, entre los que destacan el metabolismo lipídico y glucosado, la apoptosis, necrosis y proliferación celular, la transición epitelio-mesénquima, la inflamación y la fibrosis hepática (36). Los miRNAs se expresan de forma selectiva en los distintos tipos de células del hígado, de modo que miRNAs individuales tendrían una distribución y una función reguladora diferente según el tipo de célula hepática. Por ejemplo, la expresión de miR-29 (uno de los miRNAs mejor estudiados en enfermedades hepáticas) está disminuida en las células estrelladas hepáticas y aumentada en los hepatocitos (37). miR-122 se expresa de forma selectiva en los hepatocitos constituyendo el 75% de los miRNAs a ese nivel, y desempeña funciones clave en la homeostasis hepatocitaria. Su silenciamiento se ha asociado con el incremento de la replicación viral en la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), con el desarrollo de esteatohepatitis y con la progresión de la fibrosis, así como el desarrollo de carcinoma hepatocelular e incluso su agresividad y quimio-resistencia (38, 39). Por otra parte, el consumo crónico de alcohol puede modular la expresión hepatocitaria de miR-122, y se ha objetivado una disminución de la expresión de este miRNA en el hígado de ratones con consumo de alcohol (40). Se ha objetivado la existencia de desregulación de miRNAs a nivel intrahepático en distintas enfermedades hepáticas agudas y crónicas,

fundamentalmente en hepatitis virales, esteatosis hepática metabólica (MAFLD, del inglés *metabolic associated fatty liver disease*) y el carcinoma hepatocelular, de forma que el perfil de expresión de miRNAs sería diferente en hepatopatías de distinta etiología (41).

Además, el conocimiento de la función a nivel celular de ciertos miRNAs ha propiciado su investigación en el desarrollo de nuevas terapias para enfermedades hepáticas (42). En este sentido, miR-122 contribuye a la replicación viral al unirse a la región no codificante 5' del genoma del VHC protegiéndolo de la respuesta antiviral de la célula. De esta forma, el RNA del VHC lleva a cabo un secuestro funcional de miR-122 citoplasmático desreprimiendo los objetivos normales de miR-122 y, posiblemente, favoreciendo el riesgo de carcinoma hepatocelular (43-45). El conocimiento de la relación de miR-122 con el VHC ha permitido explorar su potencial como diana terapéutica. Miravirsén, un antagomiR contra miR-122, fue el primer fármaco desarrollado basado en miRNAs. En un estudio en fase II se objetivó que su inhibición conseguía la reducción mantenida de la carga viral sin resistencia viral y con buena tolerancia en genotipo 1 (46). Sin embargo, limitaciones como su administración parenteral y la llegada de los antivirales de acción directa impidieron el desarrollo de esta línea terapéutica. Por otra parte, un estudio en fase I evaluó un análogo de miR-34 en carcinoma hepatocelular avanzado tras estudios previos con resultados favorables en modelo murino. Sin embargo, el estudio tuvo que suspenderse por el desarrollo de eventos adversos (NCT01829971). Asimismo, la inhibición farmacológica de miR-21 en ratones con esteatosis hepática usando antagomiR-21 redujo la inflamación hepática y la fibrosis hepática en un estudio reciente, sugiriendo un posible papel en MAFLD (47).

En la última década, además del estudio de miRNAs a nivel intrahepático ha surgido un creciente interés por conocer las alteraciones en miRNAs en fluidos, particularmente en plasma o suero (48-51). Los resultados de algunos de estos estudios sugieren que el perfil de miRNAs circulantes sería similar al encontrado a nivel intracelular, lo que reflejaría la liberación de miRNAs de forma pasiva en situaciones de daño hepático y permitiría una "biopsia líquida" en enfermedades hepáticas malignas y benignas. Por ejemplo, el aumento de miR-571 en hepatocitos se acompañó de niveles séricos elevados de este miRNA que se correlacionaron con el estadio de fibrosis hepática (52). Por el contrario, otros estudios han objetivado diferente expresión de miRNAs en circulación y a nivel hepático, sugiriendo una secreción selectiva de ciertos miRNAs que tendrían un papel en la comunicación intercelular dentro del hígado y a distancia. En cualquier caso, su presencia en circulación podría traducir situaciones patológicas en el hígado y servir como marcador no invasivo para diagnóstico, pronóstico y predicción de respuesta a tratamiento. En efecto, se ha evaluado la utilidad como biomarcadores de miRNAs circulantes en distintas formas de enfermedad hepática aguda o crónica, fundamentalmente en carcinoma hepatocelular, hepatitis virales y MAFLD y, en menor medida, en otras hepatopatías. La elección de los miRNAs circulantes evaluados en estos estudios se ha realizado preferentemente de dos formas: bien realizando un cribado de los miRNAs presentes en las muestras de suero o plasma mediante microarray o secuenciación masiva, seleccionando aquellos con expresión diferencial en la hepatopatía en estudio y posteriormente validándolos mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR, del inglés *quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction*), o bien

optando por la estrategia de seleccionar miRNAs candidatos en base a resultados en estudios previos y analizando su presencia en suero o plasma mediante qRT-PCR. En la **tabla 2** se recogen algunos ejemplos de estudios que han evaluado el papel de los miRNAs circulantes como biomarcadores en distintas hepatopatías.

Hepatopatía	microRNA	Mensaje
Carcinoma hepatocelular	↑ miR-122 suero ↑ miR-21 ↓ miR-16 suero miR-15b miR-130b suero ↑miR-331-3p ↓miR-23b-3p suero miR-122 miR-21 miR-192 miR-223 miR-26a miR-27a miR-801 plasma miR-29a miR-29c miR-133a miR-143 miR-145 miR-192 miR-505 suero miR-3197 suero	Diagnóstico de carcinoma hepatocelular (53, 54) y mayor supervivencia (55) Diagnóstico de carcinoma hepatocelular y correlación con el tamaño del tumor (56, 57) Diagnóstico de carcinoma hepatocelular en estadios precoces y $\alpha$ -fetoproteína normal (58-60) Mayor precisión para lesiones pequeñas que la $\alpha$ -fetoproteína (61) Identifica pacientes con VHC en riesgo de carcinoma hepatocelular tras tratamiento con antivirales de acción directa (62)
Hepatitis virales VHC	↑ miR-122 suero ↑ miR-155 ↑miR-34a suero	Diferencia controles y VHC. Correlación con ALT, AST, índice de actividad histológica y carga viral (63, 64) Correlación con la respuesta a tratamiento con antivirales de acción directa (65)
VHB	↑ miR-21 suero miR-29 miR-122 suero miR-421 miR-454-3p suero	Diferencia distintos grados de necroinflamación hepática (68) Correlación con la carga viral (69, 70) Correlación con la regresión de fibrosis en pacientes con cirrosis por VHB tratados con antivirales (71)
MAFLD	miR-122 suero miR-34a	Diferencia MAFLD de controles sanos (72). Correlación con la presencia de fibrosis avanzada en MAFLD (73) Diferencia esteatosis simple de esteatohepatitis (72)
Hepatopatías colestásicas	↓ miR-197-3p miR-505-3p suero miR-122-5p, miR-141-3 y miR-26b-5p miR-1281 y miR-126 suero	Diferencia CBP de controles sanos y otras hepatopatías (74) Diferencia CBP de controles sanos (mejor rendimiento que fosfatasa alcalina pero menor sensibilidad y especificidad que los anticuerpos antimitocondriales) (75) Diferencia CEP de controles sanos y de pacientes con colangiocarcinoma (76)
Hepatitis autoinmune	↑ miR-122 miR-21 suero	Diferencia hepatitis autoinmune de controles y se modifica tras tratamiento con corticoides (77)
Insuficiencia hepática aguda	↑ miR-122 miR-192 suero ↑ miR-122 miR-21 miR-221 suero	DILI por paracetamol (78-80). Marcador precoz de daño hepático agudo en DILI al elevarse antes que ALT y AST y predictor de supervivencia (81) Identifica necesidad de trasplante hepático en insuficiencia hepática aguda de distintas etiologías (82)
Hepatitis alcohólica	miR-182 suero	Correlación con la gravedad de la hepatitis alcohólica (83)

**Tabla 2. microRNAs circulantes como biomarcadores en enfermedad hepática.** VHC: virus de la hepatitis C; VHB: virus de la hepatitis B; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; MAFLD: esteatosis hepática metabólica (del inglés, *metabolic associated fatty liver disease*); CBP: colangitis biliar primaria; CEP: colangitis esclerosante primaria; DILI: daño hepático inducido por fármacos (del inglés, *drug-induced liver injury*).

La progresión de la fibrosis hepática conduce a la cirrosis que representa el punto de encuentro común a las distintas enfermedades hepáticas crónicas. En un intento de buscar alternativas no invasivas a la biopsia hepática, los miRNAs circulantes se han evaluado como marcadores para establecer el grado de fibrosis hepática en hepatopatías de distinta etiología, fundamentalmente viral y MAFLD (67, 84). Se han encontrado en circulación niveles de miRNAs tanto aumentados (miR-122, miR-34a y miR-571) como disminuidos (miR-652 y miR-181b) en relación con el grado de fibrosis (85). En una cohorte de pacientes con VHC, los niveles séricos de miR-122 presentaron correlación negativa con el grado de fibrosis hepática, a mayor fibrosis hepática menores niveles séricos, probablemente en relación a la pérdida de hepatocitos (principal fuente de miR-122) en la lesión hepática crónica avanzada (86). Un estudio evaluó los niveles séricos de miR-138, miR-140, miR-143, miR-325, miR-328 y miR-349 (miRNAs implicados en la activación de células estrelladas hepáticas) en el suero de 66 sujetos con fibrosis hepática en etapa temprana, 65 con fibrosis en etapa tardía y 40 sin hepatopatía, objetivando niveles elevados en pacientes con fibrosis comparado con los controles sanos. miR-138 presentó una sensibilidad de 89% y 89% y una especificidad de 71% y 93% para la predicción de fibrosis no significativa y fibrosis significativa respectivamente, sugiriendo que los miRNAs circulantes podrían ser útiles para detectar incluso estadios iniciales de la fibrosis hepática (87). Un panel de 5 miRNAs circulantes desregulados en hepatopatías crónicas de distinta etiología mostró mejor valor predictivo para identificar fibrosis significativa comparado con los índices no invasivos actuales para identificar fibrosis (FIB-4, ratio alanina aminotransferasa (ALT)/aspartato aminotransferasa (AST), APRI) (88).

Sin embargo, el estudio de miRNAs en cirrosis hepática establecida como marcadores pronósticos de las distintas complicaciones de la cirrosis ha sido mucho menor. En un estudio se evaluaron los niveles de miR-181a y miR-181b en suero de 22 pacientes con cirrosis hepática encontrando que miR-181b presentaba niveles séricos significativamente superiores en pacientes con cirrosis comparado con controles. Los autores demostraron *in vitro* que el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) inducía la expresión de miR-181b en células estrelladas hepáticas, importantes mediadoras de la fibrosis hepática, promoviendo su proliferación (89). La combinación de niveles plasmáticos de miR-106b y miR-181b permitió diferenciar a pacientes con cirrosis por virus de la hepatitis B (VHB) de controles sanos, sin diferencias en los niveles de estos dos miRNAs al comparar pacientes con cirrosis por VHB con pacientes con cirrosis de otras causas, sugiriendo que la variación en los niveles plasmáticos de estos miRNAs son independientes de la etiología (90). En pacientes con cirrosis secundaria a VHB, los niveles circulantes de miR-26a y miR-21 se han relacionado con el grado de descompensación hepática, de forma que niveles disminuidos permitieron discriminar a pacientes con estadio Child-Pugh C (91). De forma similar, miR-513-3p y miR-571 presentaron niveles séricos superiores y miR-652 niveles inferiores en 67 pacientes con cirrosis comparado con controles. Además, miR-571 se asoció con el estadio de la enfermedad según la clasificación de Child-Pugh de forma que pacientes Child-Pugh C presentaron niveles superiores en comparación con pacientes Child-Pugh A (52). Se ha evaluado el papel de miR-122 sérico en pacientes con cirrosis hepática en una cohorte de prueba y otra cohorte de validación objetivando niveles de miR-122 más bajos en pacientes con cirrosis descompensada comparado con pacientes con cirrosis compensada.

Asimismo, niveles más bajos de miR-122 se asociaron con una menor supervivencia independientemente de la puntuación de la escala MELD (del inglés, *model for end-stage liver disease*) y la edad (92). En otro estudio, los niveles séricos de miR-21 en pacientes con cirrosis descompensada se asociaron a la supervivencia libre de trasplante (93). Se ha evaluado también el posible papel de miRNAs en la ascitis de pacientes con cirrosis descompensada, objetivando niveles más elevados de miR-155, un miRNA implicado en la regulación de células inmunes e inflamación, en pacientes con peritonitis bacteriana espontánea (PBE) (94). Asimismo, los niveles circulantes de miR-34a se evaluaron en pacientes sometidos a colocación de derivación portal percutánea intrahepática (DPPI) como prevención de sangrado o por ascitis refractaria, sin demostrar mejor capacidad pronóstica para predecir supervivencia que la escala MELD (95).

Los miRNAs circulantes se han estudiado también en fallo hepático agudo sobre crónico (ACLF, del inglés *acute on chronic liver failure*). En pacientes con VHB y ACLF los niveles séricos de miR-223, miR-19b, miR-210 y miR-130a parece estar aumentada y en concreto miR-130a parece relacionarse con el pronóstico (96, 97). miR-223-3p y miR-25-3p se asociaron con ACLF y con menor supervivencia a 30 días en otro estudio reciente (98).

En resumen, numerosos estudios han observado niveles aumentados de miR-122 circulantes en enfermedades hepáticas de diferentes causas. Esto que sugiere que miR-122 en suero, más que relacionarse con una etiología específica, sería un marcador de daño hepático. De hecho, algunos estudios sugieren una mejor sensibilidad de miR-122 como marcador de daño hepático comparado con ALT (36). Otros miRNAs circulantes como miR-34a, miR-192 y miR-29 presentan alteración en diversas hepatopatías sin poder correlacionarlos con una enfermedad específica o a una etapa de la enfermedad. A pesar de su potencial como biomarcadores, existe importante variabilidad entre los distintos estudios en los patrones de miRNAs circulantes en pacientes con enfermedades hepáticas. Ello puede deberse a la probable limitación en términos de especificidad de los miRNAs por su ubicuidad e implicación mediante redes de regulación en la expresión génica en múltiples procesos celulares. Asimismo, si bien algunos estudios sugieren que existe una adecuada correlación entre los niveles de miRNAs en suero y plasma, otros estudios han observado diferencias, y por ello es importante tener en cuenta el tipo de muestra a la hora de comparar resultados de distintos estudios (99). Por otra parte, la estandarización en la recogida de muestras, la técnica de determinación de miRNAs, y la normalización para el análisis de datos es fundamental para validar el potencial de los miRNAs como biomarcadores diagnósticos y pronósticos en enfermedades hepáticas.

Se han detallado solo algunos de los estudios más relevantes del papel de miRNAs circulantes en hepatopatía, pero es importante destacar que su papel se ha explorado en otras situaciones de daño hepático, por ejemplo, como marcadores de rechazo agudo tras el trasplante hepático o como marcadores de recuperación de lesión hepática para optimizar la selección de pacientes para trasplante (100, 101). A pesar del extenso estudio de miRNAs circulantes en distintas formas de daño hepático, incluyendo la progresión de la fibrosis y cirrosis compensada, su potencial diagnóstico y pronóstico en el contexto particular de la cirrosis descompensada a penas se ha explorado. Del mismo modo, se ha



evaluado el papel de miRNAs circulantes para identificar respuesta terapéutica a distintos fármacos antivirales o corticoides, pero no disponemos de estudios que evalúen la respuesta al tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos (BBNS), que constituyen el pilar del tratamiento para prevenir la hemorragia variceal.

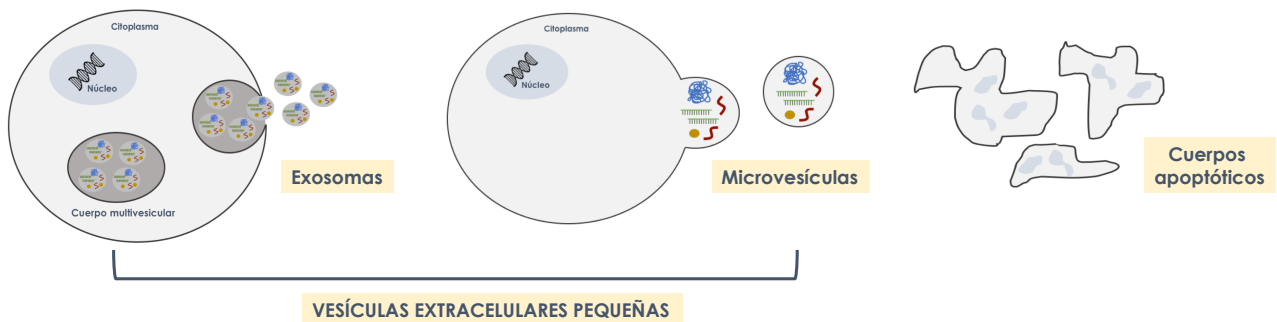
## 2. Vesículas extracelulares

### 2.1 Generalidades

Las vesículas extracelulares son estructuras de doble membrana de tamaño variable. Desde su descubrimiento en 1983 han recibido diferentes nombres y en la actualidad se clasifican en tres categorías en función del tamaño: exosomas (30-200 nm), microvesículas (anteriormente conocidas como micropartículas o ectosomas, 100-1000 nm) y cuerpos apoptóticos (1-4  $\mu\text{m}$ ) (102, 103). Los cuerpos apoptóticos son pequeñas partículas membranosas liberadas durante la muerte celular programada, mientras que las microvesículas y los exosomas son secretados de forma activa por la célula. Se diferencian de acuerdo a la forma en la que se produce la secreción vesicular desde la célula: las microvesículas se desprenden directamente por gemación de la membrana celular y los exosomas se originan a partir de estructuras llamadas cuerpos multivesiculares que se fusionan con la membrana plasmática y liberan por exocitosis sus vesículas intraluminales al espacio extracelular donde pasan a denominarse exosomas (104). Para su aislamiento se emplea generalmente la ultracentrifugación diferencial, que permite separarlas en base a sus propiedades biofísicas de otros factores solubles presentes en el sobrenadante del cultivo celular o en circulación. Otros métodos para la purificación de vesículas extracelulares incluyen la cromatografía para diferenciación por tamaño, la separación por gradiente de densidad y las técnicas de inmunofinidad (105). Para su caracterización se pueden emplear, entre otras técnicas, la microscopía electrónica y la citometría de flujo (106, 107). Sin embargo, la complejidad técnica para separar las microvesículas y los exosomas por la superposición de tamaño, densidad y composición, junto con la ausencia de consenso inicial en cuanto a la terminología, ha provocado que en la literatura a menudo estas dos subclases de vesículas extracelulares se engloben indistintamente bajo el término "microvesículas" (108). Si bien es importante diferenciar estas dos poblaciones de vesículas, sigue siendo técnicamente difícil aislarlas de forma precisa y por ello la mayoría de las preparaciones contienen tanto exosomas como microvesículas. Por tanto, y para evitar confusión, actualmente se recomienda el uso del término "vesículas extracelulares pequeñas" que englobaría vesículas <100-200 nm (108, 109).

Las vesículas extracelulares contienen diferentes tipos de moléculas, fundamentalmente lípidos, proteínas y distintas clases de RNA incluyendo miRNAs. Constituyen sofisticados sistemas de comunicación intercelular al transportar esta información biológica de una célula a otra, no solo de forma paracrina sino también a células diana distantes (110). En concreto, la presencia de miRNAs vesiculares ha generado gran interés por sus funciones reguladoras de la expresión génica. Las vesículas no incluyen un solo tipo de miRNAs sino que transportan simultáneamente distintos miRNAs que difieren en función de la célula de origen y se modifican de forma dinámica en respuesta a diferentes estímulos fisiopatológicos (111). Se ha observado diferente expresión de miRNAs a nivel celular y en el interior de las vesículas derivadas de las mismas células, lo que apoya que los miRNAs no se incorporan al azar a las vesículas y apunta a una exportación selectiva de miRNAs específicos (23, 32). Las secuencias específicas presentes en ciertos miRNAs podrían guiar su incorporación a las vesículas, mientras que ciertas enzimas u otras proteínas también

podrían contribuir a clasificar que miRNAs se incorporan a las vesículas (110). Por otra parte, la presencia en la membrana de las vesículas de determinadas proteínas de superficie asociadas a la célula de la que proceden permite determinar su origen (24, 110, 112).



**Figura 4. Tipos de vesículas extracelulares.**

Por tanto, mediante la liberación de vesículas al espacio extracelular las células podrían modular la expresión génica de otras células vecinas o distantes al transferirles los miRNAs contenidos en su interior y activar distintas vías de señalización (111). Sin embargo, es difícil conocer con precisión sus funciones en las células diana dado que las vesículas contienen gran cantidad de miRNAs diferentes que pueden regular distintas vías de señalización y generar efectos diferentes en las células receptoras. Aunque no se conocen en profundidad los mecanismos de interacción entre las vesículas y las células receptoras, la presencia de proteínas en la superficie de las vesículas extracelulares les permitiría interactuar con receptores de la célula diana de forma ligando-receptor y entrar en ellas a través de endocitosis (113). Otra posibilidad sería la fusión de la membrana de las vesículas con la membrana plasmática de las células receptoras y posterior liberación del contenido vesicular al citoplasma (105). Para estudiar cuál es la célula diana receptora de las vesículas se han desarrollado distintas estrategias que se basan principalmente en el marcaje de las vesículas extracelulares con indicadores fluorescentes que permitirían su seguimiento (114).

Estas vesículas se liberan desde prácticamente todos los tipos celulares tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, entre las que destacan la respuesta inmune, la inflamación, la angiogénesis o la progresión tumoral (114). A modo de ejemplo, las vesículas liberadas por células tumorales de cáncer de mama contienen pre-miRNA y las proteínas necesarias para su maduración de forma independiente de la célula que pueden inducir la proliferación celular en cultivo y podrían desempeñar funciones prometastásicas *in vivo* (115, 116).

En definitiva, en la actualidad el conocimiento sobre la compleja biogénesis de las vesículas extracelulares y los mecanismos que impulsan y regulan la incorporación de determinadas biomoléculas en su interior es limitado. Tampoco se conoce en detalle cuál es la célula diana ni la función que desempeña el contenido de las vesículas en ellas. Sin embargo, el creciente interés por estas estructuras conducirá con seguridad a un mayor entendimiento de su biología en los años venideros.

## **2.2 Vesículas extracelulares como biomarcadores**

El estudio de las vesículas extracelulares se ha incrementado de forma exponencial en los últimos años tras el descubrimiento de la presencia de miRNAs en su interior y la posibilidad de purificarlas no solo a nivel tisular en el sobrenadante de cultivos celulares sino también en distintos fluidos corporales, fundamentalmente en suero o plasma (111, 117). El hecho de que las concentraciones y la composición de las vesículas extracelulares circulantes varíen con la presencia de enfermedad y presenten cierta especificidad por el proceso patológico en curso, ha propiciado el interés tanto por las vesículas extracelulares como por los miRNAs vesiculares como potenciales biomarcadores (36).

Sin embargo, el estudio de vesículas extracelulares y su contenido como biomarcadores presenta ciertas limitaciones. Entre ellas destaca que existen distintas técnicas para aislar las vesículas y en función del método empleado para purificarlas puede modificarse el contenido de miRNAs vesiculares (118). Esta dificultad para aislar vesículas de forma homogénea y eficiente, asociada a que los miRNAs detectados en muestras convencionales de suero o plasma parecen estar localizados mayoritariamente en vesículas, abre la puerta a estudiar directamente miRNAs circulantes sin aislar previamente las vesículas (119, 120). De esta forma, varios estudios han demostrado que el análisis de miRNAs en las vesículas extracelulares circulantes no sería superior al análisis directo de miRNAs en circulación (121). Ello se ve favorecido por su estabilidad, ya que se ha observado que los miRNAs vesiculares permanecerían inalterados en muestras congeladas durante largos periodos de tiempo (122). Por otra parte, la concentración de vesículas extracelulares puede verse influida por factores como el sexo o la edad, por lo que es importante emplear controles apareados para gestionar esta variabilidad, así como homogenizar en la medida de lo posible el procesamiento de las muestras (123). En este sentido, para la recogida de muestras se recomienda el uso de tubos con citrato para el estudio de vesículas circulantes y su contenido (119).

## **2.3 Vesículas extracelulares en hepatopatía**

En el hígado, los hepatocitos y las células no parenquimatosas liberan vesículas extracelulares que actúan como mediadoras en respuestas patológicas y contribuyen a la progresión de las enfermedades hepáticas. Su producción puede cambiar cuantitativa y cualitativamente en respuesta a la estimulación celular y en diferentes situaciones de enfermedad (124). En este sentido, los hepatocitos pueden inducir la activación de las

células estrelladas hepáticas o de las células de Kupffer y actuar sobre otros hepatocitos para inducir proliferación celular o transmitir partículas virales (107).

Varias causas de enfermedad hepática como la infección por VHC o VHB, el consumo de alcohol y los predisponentes del síndrome metabólico (diabetes, obesidad, dislipidemia), así como situaciones de inflamación sistémica y translocación bacteriana, desencadenan la liberación de vesículas extracelulares (24). Por ello, en el seno de hepatopatías generalmente se observa en suero o plasma un aumento de vesículas extracelulares en términos cuantitativos comparado con sujetos sin daño hepático. El tipo y el grado de lesión hepática determinarían el contenido vesicular y, por tanto, el patrón de miRNAs vesiculares diferiría en las distintas enfermedades hepáticas agudas y crónicas, enfatizando su potencial como biomarcadores (125, 126). Por tanto, ante situaciones de daño hepático, las células hepáticas liberarían miRNAs tanto unidos a proteínas como contenidos en vesículas. Se ha observado que determinados miRNAs estarían mayoritariamente presentes en uno u otro compartimento extracelular, es decir, unidos a proteínas o contenidos en el interior de vesículas. Es más, parece que la distribución podría modificarse en distintas situaciones patológicas de forma que, por ejemplo, en la hepatitis alcohólica se han objetivado niveles de miR-122 y miR-155 circulantes, preferentemente en la fracción asociada a vesículas mientras que estos mismos miRNAs estarían predominantemente aumentados en la fracción asociada a proteínas en el daño hepático inducido por fármacos (DILI, del inglés *drug-induced liver injury*), lo que podría representar un mecanismo de adaptación celular (40). En la **tabla 3** se recogen las principales situaciones de enfermedad hepática en las que se ha explorado el potencial de las vesículas extracelulares pequeñas y los miRNAs vesiculares circulantes como biomarcadores para diagnóstico, predicción de progresión de enfermedad y complicaciones, así como de respuesta terapéutica.

Hepatopatía	microRNA vesicular	Mensaje
Carcinoma hepatocelular	Las vesículas extracelulares totales, así como algunas subpoblaciones, aumentan en suero de los pacientes con carcinoma hepatocelular y sus concentraciones se normalizan tras el tratamiento, lo que sugiere una relación directa con la presencia de tumor (127)	
	↑ miR-21	Diferencia pacientes con carcinoma hepatocelular de pacientes con hepatopatía sin tumor y controles sanos. Relación con progresión de enfermedad y supervivencia (128)
	↑ miR-15b miR-130b	Identifican la presencia de carcinoma hepatocelular en pacientes con VHB (129). Estos miRNAs se habían descrito previamente estudiando microRNAs circulantes, lo que sugiere que el análisis directo de miRNAs circulantes podría ser equivalente (58)
	↑ miR-18a miR-221 miR-222 miR-224 ↓ miR-101 miR-106b miR-122 miR-195	Identifica carcinoma hepatocelular en pacientes con hepatopatía (130)
	miR-718	Correlación con la agresividad del tumor (131)
	miR-4718 miR-642a-5p miR-6826-3p miR-762	Identifican aparición o recurrencia de carcinoma hepatocelular en pacientes con VHC y respuesta viral sostenida inducida por antivirales de acción directa (132)
Hepatitis virales	↑ miR-122	Diferencia VHC de controles sanos. Correlación con la respuesta viral sostenida (133)
MAFLD	Panel de 12 miRNAs	Diferencia pacientes con MAFLD de pacientes con hepatopatía viral y controles sanos (134)
	miR-122 y miR-192	Correlación con el grado de fibrosis en pacientes con MAFLD (73, 135)
Insuficiencia hepática aguda		Correlación con el grado de encefalopatía hepática, supervivencia y la necesidad de trasplante (136)
Hepatitis alcohólica	miR-192, miR-122 miR-30a	Diagnóstico de hepatitis alcohólica (137, 138)

**Tabla 3. Vesículas extracelulares como biomarcadores en enfermedad hepática.** VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; MAFLD: esteatosis hepática metabólica (del inglés, *metabolic associated fatty liver disease*).

Se ha estudiado el papel de las vesículas extracelulares en distintas etapas de la progresión de la enfermedad hepática, incluyendo la fibrogénesis y el remodelado vascular (139, 140). A nivel intrahepático, vesículas extracelulares liberadas por hepatocitos inducen cambios en la expresión génica de las células endoteliales sinusoidales *in vitro*, lo que presumiblemente contribuye a su activación y al remodelado sinusoidal (141). Los miofibroblastos portales también liberan vesículas que estimulan la angiogénesis, tanto *in vitro* como en ratones, promoviendo la vasoconstricción a nivel intrahepático (142). A nivel circulante, diferentes subpoblaciones de vesículas extracelulares derivadas de hepatocitos, leucocitos y células endoteliales están aumentadas en pacientes con cirrosis como resultado de la inflamación sistémica, el daño necroinflamatorio y la disminución del aclaramiento (24). A nivel periférico, las vesículas extracelulares podrían modular la permeabilidad y el tono vascular, así como la angiogénesis. En concreto, se ha observado su relación con el estadio de la enfermedad según las escalas Child-Pugh y MELD y su correlación con el gradiente de presión venosa hepática (GPVH). Además, podrían predecir la progresión de la enfermedad y la mortalidad a seis meses (143). En pacientes

con cirrosis avanzada, algunas subpoblaciones de vesículas extracelulares se han relacionado con la respuesta vasoconstrictora, en concreto con la disminución de la presión arterial, por lo que contribuirían a la vasodilatación periférica presente en estos enfermos (112). Se han estudiado también los niveles de vesículas extracelulares en ascitis de pacientes con cirrosis descompensada objetivando una adecuada correlación con los niveles séricos, con la función hepática y con la mortalidad a 30 días independientemente del MELD y de la antibioterapia (144).

En definitiva, aunque aún queda camino por recorrer, las vesículas extracelulares circulantes y particularmente los miRNAs vesiculares presentan un prometedor papel como biomarcadores en enfermedades hepáticas y podrían convertirse en un futuro no tan lejano en herramientas útiles para estrategias de seguimiento individualizadas en la era de la medicina personalizada.

### 3. Cirrosis descompensada

#### 3.1 Historia natural de la cirrosis descompensada

La cirrosis hepática es un proceso caracterizado por la sustitución progresiva de la arquitectura hepática por fibrosis y nódulos de regeneración, representa la etapa final común a toda enfermedad hepática crónica y conduce a más de un millón de muertes anuales en todo el mundo (145). En nuestro medio, las principales causas de cirrosis son el consumo crónico de alcohol, las hepatitis virales y MAFLD (146). La cirrosis hepática es una enfermedad dinámica y progresiva que evoluciona en dos etapas consecutivas, la compensada y la descompensada, que presentan unas características clínicas y un pronóstico significativamente diferente. La transición de la fase compensada, silente y asintomática, a la fase descompensada ocurre en un 5-7% de los pacientes cada año y está marcada por la aparición de la primera descompensación de la enfermedad, generalmente en forma de ascitis, hemorragia, encefalopatía hepática o ictericia (147).

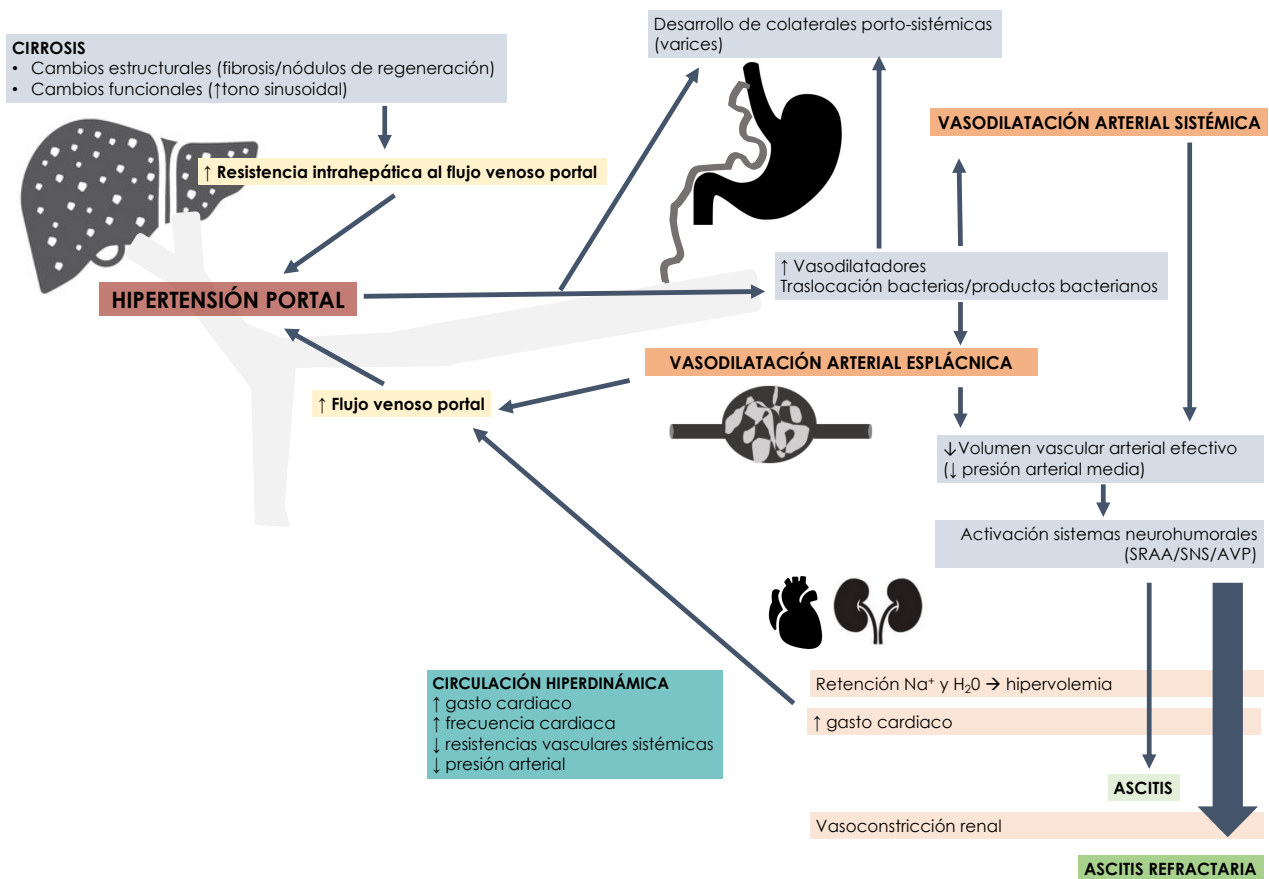
Los cambios estructurales en la arquitectura hepática, junto con un componente dinámico que provoca un aumento reversible del tono sinusoidal, conducen a un incremento de la resistencia vascular intrahepática. Ello condiciona un aumento de la resistencia hepática al flujo venoso portal que supone el desencadenante inicial del síndrome de **hipertensión portal** (148). El aumento de la presión portal, definido por la existencia de un gradiente hemodinámico entre la vena porta y la vena suprahepática (denominado gradiente de presión venosa hepática, GPVH) superior o igual a 6 mmHg es responsable del desarrollo de la mayoría de las complicaciones de la cirrosis, y el riesgo de descompensación se hace patente cuando el GPVH sobrepasa el umbral de los 10 mmHg, que se conoce como hipertensión portal clínicamente significativa (149). Es más, la evolución del grado de hipertensión portal condiciona la gravedad de sus manifestaciones clínicas de modo que, a mayor GPVH, mayor riesgo de complicaciones y mortalidad (150).

La progresión de la hipertensión portal induce un aumento de la síntesis local de sustancias vasodilatadoras a nivel esplácnico (fundamentalmente óxido nítrico) que, junto con la inflamación sistémica favorecida por la translocación de bacterias y productos bacterianos, conduce a una **vasodilatación arterial en el territorio esplácnico** que genera un aumento del flujo venoso portal que agrava y perpetúa la hipertensión portal. Asimismo, se produce la apertura de colaterales porto-sistémicas mediante la reperfusión y dilatación de vasos preexistentes, así como mediante la generación de nuevos vasos. De hecho, la angiogénesis es un fenómeno clave en la progresión de la enfermedad hepática crónica y la hipertensión portal al contribuir tanto al aumento de la resistencia vascular hepática como a la formación de colaterales portal-sistémicas y al aumento del flujo sanguíneo esplácnico (151). En las etapas iniciales de la cirrosis, las resistencias vasculares periféricas en otros territorios son normales, pero con la progresión de la enfermedad se produce también una **vasodilatación arterial sistémica** que conduce a una **disminución del volumen arterial efectivo** e hipotensión arterial (152). Ello desencadena la activación de mecanismos compensadores mediados por el sistema renina-angiotensina-aldosterona, el sistema nervioso simpático y el sistema arginina-vasopresina para mantener la perfusión periférica



induciendo un aumento del gasto y la frecuencia cardíaca que consigue inicialmente cierto grado de compensación. Sin embargo, a pesar de la intensa activación de los sistemas vasoconstrictores endógenos, los pacientes desarrollan hipotensión arterial. Todo ello conduce al desarrollo progresivo de la llamada **circulación hiperdinámica** que ocurre preferentemente en presencia de hipertensión portal clínicamente significativa y se caracteriza por un aumento de la frecuencia y del gasto cardíaco y una disminución de las resistencias vasculares sistémicas y de la presión arterial, y que conduce al mantenimiento y agravamiento de la hipertensión portal (153, 154)

Conforme avanza la enfermedad y progresa la vasodilatación arterial sistémica estos mecanismos se hacen insuficientes y se desencadena un aumento intenso y mantenido de la actividad de los mecanismos vasoconstrictores neurohumorales que conduce a un aumento de la reabsorción renal de sodio y agua. Esto incrementa el relleno vascular y aumenta el flujo esplácnico, con la consiguiente exacerbación de la presión portal y la formación de ascitis (155, 156). Por otra parte, se produce una vasoconstricción renal que, junto con la alteración de los mecanismos de autorregulación del flujo renal, conduce a una hipoperfusión renal (157). La combinación de los factores locales y sistémicos favorecen la salida de líquido al intersticio y a la cavidad peritoneal, perpetuándose así la formación de ascitis (158).



**Figura 5. Fisiopatología de la cirrosis descompensada.** SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona; SNS: sistema nervioso simpático; AVP: sistema arginina-vasopresina. Na<sup>+</sup>: sodio; H<sub>2</sub>O: agua.

En resumen, la cirrosis hepática comienza en el hígado y a través del desarrollo progresivo de hipertensión portal y cambios hemodinámicos extrahepáticos se convierte en una enfermedad sistémica en la que destaca una marcada implicación del sistema cardiovascular y renal.

### 3.2 Ascitis refractaria

El desarrollo de ascitis representa la forma más frecuente de descompensación de la cirrosis hepática, de modo que un 70% de los pacientes con cirrosis desarrolla ascitis a los diez años del diagnóstico (147, 159). Dentro de la etapa de cirrosis descompensada, la llamada ascitis refractaria representa una fase de descompensación grave que se desarrolla en aproximadamente el 10% de los pacientes con ascitis (150, 160). El término ascitis refractaria se define como aquella ascitis que no se puede movilizar o que reaparece precozmente tras evacuarla (menos de cuatro semanas) a pesar de tratamiento médico adecuado

(dieta pobre en sal y diuréticos). Se diferencian dos formas: 1) ascitis resistente a tratamiento con diuréticos, aquella que no responde a dosis máximas de diuréticos y restricción de sodio, y 2) ascitis intratable por aparición de efectos adversos que limitan el empleo de una dosis eficaz de diuréticos (161).

La ascitis refractaria representa una forma avanzada de la cirrosis hepática en la que la hipertensión portal evolucionada y la circulación hiperdinámica en su máxima expresión conducen a una **disfunción cardiocirculatoria grave**. Ésta se caracteriza por la presencia de intensa vasodilatación arterial periférica que se traduce en resistencias vasculares sistémicas marcadamente disminuidas e hipotensión arterial, con hiperestimulación simpática y una disminución de la reserva cardiaca (158). Asimismo, los pacientes con ascitis refractaria presentan hipoperfusión renal con marcada retención de sodio y alteración de los mecanismos de autorregulación renal, por lo que con frecuencia asocian hiponatremia y disfunción renal progresiva (162).

El desarrollo de ascitis refractaria se asocia con una pobre calidad de vida, un mayor riesgo de infecciones e insuficiencia renal y un peor estado nutricional, así como con una supervivencia al año del 30% que contrasta con una supervivencia cercana al 50% a 5 años en pacientes con ascitis controlada con diuréticos (160, 163-165). Por ello, todo paciente con ascitis refractaria debe ser valorado como candidato a trasplante hepático. Es importante destacar que las escalas clínicas clásicas de cirrosis (MELD, Child-Pugh) no reflejan adecuadamente la gravedad de los pacientes con ascitis refractaria y subestiman su riesgo de mortalidad (161).

A pesar de que la ascitis refractaria representa una fase de la cirrosis con una situación hemodinámica característica, el diagnóstico de esta entidad sigue siendo clínico en base a la respuesta al tratamiento diurético. No disponemos hoy en día de marcadores no invasivos que reflejen la situación fisiopatológica de los pacientes con ascitis refractaria.

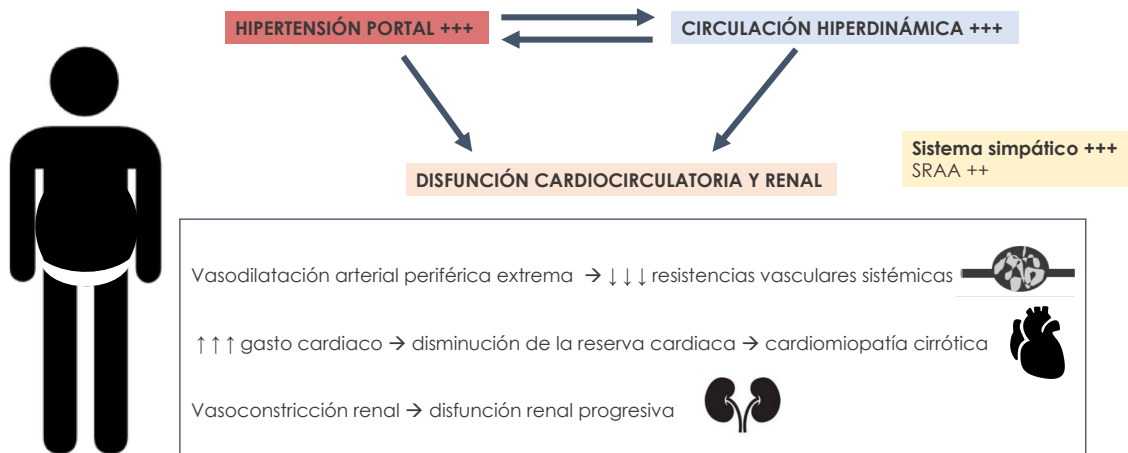
### **3.3 Disfunción cardiaca en la cirrosis**

La progresión de la hipertensión portal y la vasodilatación arterial condicionan que el sistema cardiovascular pase a un primer plano en la fisiopatología de la cirrosis descompensada mediante el desarrollo de la circulación hiperdinámica y los cambios asociados en la función cardiovascular. El concepto de disfunción cardíaca en la cirrosis ha dado lugar a la entidad clínica conocida como cardiomiopatía cirrótica, que hace referencia a la disfunción cardíaca crónica que se desarrolla en el seno de la cirrosis establecida en ausencia de otras causas de cardiopatía (161). La inflamación sistémica y la hipertensión portal juegan un papel clave en la patogenia de la disfunción miocárdica, aunque los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la cardiomiopatía no se conocen en detalle (166, 167). La cardiomiopatía cirrótica combina la presencia de disfunción sistólica y diastólica, junto con alteraciones electrofisiológicas como la prolongación del intervalo QTc, y puede condicionar el pronóstico de los pacientes fundamentalmente

durante procedimientos invasivos como la cirugía, la inserción de DPPI o el trasplante hepático (166).

La alteración de la función sistólica en el contexto de la cirrosis avanzada se caracteriza por una reducción de la respuesta contráctil ante estímulos vasoconstrictores fisiopatológicos y farmacológicos, que se traduce en una disminución de la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI). En la mayoría de los pacientes con cirrosis, la función sistólica en reposo es normal o en el caso de cirrosis evolucionada está aumentada por la circulación hiperdinámica que induce un aumento del gasto cardíaco para responder a las necesidades de la circulación sistémica. En pacientes con ascitis refractaria la perfusión renal depende mayormente de la función sistólica y la activación simpática desencadenadas como respuesta adaptativa frente a la vasodilatación sistémica extrema. En ellos, la circulación se vuelve cada vez más hiperdinámica hasta cierto límite en el que el gasto cardíaco no puede aumentar más y la presión arterial continúa disminuyendo a pesar de la continua retención renal de sodio y agua. En estos pacientes, ante situaciones de estrés físico o farmacológico se pone de manifiesto la alteración de la capacidad de respuesta contráctil latente. Es decir, en estos pacientes, la función sistólica está basalmente tan aumentada que es incapaz de incrementarse para compensar situaciones de estrés y mantener la perfusión renal (162).

Dado que la disfunción sistólica es silente en reposo y está enmascarada por la circulación hiperdinámica que reduce la postcarga y aumenta la FEVI, es necesario inducir estrés circulatorio farmacológicamente o mediante el ejercicio para hacerla clínicamente patente. El gold estándar para ello es el cateterismo cardíaco mediante curvas de presión-volumen. Sin embargo, dada su invasividad, habitualmente se emplea la ecocardiografía Doppler. Los métodos convencionales incluyen la medida de la FEVI y el índice cardíaco. La limitación principal de estos métodos para estimar la función sistólica en pacientes con cirrosis es que son altamente dependientes de la precarga y la postcarga, que se encuentran alteradas en la cirrosis avanzada. Por ello, en los últimos años ha ganado relevancia un índice ecocardiográfico denominado diferencia pico de presión de eyección intraventricular (EIVPD, del inglés *ejection intraventricular pressure difference*). Este índice refleja la diferencia de presión entre el ápex y el tracto de salida del ventrículo izquierdo debida a la aceleración del flujo sanguíneo durante la sístole dentro del ventrículo, por lo que está íntimamente relacionada la fuerza de contractilidad del ventrículo izquierdo y es independiente de las condiciones de carga (168). La medida de EIVPD por ecocardiografía ha demostrado ser un buen estimador de la función sistólica en varias enfermedades incluyendo la cirrosis descompensada (169).



**Figura 6. Disfunción cardiocirculatoria en la ascitis refractaria.** SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona.

No se conoce la verdadera prevalencia de la cardiomiopatía cirrótica en pacientes con cirrosis avanzada. Ello pone de manifiesto el interés por encontrar biomarcadores no invasivos que permitan identificar a aquellos pacientes en riesgo de desarrollar disfunción sistólica en situaciones de estrés (162).

## **4. $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos en la cirrosis descompensada**

### **4.1 Indicaciones y beneficios**

En 1980 surgieron los primeros datos acerca del papel del propranolol para reducir la recurrencia de la hemorragia variceal en pacientes con cirrosis (170). Posteriormente, se ha demostrado su eficacia para prevenir un primer episodio de hemorragia en pacientes con varices esofágicas y riesgo de sangrado (profilaxis primaria), así como su papel clave en la prevención de la recurrencia de la hemorragia (profilaxis secundaria), tanto en pacientes cirróticos con y sin ascitis (171-173). Su principal efecto beneficioso es hemodinámico, debido a su capacidad para reducir la presión portal y el flujo en las venas varicosas esofágicas (174). Aunque con menor evidencia, también reduce el riesgo de sangrado por varices gástricas y de resangrado por gastropatía de la hipertensión portal (175). Por todo ello, los BBNS se han posicionado como el pilar del tratamiento para prevenir la hemorragia asociada a la hipertensión portal en pacientes con cirrosis hepática (176).

Además de su beneficio hemodinámico reflejado en un menor riesgo de hemorragia, los BBNS presentan otros beneficios conocidos como no hemodinámicos. Mediante la reducción de la permeabilidad intestinal, los BBNS reducen la translocación bacteriana y disminuyen la inflamación sistémica y el riesgo de PBE (177, 178). Por otra parte, los BBNS parecen disminuir el riesgo de carcinoma hepatocelular (179).

Asimismo, recientemente el tratamiento con BBNS ha demostrado prevenir la descompensación de la enfermedad hepática, fundamentalmente el desarrollo de ascitis, en pacientes con cirrosis compensada e hipertensión portal clínicamente significativa, así como la mortalidad de causa hepática (180). Igualmente, se ha sugerido que la reducción de la hipertensión portal en pacientes con cirrosis descompensada podría frenar la progresión de la enfermedad (181).

### **4.2 Respuesta hemodinámica**

El mecanismo fisiopatológico que explica el beneficio hemodinámico de los BBNS implica el bloqueo de los receptores  $\beta$ -1 adrenérgicos, con la consecuente disminución del gasto cardiaco, y de los receptores  $\beta$ -2, induciendo vasoconstricción esplácnica y reduciendo el flujo sanguíneo tanto a nivel de las colaterales porto-sistémicas como a nivel esplácnico. Todo ello se traduce en una disminución del flujo sanguíneo esplácnico y por tanto de la presión portal (175).

El cateterismo de venas suprahepáticas permite una medida indirecta de la presión portal mediante el GPVH, definido como la diferencia entre la presión suprahepática enclavada o presión sinusoidal y la presión suprahepática libre o presión intraabdominal (182). La reducción del GPVH, en concreto  $\geq 10\%$  del valor inicial, se ha asociado con la disminución significativa del riesgo de un primer episodio de sangrado por varices y se conoce como respuesta hemodinámica (183, 184). Asimismo, la respuesta hemodinámica,

independientemente de la presencia de ascitis, se traduce en otros beneficios clínicos como son la reducción del desarrollo de ascitis, PBE, encefalopatía hepática y un impacto positivo en la supervivencia (185). Sin embargo, no todos los pacientes logran una reducción de la presión portal significativa con tratamiento BBNS. De hecho, solo en torno al 50% de los pacientes alcanzan respuesta hemodinámica con propranolol (186). La presencia de hipertensión portal clínicamente significativa (GPVH  $\geq 10$  mmHg) se ha identificado como factor predictor de respuesta hemodinámica (154, 187). Por ello, la medición del GPVH y su reducción con la terapia con BBNS permite identificar a los pacientes con hipertensión portal que tienen más probabilidades de beneficiarse del tratamiento. En los pacientes que no desarrollan respuesta hemodinámica, la eficacia de los BBNS es subóptima, aunque los beneficios no hemodinámicos podrían no verse reflejados por la respuesta del GPVH.

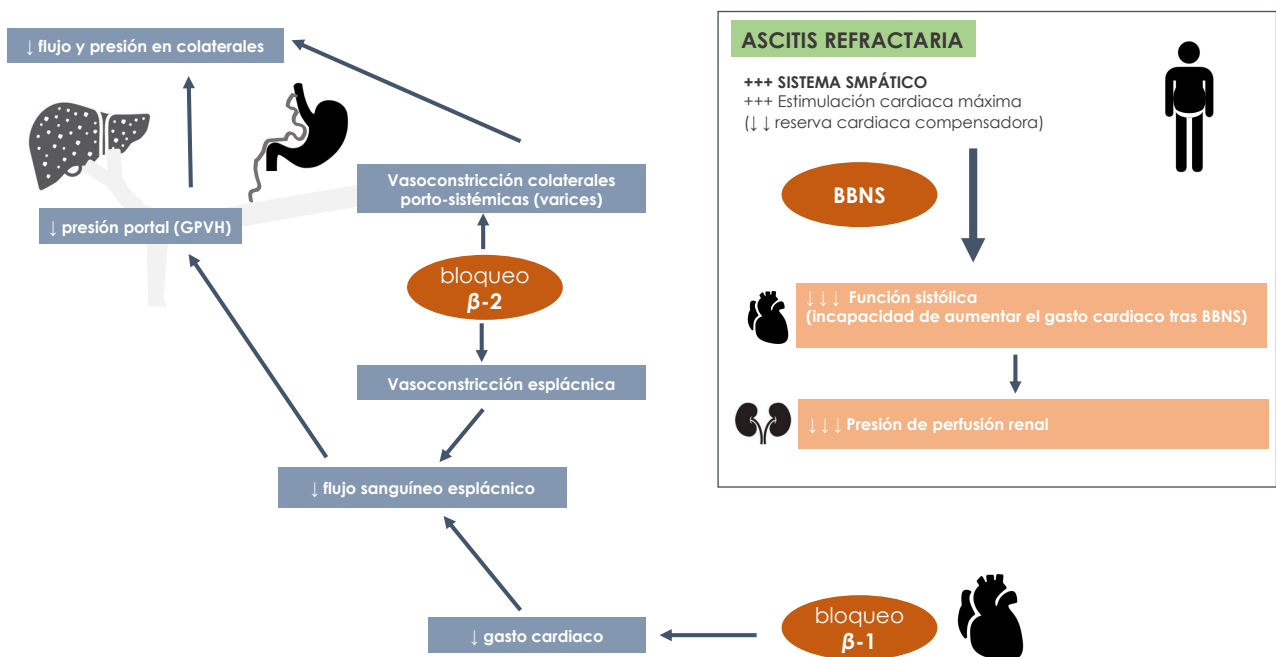
Hasta la fecha, la respuesta hemodinámica determinada por la reducción del GPVH es el único método para evaluar la eficacia del tratamiento BBNS y, aunque la evidencia respalda su seguridad y beneficio en términos incluso de supervivencia, la realidad es que la medición del GPVH es un procedimiento invasivo y no ampliamente disponible (188). En la actualidad no disponemos de marcadores no invasivos alternativos al GPVH que permitan evaluar la existencia de respuesta hemodinámica a BBNS y plantear otras opciones terapéuticas en pacientes no respondedores.

### **4.3 Seguridad**

A pesar de los efectos beneficiosos que favorecen el uso de BBNS en la cirrosis, algunos estudios empezaron a cuestionar hace una década su seguridad en pacientes con enfermedad avanzada, particularmente con ascitis refractaria (189). Ello condujo al inicio de un intenso debate sobre la seguridad de estos fármacos en pacientes con cirrosis gravemente descompensada (ascitis refractaria, PBE, daño renal o ACLF) dando lugar a la llamada "teoría de la ventana". Esta teoría sostenía que los efectos beneficiosos de los BBNS no serían aplicables a todos los pacientes con cirrosis y postulaba la hipótesis de que en pacientes con enfermedad hepática descompensada y disfunción circulatoria grave los BBNS reducirían los mecanismos de compensación cardiaca, conduciendo a un mayor deterioro hemodinámico y poniendo en riesgo la perfusión de órganos diana (190).

En los últimos años se han publicado múltiples estudios observacionales apoyando el riesgo de los BBNS en pacientes con cirrosis avanzada y otros defendiendo su seguridad (175, 191). Recientemente, un estudio prospectivo ha identificado los mecanismos fisiopatológicos que confirmarían la teoría de la ventana y por los cuales los BBNS podrían impactar negativamente en la supervivencia de pacientes con ascitis refractaria. Así, estos pacientes presentan en situación basal una mayor activación de los sistemas vasoactivos e inflamación sistémica. En concreto, existe en ellos una hiperactivación del sistema simpático desarrollada en respuesta a la vasodilatación extrema existente y que conduce a una función sistólica máxima para lograr un aumento del gasto cardiaco que mantiene con dificultad una perfusión tisular adecuada. Ello llevaría a una disminución gradual de su reserva compensatoria cardiaca. Los BBNS, a través del bloqueo  $\beta$ -1 adrenérgico, reducen

la frecuencia cardíaca y el gasto cardíaco frenando la respuesta compensadora cardíaca. En pacientes con ascitis refractaria y máxima estimulación cardíaca en situación basal, la reducción de la contractilidad cardíaca provocada por los BBNS y la incapacidad de aumentar el gasto cardíaco ante este estrés conduce a una caída significativa de la función sistólica estimada por EIVPD. Es más, a mayor vasodilatación periférica basal (estimada por las resistencias vasculares sistémicas), mayor reducción de la función sistólica con BBNS (162). Por ello, los BBNS tendrían un efecto deletéreo en pacientes cirróticos con reserva cardíaca disminuida al bloquear sus mecanismos de compensación cardíaca y conducir a un gasto cardíaco insuficiente, con la consecuente reducción de la presión de perfusión renal por debajo del umbral crítico de autorregulación y consiguiente deterioro de la función renal e impacto en la supervivencia (162, 192).



**Figura 7. Efectos hemodinámicos de los  $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos y su efecto deletéreo en pacientes con ascitis refractaria.** GPVH: gradiente de presión venosa hepática. BBNS:  $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos.



## V. JUSTIFICACIÓN

1. Dificultad para el diagnóstico clínico de ascitis refractaria.

La ascitis refractaria es una complicación de la fase avanzada de la cirrosis descompensada. Su aparición posee connotaciones patogénicas y pronósticas, pues indica progresión de la disfunción circulatoria sistémica propia de la cirrosis y una reducción significativa de la supervivencia que obliga a considerar el trasplante hepático. Sin embargo, el diagnóstico de esta complicación no es fácil pues descansa únicamente en criterios clínicos dependientes de la respuesta al tratamiento diurético. De hecho, carecemos de marcadores no invasivos que permitan identificar los distintos estadios evolutivos de la cirrosis descompensada.

2. Necesidad de individualizar el riesgo-beneficio del tratamiento  $\beta$ -bloqueante no cardioselectivo en la cirrosis descompensada.

Los BBNS son el pilar fundamental del tratamiento para prevenir la hemorragia asociada a la hipertensión portal y han demostrado numerosos beneficios en pacientes con cirrosis hepática. La respuesta hemodinámica, determinada por la reducción del GPVH  $\geq 10\%$ , permite evaluar la eficacia del tratamiento con BBNS. La medición del GPVH es un procedimiento seguro pero invasivo y poco disponible en la práctica clínica. No disponemos de marcadores no invasivos óptimos alternativos al GPVH que permitan evaluar la existencia de respuesta hemodinámica a BBNS y plantear de forma individualizada otras opciones terapéuticas en pacientes no respondedores. Por otra parte, en pacientes con cirrosis avanzada, particularmente en aquellos con disfunción circulatoria avanzada, los BBNS pueden reducir la función sistólica y con ello la perfusión renal, lo que podría comprometer la supervivencia. En consecuencia, sería clínicamente relevante disponer de marcadores no invasivos que permitieran identificar a aquellos pacientes con cirrosis avanzada y disfunción cardiocirculatoria grave en riesgo de presentar disfunción sistólica con BBNS y en los que estos fármacos deberían usarse con precaución o incluso evitarse.

3. Interés de los microRNAs circulantes como biomarcadores en pacientes con cirrosis descompensada.

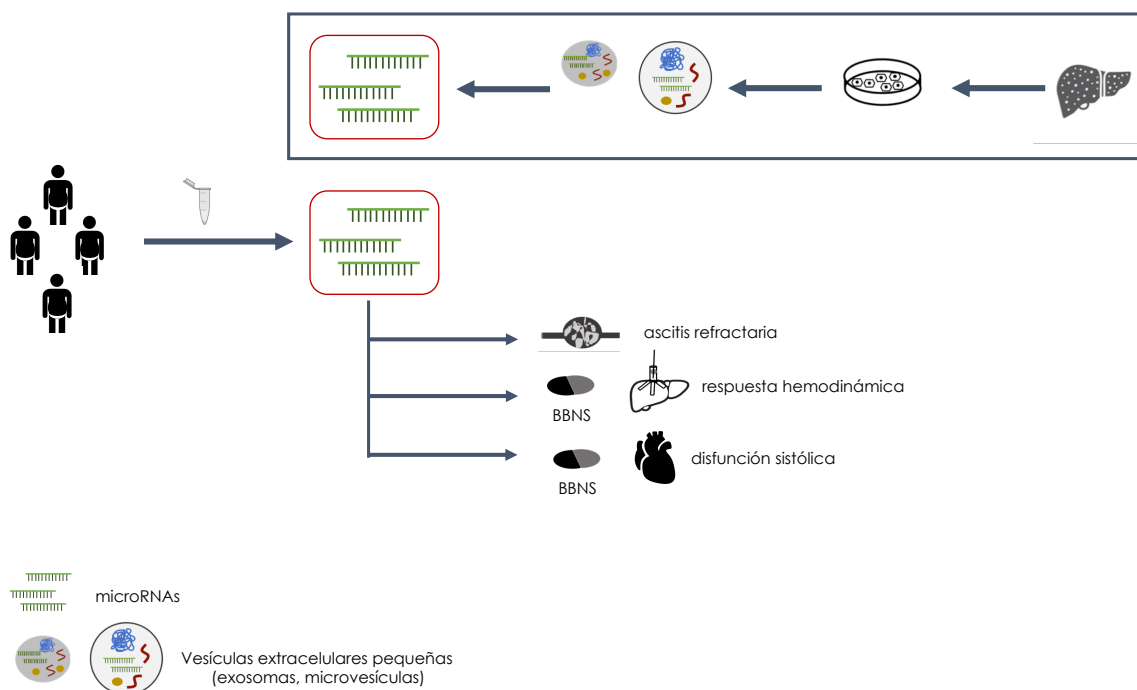
Los miRNAs son pequeñas moléculas de ncRNA implicadas mediante la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional en gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Además de su papel regulador en la expresión génica, los miRNAs son secretados por las células y pueden identificarse en fluidos corporales y servir como biomarcadores. La alteración en el perfil de miRNAs circulantes en diversas patologías ha propiciado, junto con su pequeño tamaño y estabilidad, su estudio como biomarcadores no invasivos diagnósticos o pronósticos, así como predictores de respuesta a fármacos. Las vesículas extracelulares pequeñas contienen miRNAs y constituyen sofisticados sistemas de comunicación intercelular. Mediante la liberación activa de vesículas al espacio extracelular, las células podrían modular la expresión génica de otras células al transferirles los miRNAs contenidos en su interior. El contenido de miRNAs vesiculares difiere en función de la célula de origen y se modifica de forma dinámica, por lo que refleja el estado fisiopatológico de la célula de la que derivan. Ello ha fomentado el interés tanto por las vesículas extracelulares como por los miRNAs vesiculares como potenciales biomarcadores de diagnóstico y progresión de

enfermedad, así como de respuesta terapéutica en distintas situaciones patológicas. Los miRNAs detectados en muestras de suero o plasma parecen estar localizados mayoritariamente en vesículas, y se ha sugerido que el análisis de miRNAs aislando vesículas extracelulares en suero no sería superior al análisis directo de miRNAs séricos. El potencial de los miRNAs circulantes como biomarcadores se ha estudiado en distintas formas de daño hepático. Sin embargo, no se ha evaluado su potencial diagnóstico y pronóstico en el contexto particular de la cirrosis descompensada. Asimismo, no disponemos de estudios que evalúen su papel para identificar la respuesta a tratamiento con BBNS. Los estudios de miRNAs como biomarcadores puede tener valor añadido pues estas moléculas pueden ser parte de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y de los mecanismos de respuesta a los fármacos.

En resumen, la disponibilidad en la actualidad de marcadores no invasivos que identifiquen los distintos estadios de la cirrosis descompensada es limitada. Asimismo, no disponemos de marcadores no invasivos que permitan identificar aquellos pacientes en los que el bloqueo  $\beta$ -adrenérgico no va a reducir la presión portal o en los que incluso puede agravar el compromiso circulatorio. En un intento de avanzar en la búsqueda de herramientas útiles para individualizar el manejo de paciente con cirrosis descompensada, planteamos que la caracterización de una firma de miRNAs contenidos en vesículas extracelulares pequeñas aisladas en el secretoma de hepatocitos humanos primarios procedentes de hígados con cirrosis descompensada podría ser útil para identificar el estadio de la enfermedad. Por ello, el análisis de esos miRNAs vesiculares directamente en muestras de suero de pacientes con cirrosis descompensada permitiría caracterizar formas avanzadas de la enfermedad como es la ascitis refractaria, así como la respuesta hemodinámica al tratamiento con BBNS y aquellos pacientes con disfunción cardiocirculatoria grave con riesgo de presentar disfunción sistólica con BBNS.

## VI. HIPÓTESIS

- El perfil de miRNAs en el secretoma hepatocitario difiere en hepatocitos procedentes de hígados cirróticos comparado con aquellos de hígados no cirróticos. Estos miRNAs constituirían una firma representativa del secretoma hepatocitario en la cirrosis descompensada.
- En pacientes con cirrosis descompensada, los niveles séricos de una firma de miRNAs previamente caracterizada en vesículas extracelulares pequeñas purificadas en el sobrenadante de cultivos hepatocitarios primarios procedentes de hígados de pacientes con cirrosis descompensada:
  - Difieren en los distintos estadios de la enfermedad, ascitis sensible a diuréticos y refractaria.
  - Permiten identificar aquellos pacientes con ascitis refractaria con mayor grado de disfunción circulatoria.
  - Difieren en pacientes respondedores y no respondedores a tratamiento  $\beta$ -bloqueante en términos de reducción del gradiente de presión portal.
  - Permiten identificar a aquellos pacientes en los que el tratamiento  $\beta$ -bloqueante causa disfunción sistólica cardíaca.



**Figura 8. Hipótesis del estudio.** BBNS:  $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos.

## VII. OBJETIVOS

1. Caracterizar una firma de miRNAs en vesículas extracelulares pequeñas por su expresión diferencial en el secretoma hepatocitario de cultivos procedentes de hígados de pacientes con cirrosis descompensada.
  
2. Evaluar en muestras de suero de pacientes con cirrosis descompensada los niveles de la firma de miRNAs caracterizada y su potencial valor como biomarcador para:
  - Discriminar entre pacientes con ascitis sensible a diuréticos y refractaria.
  - Predecir la respuesta hemodinámica a BBNS.
  - Anticipar el desarrollo de disfunción sistólica cardíaca con BBNS.

## VIII. MÉTODOS



## 1. Diseño del estudio

Estudio colaborativo traslacional con muestras biológicas humanas que se desarrolló en tres fases con implicación de varios centros:

1) *Identificación de una firma de miRNAs en el secretoma de cultivos de hepatocitos humanos cirróticos y no cirróticos.*

Fase desarrollada en:

- Laboratorio de Biología Vascular Hepática del Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS)-Hospital Clinic de Barcelona
- Servicio de Cirugía General-Hospital Clinic de Barcelona
- Laboratorio de Exosomas-Centro de Investigación Cooperativa bioGUNE de Derio.

2) *Análisis de la firma de miRNAs identificada en muestras de suero de una cohorte bien caracterizada de pacientes con cirrosis descompensada y de controles no cirróticos apareados por edad y sexo.*

La fase de generación de las colecciones de muestras de suero de pacientes con cirrosis descompensada se desarrolló en:

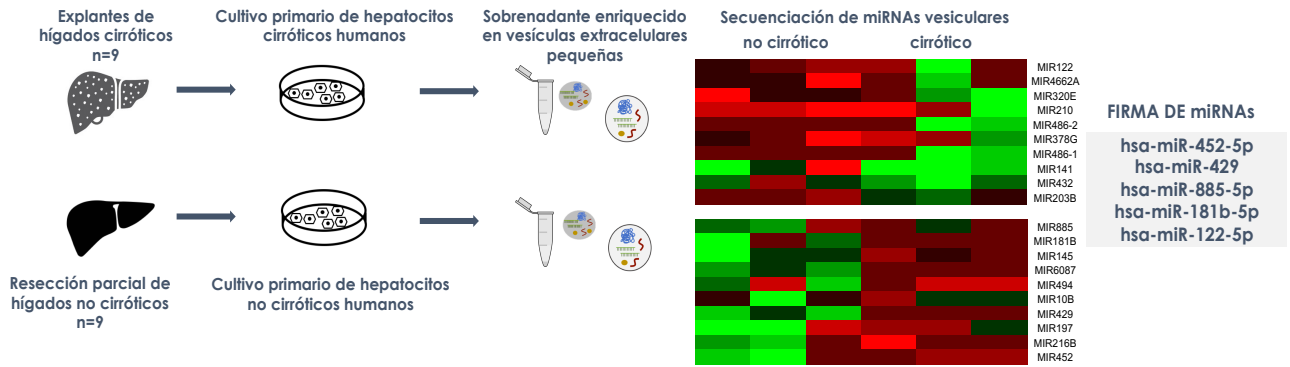
- Servicio de Gastroenterología y Hepatología del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid.
- Servicio de Gastroenterología y Hepatología del Hospital Universitario Gregorio Marañón. Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Madrid.
- Departamento de Cardiología del Hospital Universitario Gregorio Marañón. Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Madrid.

3) *Evaluación del valor de los niveles séricos de estos miRNAs como biomarcadores en pacientes con cirrosis descompensada para distinguir ascitis refractaria de ascitis sensible a diuréticos, predecir respuesta hemodinámica a BBNS, e identificar el desarrollo de disfunción sistólica cardiaca con tratamiento BBNS.*

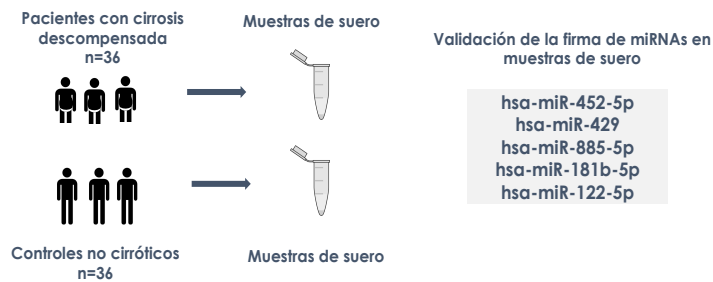
Fase desarrollada en:

- Laboratorio de Biomarcadores y Dianas Terapéuticas. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Biosanitaria (IRYCIS), Madrid.
- Servicio de Gastroenterología y Hepatología del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Biosanitaria (IRYCIS), Madrid.

**1 IDENTIFICACIÓN DE UNA FIRMA DE miRNAs EN EL SECRETOMA DE CULTIVOS DE HEPATOCITOS HUMANOS**



**2 ANÁLISIS DE LA FIRMA DE miRNAs EN MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES CON CIRROSIS DESCOMPENSADA Y CONTROLES NO CIRRÓTICOS**



**3 EVALUACIÓN DE LA FIRMA DE miRNAs COMO BIOMARCADOR SÉRICO EN PACIENTES CON CIRROSIS DESCOMPENSADA**



**Figura 9. Diseño del estudio.** miRNAs: microRNAs. BBNS:  $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos.

## 1.1 Identificación de una firma de microRNAs en el secretoma de cultivos de hepatocitos humanos

En primer lugar, se aislaron hepatocitos partir de explantes de hígados de pacientes con cirrosis descompensada (n =9, todos de etiología alcohólica y sin carcinoma hepatocelular) e hígados de pacientes sometidos a resección hepática parcial por metástasis hepáticas de cáncer colorrectal que no habían recibido quimioterapia y sin hepatopatía de base (n =9). El servicio de Anatomía Patológica evaluó la viabilidad de las muestras procedentes de las resecciones hepáticas parciales para garantizar que los hepatocitos aislados no estuvieran afectados por su proximidad al tejido tumoral.

Para el aislamiento y cultivo de hepatocitos se emplearon protocolos previamente validados (193). Los hepatocitos con viabilidad >80% y pureza >95% se sembraron en placas de Petri de 150 cm<sup>2</sup> recubiertas de colágeno con una densidad de  $2 \times 10^7$  células por placa y se cultivaron (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) en medio de Eagle modificado por Dulbecco Ham F-12 suplementado con solución de penicilina-estreptomicina (1% volumen [vol]/vol), L-glutamina (1% vol/vol) y suero bovino fetal depleccionado de exosomas (2% vol/vol). Tras 24 horas de cultivo, se recogió el sobrenadante, se centrifugó a 2.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se filtró con filtros de 0,22 µm para eliminar los cuerpos apoptóticos. Posteriormente, mediante ultracentrifugación a diferentes velocidades (10.000 g y 100.000 g) se obtuvieron fracciones enriquecidas en vesículas extracelulares pequeñas generadas por los hepatocitos, principalmente exosomas (194, 195). La pureza y la calidad de las preparaciones se evaluaron mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NanoSight LM10, Amesbury, Reino unido) (196). Se utilizó el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc) para determinar la concentración de proteínas y las preparaciones de vesículas extracelulares pequeñas se almacenaron a -80 °C para su análisis posterior.

Las preparaciones de vesículas extracelulares pequeñas se dividieron en grupos de tres para el aislamiento y análisis de RNA. Inicialmente se aisló el RNA total (miRVANA Paris Kit; Ambion/Thermo Fisher Scientific) a partir de 50 µg de preparación y 2 µL de 1 nM. A cada muestra se le añadió exógenamente la secuencia del miR-39-5p de *Caenorhabditis elegans*. La cantidad y los perfiles de los RNA obtenidos se examinaron utilizando Pico Chips RNA 6000 de Agilent (#5067-1513; Agilent Technologies). Las bibliotecas de secuenciación se prepararon utilizando el kit NEXTflex Small RNA-Seq v3 V16.06 (#5132-05; Bioo Scientific Corporation) siguiendo el protocolo del proveedor. De forma resumida, las muestras de RNA se incubaron durante 2 minutos a 70 °C y posteriormente se añadió el adaptador adenilado 3' y la enzima ligasa y se mantuvieron durante una noche a 20°C. Tras eliminar el exceso de adaptador 3', se añadió el adaptador 5' y la enzima ligasa, incubando la mezcla a 20 °C durante una hora. El producto de ligación se utilizó para la transcripción inversa con la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney en un termociclador durante 30 minutos a 42 °C y 10 minutos a 90 °C. A continuación, el DNA complementario (DNAC) se enriqueció mediante ciclos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*): 2 minutos a 95 °C, 22-25 ciclos de 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 15 segundos a 72 °C, y alargamiento final durante 2 minutos a 72 °C, deteniendo finalmente la reacción a 4 °C. Los productos de la PCR se colocaron en geles

de electroforesis de poliacrilamida (#EC6265BOX; Thermo Fisher Scientific) y se separó del gel la banda entre 150 y 300 pares de bases. Los productos se extrajeron del gel de poliacrilamida utilizando un protocolo adaptado en el que el DNAC se diluyó en agua bidestilada. A continuación, se analizaron cuantitativa y cualitativamente en un bioanalizador Agilent 2100 utilizando el kit de DNA de alta sensibilidad de Agilent (#5067-4626; Agilent Technologies) y el kit de DNA de doble cadena HS DNA Qubit (#Q32854; Thermo Fisher Scientific). Las bibliotecas se secuenciaron en una sola lectura para 51 nucleótidos en un sistema HiSeq2500 (Illumina) en la plataforma de análisis del genoma del CIC bioGUNE. Los datos de secuenciación de RNA se depositaron en el registro Gene Expression Omnibus (número de acceso GSE150867).

Tras la secuenciación, los datos se procesaron para identificar los miRNAs expresados diferencialmente en las muestras procedentes de cultivos de hepatocitos cirróticos y no cirróticos. Se seleccionaron aquellos miRNAs que presentaron una diferencia de al menos 1,5 veces y una  $p < 0,05$  en el análisis univariante. Finalmente, los niveles diferenciales de los miRNAs seleccionados en los sobrenadantes para la firma se validó mediante qRT-PCR individual (TaqMan).

## **1.2 Análisis de la firma de microRNAs en muestras de suero de pacientes con cirrosis descompensada y controles no cirróticos**

La firma de miRNAs identificada tras la secuenciación y validada con qRT-PCR individual, así como tres miRNAs (miR-192-5p, miR-34a-5p y miR-29a-5p) previamente reconocidos como biomarcadores de enfermedad hepática crónica (67, 69, 73), se analizaron en muestras de suero de pacientes con cirrosis hepática descompensada y controles no cirróticos apareados por sexo y edad.

Muestras de suero de pacientes con cirrosis hepática descompensada. Se obtuvieron de una colección registrada (C.0005352, sección de colecciones del Registro de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III) procedente de una cohorte de 36 pacientes con cirrosis y ascitis tratados con un BBNS (propranolol) como profilaxis primaria de hemorragia variceal, sin carcinoma hepatocelular. Entre abril de 2016 y diciembre de 2018 se recogieron y almacenaron muestras de suero basales y al mes de iniciar tratamiento con BBNS. Las muestras de suero se centrifugaron a 2.000 g durante 15 minutos a 22 °C y los sobrenadantes se almacenaron en alícuotas a -80 °C hasta el análisis de miRNAs (abril-diciembre 2019).

Muestras de suero de sujetos sin cirrosis apareados por sexo y edad. Se obtuvieron muestras de 36 individuos donantes de sangre sin antecedentes de enfermedad hepática apareados por sexo y edad con los 36 pacientes cirróticos. Las muestras procedían del Biobanco del Hospital Universitario Ramón y Cajal - Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (B.0000678, Registro de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III) integrado dentro de la Red Nacional de Biobancos (PT17/0015/0010). Todas las muestras se obtuvieron con la aprobación de los comités éticos y científicos correspondientes y se procesaron siguiendo procedimientos estándar. El suero se obtuvo por centrifugación a 1.100 g durante 10 minutos

a 4 °C y posteriormente se almacenó en alícuotas a –80 °C hasta el análisis de miRNAs (abril-diciembre 2019).

La detección y cuantificación de los miRNAs integrantes de la firma se llevó a cabo mediante qRT-PCR individual en muestras de suero.

- 1) *Extracción de RNA.* En primer lugar, a partir de 200 µL de suero se aisló el RNA total con el Mini Kit de Purificación de RNA de Plasma/Suero (#55000; Norgen Biotek, Thorold, Canadá) según el protocolo del fabricante. Durante la extracción de las muestras y su manipulación para separar el suero del resto de los componentes circulatorio puede ocurrir hemólisis. Aunque muchos miRNAs en suero no se ven afectados y pueden ser detectados en muestras hemolizadas, ciertos estudios sugieren que el análisis en muestras no hemolizadas podría mejorar significativamente la sensibilidad y la especificidad dado que las muestras hemolizadas podrían interferir con la PCR y conducir a variaciones significativas en los niveles miRNAs (197). Por ello, para la detección de hemólisis en las muestras se utilizó un método validado basado en la relación entre un miRNA enriquecido en eritrocitos (miR-451) y un miRNA no afectado por hemólisis (miR-23a). De esta forma, una diferencia (miR-23a–miR-451)  $\geq 7$  se consideró indicador de niveles altos de hemólisis en la muestra (197). Se añadió una cantidad constante de UniSp2 (normalizador sintético exógeno) previo a la extracción para controlar que todas las extracciones fueran igual de eficientes.
- 2) *Transcripción inversa o retrotranscripción.* Tras aislar el RNA de las muestras, se sintetizaron los DNAc mediante transcripción inversa con una DNA polimerasa dependiente de RNA, previo alargamiento de la molécula de miRNA. Se empleó Cel39 como control exógeno durante la síntesis de DNAc para monitorizar que todas las reacciones de transcripción inversa habían sido igual de eficientes.
- 3) *Amplificación con qPCR en tiempo real.* Tras la transcripción inversa, el DNAc generado correspondiente a cada miRNA fue amplificado y cuantificado por PCR empleando cebadores (secuencias cortas de nucleótidos complementarias a una porción del DNAc que permiten su amplificación) marcados con fluorescencia específicos para cada miRNA de interés (cebadores de miRNAs de Exiqon A/S, Vedbæk, Dinamarca). Se añadió una sustancia marcada con fluoróforo (SYBR Green) que permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos en un termociclador que tiene sensores de fluorescencia de forma que, tras excitar al fluoróforo con la longitud de onda apropiada, mide la fluorescencia generada tras cada ciclo de amplificación. De esta forma, la fluorescencia aumenta a medida que el DNAc de interés se amplifica con PCR permitiendo la cuantificación de cada miRNA. Todas las reacciones se realizaron por triplicado con el equipo termociclador Light Cycler 480 (Roche) siguiendo las pautas del proveedor. El umbral de ciclo (Ct, del inglés *cycle threshold*) representa el número de ciclos necesarios para que el ciclador de PCR pueda distinguir la fluorescencia relacionada con la amplificación de un gen. Los valores de Ct se expresan en una escala logarítmica en base 2, carecen de unidades y puede emplearse para estimar los niveles de cantidad del miRNA de interés.

El objetivo principal de la qRT-PCR es identificar diferencias de niveles de miRNAs entre dos grupos de muestra. Para ello, la normalización tiene como objetivo eliminar cualquier diferencia entre los dos grupos que no se deba a una verdadera representación de los niveles de los miRNAs. Estas diferencias pueden deberse a variabilidad en la obtención de muestras, la extracción de RNA o la cuantificación por PCR. Una de las estrategias de normalización más reconocidas es el empleo de miRNAs endógenos que se expresan de forma uniforme y con poca variabilidad en el material biológico a estudio (el suero en nuestro caso) y demostrar su estabilidad en todas las muestras (198-200). Los niveles relativos de cada miRNA se calcularon utilizando miR-103a-3p como gen normalizador para reducir la variación en la cuantificación y minimizar la variabilidad analítica. Se seleccionó miR-103a-3p para la normalización de datos dado que mostró niveles estables en las muestras analizadas y menor variabilidad (menor desviación estándar) entre los normalizadores evaluados (los recomendados por el proveedor Qiagen para análisis en suero: miR-103a-3p, miR-191-5p, miR-30a y miR-124-3p). De hecho, miR-103a-3p y miR-191-5p han mostrado previamente ser normalizadores endógenos estables en suero (200). Los niveles séricos de miRNAs se cuantificaron de forma relativa mediante la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudio *versus* el gen control o normalizador, de acuerdo con el método de la diferencia de Cts:  $\Delta Ct$  ( $\Delta Ct = \text{media Ct}_{\text{miRNA estudiado}} - \text{media Ct}_{\text{miR-103a-3p}}$ , siendo la media de Ct la media de los tres análisis realizados para cada miRNA) que se correlaciona inversamente con la cantidad de miRNA en suero, de forma que a mayor cantidad o número de copias de miRNA en la muestra menor  $\Delta Ct$  (menor número total de ciclos de PCR necesarios para amplificar el gen y detectar la fluorescencia).

### **1.3 Evaluación de la firma de microRNAs como biomarcador sérico en pacientes con cirrosis descompensada**

El potencial papel como biomarcador de la firma de miRNAs identificada se evaluó en una cohorte de 36 pacientes con cirrosis descompensada, 18 de los cuales tenían ascitis refractaria definida de acuerdo con el Club Internacional de Ascitis (201). Estos pacientes fueron tratados con BBNS como profilaxis primaria de hemorragia variceal y se les realizó un estudio completo consistente en extracción de sangre, ecocardiografía Doppler y estudio hemodinámico hepático y cardiopulmonar tanto basalmente como cuatro semanas después de iniciar tratamiento con BBNS (propranolol), como parte de un protocolo prospectivo (ClinicalTrials.gov NCT02163512) (162).

*Análisis de laboratorio.* Se analizaron los siguientes parámetros hepáticos: albúmina, bilirrubina e índice normalizado internacional (INR, del inglés *international normalized ratio*). Asimismo, se evaluaron parámetros de función glomerular renal (creatinina, cistatina C y tasa de filtración glomerular estimada (TFGe) por MDRD6). Se calcularon las escalas clásicas de función hepática en pacientes con cirrosis hepática (MELD y Child-Pugh).

*Ecocardiografía Doppler.* Todos los ecocardiogramas fueron realizados en el servicio de Cardiología del Hospital Gregorio Marañón. Se utilizaron transductores de banda ancha de

2.0-4.0 MHz en un Vivid-7 (General Electric Healthcare). Las imágenes en modo M Doppler color se adquirieron a partir de la vista de cinco cámaras y se procesaron utilizando un software personalizado para obtener el EIVPD. Este índice refleja la diferencia de presión entre el ápex y el tracto de salida del ventrículo izquierdo en el corazón debido a la aceleración del flujo sanguíneo durante la sístole temprana, de forma que el valor de la diferencia de presión está íntimamente relacionado con la fuerza de contractilidad del ventrículo izquierdo (168, 202). El EIVPD es independiente de la precarga y la postcarga y ha demostrado ser un buen estimador de la función sistólica en pacientes con cirrosis descompensada (169).

*Estudio hemodinámico hepático y cardiopulmonar.* El estudio hemodinámico se realizó tras ayuno nocturno y con anestesia local. El GPVH se calculó como la diferencia entre la presión suprahepática enclavada y la presión suprahepática libre utilizando un catéter-balón (Edwards Lifesciences TM, CA, EE. UU.) y el paquete de software Lab Chart 7 (ADI Instruments, Mildford, MA, EE. UU.). La respuesta hemodinámica a los BBNS se definió como una disminución de  $\geq 10\%$  en el GPVH, punto de corte previamente validado para definir respuesta en la profilaxis primaria (183, 184). La presión arterial media se midió con un esfigmomanómetro automático cada 5 minutos. Se utilizó un catéter Swan-Ganz (Abbott Laboratories, Chicago, IL, EE. UU.) para medir la presión en la aurícula derecha y el gasto cardíaco por termodilución. Las resistencias vasculares sistémicas se estimaron según la fórmula  $(\text{presión arterial media} - \text{presión de la aurícula derecha}) \times 80 / \text{gasto cardíaco}$ .

## **2. Periodo y lugar de realización del estudio**

### 1. Diseño del estudio:

Se diseñó un proyecto traslacional multicéntrico a nivel nacional. Periodo: enero-marzo 2018.

### 2. Primera fase del estudio: identificación de la firma de miRNAs en el secretoma hepatocitario.

Llevada a cabo en el Laboratorio de Biología Vascular Hepática del Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS)-Hospital Clinic de Barcelona y en el Laboratorio de Exosomas del CIC bioGUNE de Derio. Periodo: marzo-diciembre 2018.

### 3. Segunda y tercera fases del estudio: estudio de muestras de suero de pacientes con cirrosis descompensada y controles no cirróticos, validación de la firma de miRNAs en las muestras de suero de pacientes con cirrosis descompensada y controles no cirróticos, y evaluación de la firma de miRNAs como biomarcador sérico en cirrosis descompensada. Ambas fases fueron desarrolladas en el Servicio de Gastroenterología y Hepatología del Hospital Universitario Ramón y Cajal y en el Laboratorio de Biomarcadores y Dianas Terapéuticas del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Periodo: enero-diciembre 2019.

## **3. Aspectos éticos y cumplimiento de la legislación vigente**

El protocolo del estudio se adhirió a los principios de la Declaración de Helsinki. La primera etapa del estudio, la identificación de la firma de miRNAs, se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS)-Hospital Clinic de Barcelona y su protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de este centro (HCB/2018/0028). El protocolo para las etapas posteriores recibió la aprobación del Comité de Ética de la Investigación Clínica del Hospital Universitario Ramón y Cajal (362/19; 1 de abril de 2019). Todos los sujetos incluidos otorgaron consentimiento informado por escrito autorizando el almacenamiento y uso para fines de investigación de sus muestras biológicas.

## **4. Estudio bioinformático**

La evaluación del significado funcional y las interacciones de los miRNAs se llevó a cabo mediante análisis bioinformático. El análisis de enriquecimiento funcional para la predicción de genes diana de los miRNAs integrantes de la firma y su clasificación funcional se realizó utilizando el software cluster Profiler que permite comparar y automatizar el análisis de enriquecimiento funcional de grupos de genes (203). Se evaluaron las interacciones mediante predicción computacional, empleando para ello la base de datos miRGate y se aceptaron predicciones con tres o más validaciones computacionales o una validación experimental. La metodología de miRGate se ha aplicado con éxito previamente en conjuntos de datos independientes, proporcionando predicciones que posteriormente se



han validado mediante ensayos funcionales (204). Asimismo, se construyeron redes bipartitas utilizando los miRNAs seleccionados como fuente y los genes diana regulados como objetivos.

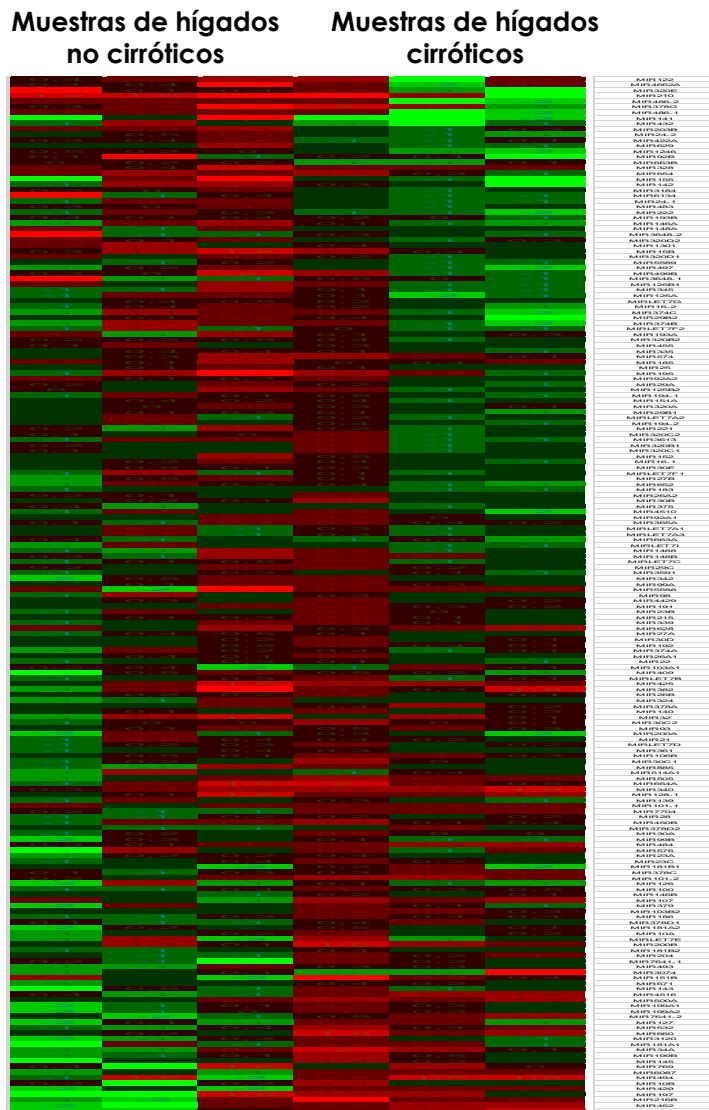
## 5. Análisis estadístico

Se utilizó el test de Shapiro-Wilk y los gráficos de distribución para establecer la normalidad de los datos. Las variables continuas se expresaron como mediana y rango intercuartílico (RIC) y se compararon mediante análisis univariante con el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Para datos continuos apareados se utilizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Las variables categóricas se proporcionan como frecuencias absolutas y relativas y se utilizó la prueba exacta de Fisher para las comparaciones entre grupos. La concentración sérica de miRNAs se expresó en  $\Delta Ct$ , que implica una escala logarítmica en base 2. Por ello, los niveles séricos de miRNAs se correlacionaron con la respuesta hemodinámica a los BBNS y las resistencias vasculares sistémicas mediante el coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho$ ). El área bajo la curva (AUC, del inglés *area under the curve*) se utilizó para evaluar el rendimiento diagnóstico de los miRNAs seleccionados. Se calcularon los puntos de corte óptimos de sensibilidad y especificidad para cada miRNA en base a las curvas de características operativas del receptor. El análisis estadístico se realizó utilizando Stata/IC 14.0. Todos los análisis fueron de dos colas y la significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

## **IX. RESULTADOS**

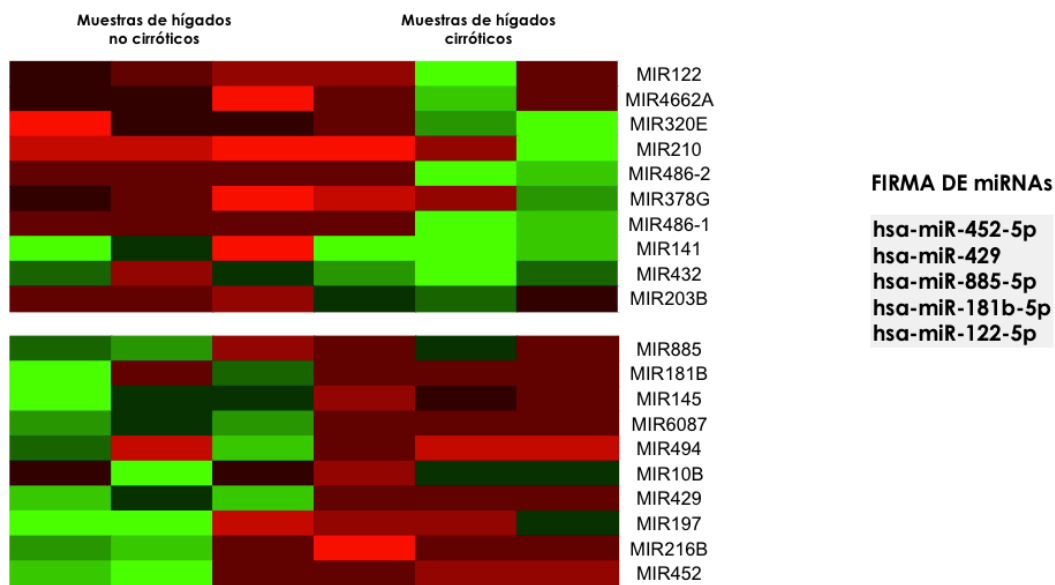
# 1. Identificación de una firma de microRNAs en el secretoma de hepatocitos humanos primarios

La secuenciación de los miRNAs contenidos en las vesículas extracelulares pequeñas del secretoma hepatocitario evidenció diferente composición entre aquellas procedentes de hígados cirróticos y no cirróticos.



**Figura 10. Mapa de intensidad con todos los microRNAs identificados en la secuenciación.** Ordenados por expresión (de menor a mayor expresión en vesículas extracelulares cirróticas).

Tras la secuenciación, los datos se procesaron para identificar aquellos miRNAs con niveles significativamente diferentes en muestras procedentes de hígados cirróticos (diferencia de al menos 1,5 veces y una  $p < 0,05$ ), seleccionando 5 miRNAs miR-452-5p, miR-429, miR-885-5p, miR-181b-5p y miR-122-5p. La expresión diferencial de los 5 miRNAs integrantes de la firma se validó mediante qRT-PCR individual. Los 5 miRNAs seleccionados estaban registrados en la base de datos miRBASE (<http://www.mirbase.org/>) (13).



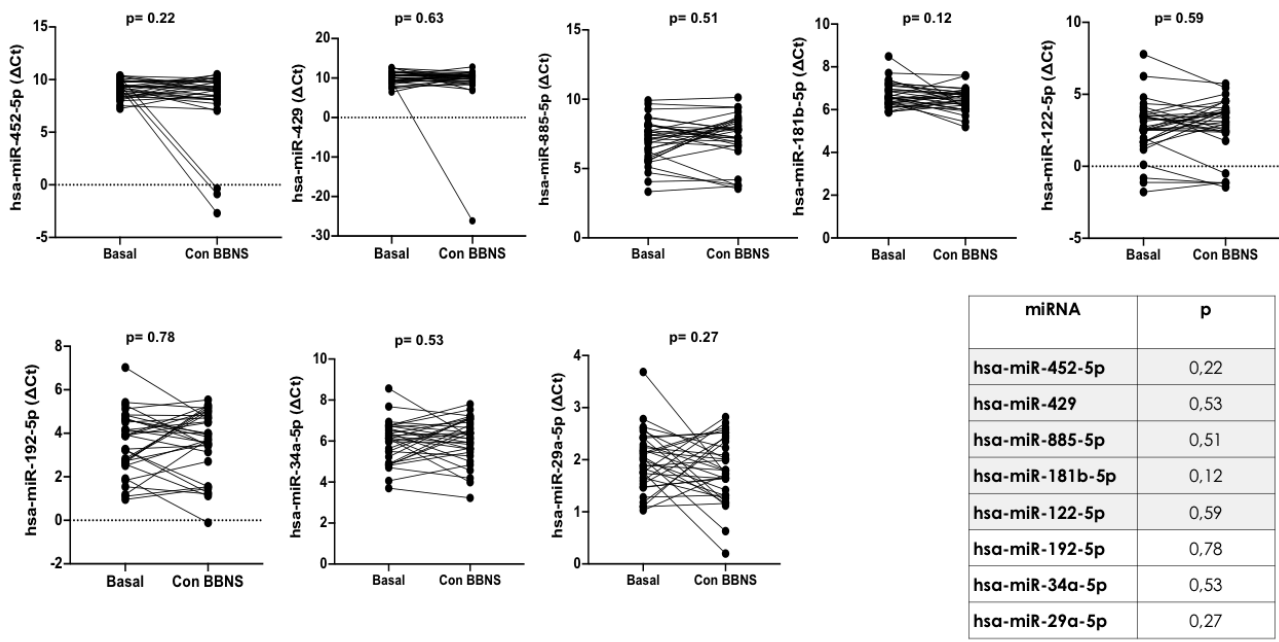
**Figura 11. Mapa de intensidad con los 20 microRNAs más desregulados (los 10 más expresados y los 10 menos expresados) tras secuenciar las vesículas extracelulares pequeñas del secretoma de hepatocitos cirróticos y no cirróticos.** Los cinco microRNAs integrantes de la firma identificada fueron aquellos con mayor diferencia de niveles y significación estadística. miRNAs: microRNAs.

## **2. Validación de la firma de microRNAs en muestras de suero de pacientes cirróticos y controles sin cirrosis**

El siguiente paso fue validar la firma de miRNAs identificada (miR-452-5p, miR-429, miR-885-5p, miR-181b-5p y miR-122-5p) en el suero de pacientes con cirrosis descompensada y controles no cirróticos apareados por sexo y edad. A modo de control interno, también analizamos tres miRNAs (miR-192-5p, miR-34a-5p y miR-29a-5p) previamente identificados como biomarcadores de enfermedades hepáticas crónica.

Analizamos muestras de suero de 36 pacientes con cirrosis y ascitis (50% de ascitis refractaria), tanto muestras de suero basales como muestras de suero tras un mes de iniciar tratamiento con BBNS, y 36 controles no cirróticos para determinar los niveles séricos de la firma de cinco miRNAs y los tres miRNAs control. Los miRNAs no pudieron determinarse en tres pacientes con cirrosis dado que las muestras se habían recogido en tubos heparinizados causando inhibición de qRT-PCR. Por tanto, estos tres pacientes y sus controles correspondientes fueron excluidos del análisis, incluyéndose finalmente 33 controles (83,4% varones, edad 55 (RIC, 51-59) años) y 33 pacientes con cirrosis descompensada (81,8% varones, edad 58 [RIC, 54-61] años), de los cuales 16 presentaban ascitis sensible a diuréticos y 17 ascitis refractaria.

En los pacientes con cirrosis hepática, los niveles séricos de miRNAs no se modificaron de forma significativa con el tratamiento BBNS.

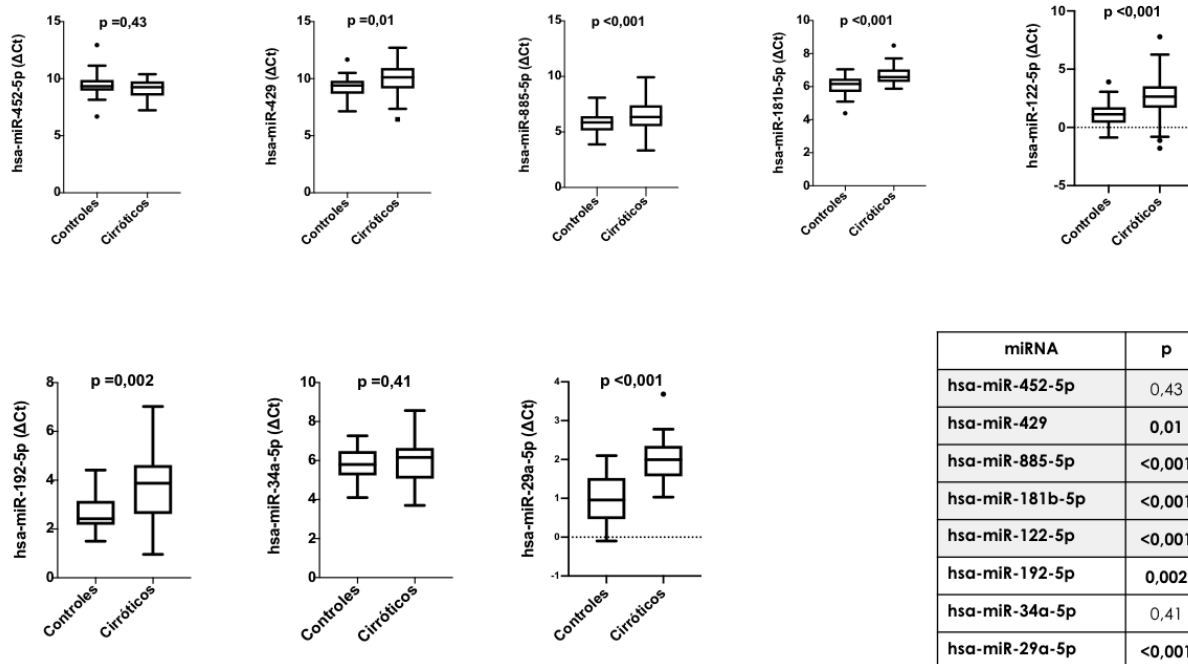


**Figura 12. Niveles séricos de microRNAs en muestras basales y en muestras recogidas un mes tras el inicio de tratamiento  $\beta$ -bloqueante no cardioselectivo.** Los microRNAs integrantes de la firma aparecen resaltados en la tabla incorporada en la figura. BBNS:  $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos. miRNA: microRNA.

El análisis en muestras de suero confirmó niveles significativamente diferentes de cuatro de los cinco miRNAs integrantes de la firma y dos de los tres miRNAs control en pacientes cirróticos frente a controles no cirróticos. Estas diferencias se mantuvieron tanto en las muestras basales de los pacientes cirróticos como en las muestras con tratamiento BBNS. En comparación con los controles no cirróticos los pacientes con cirrosis mostraron niveles significativamente más bajos ( $p < 0,005$ ) de miR-429, miR-885-5p, miR-181b-5p, miR-122-5p, miR-192-5p y miR-29a-5p, y niveles similares de miR-452-5p y miR-34a-5p.

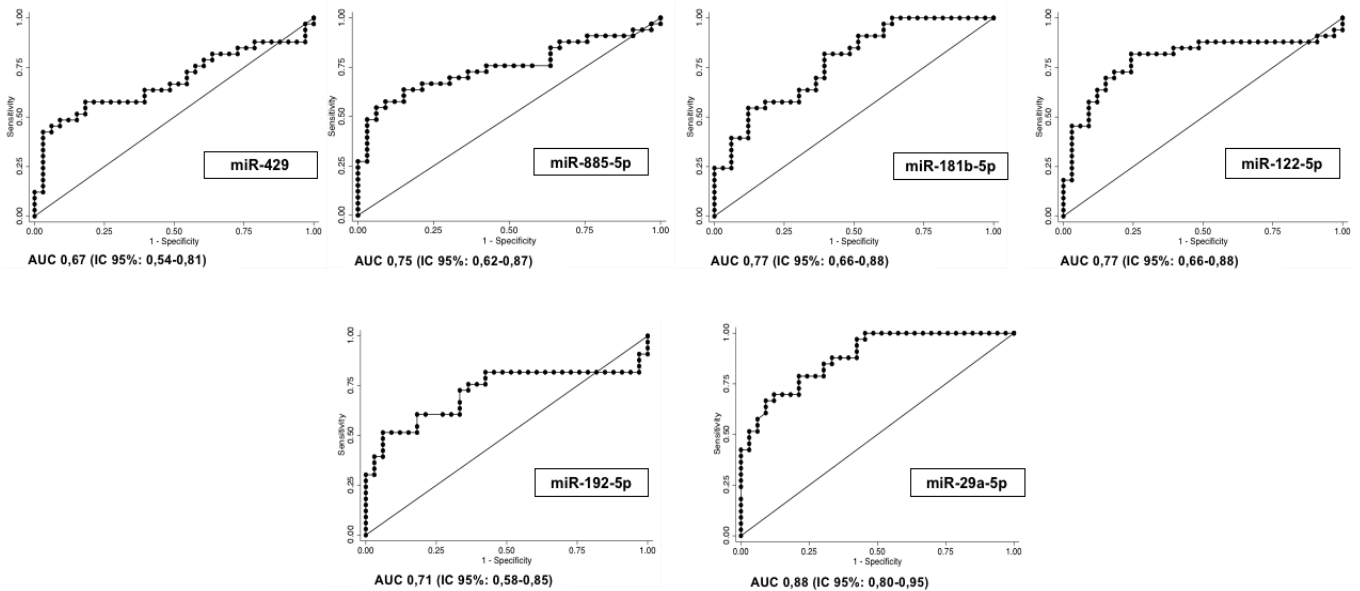
miRNA	p (cirróticos basal-contróles)	p (cirróticos BBNS-contróles)
hsa-miR-452-5p	0,43	0,11
hsa-miR-429	0,01	0,001
hsa-miR-885-5p	<0,001	<0,001
hsa-miR-181b-5p	<0,001	<0,001
hsa-miR-122-5p	<0,001	<0,001
hsa-miR-192-5p	0,002	<0,001
hsa-miR-34-5p	0,41	0,14
hsa-miR-29a-5p	<0,001	<0,001

**Tabla 4. Diferencia en los niveles séricos de microRNAs en muestras de sujetos sin cirrosis y pacientes con cirrosis descompensada (muestra basal y muestra con tratamiento).** Los microRNAs integrantes de la firma aparecen resaltados en la tabla. miRNA: microRNA. BBNS: β-bloqueantes no cardioselectivos.



**Figura 13. Niveles séricos de la firma de microRNAs y los tres microRNAs control en muestras de sujetos sin cirrosis y pacientes con cirrosis descompensada.** Las líneas verticales indican el rango, salvo cuando existen valores extremos que se simbolizan con un punto. La línea horizontal central es la mediana y los límites horizontales de los cuadros representan el primer y tercer cuartil. Los microRNAs integrantes de la firma aparecen resaltados en la tabla incorporada en la figura. miRNA: microRNA.

De los miRNAs con niveles significativamente diferentes, miR-29a-5p mostró el AUC más alto para la identificación de cirrosis (AUC 0,88, intervalo de confianza [IC] del 95%: 0,8-0,95; sensibilidad 78,8%, especificidad 78,8% para el punto de corte 1.53).



**Figura 14. Representación del área bajo la curva para determinar el valor de los niveles de microRNAs en suero como biomarcadores en pacientes con cirrosis comparado con sujetos no cirróticos.** Cada punto de la curva representa un valor de corte diferente para un par de sensibilidad-especificidad. AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza.



### **3. Niveles séricos de la firma de microRNAs y correlación clínica en pacientes con cirrosis descompensada**

#### **3.1 Pacientes con cirrosis descompensada: Evaluación basal y tras tratamiento con $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos**

Las muestras de suero evaluadas procedían de 17 pacientes con ascitis refractaria y 16 pacientes con ascitis sensible a diuréticos, mayoritariamente con cirrosis de causa enólica. A todos ellos se les había realizado una analítica de sangre, un estudio hemodinámico hepático y cardiopulmonar y una ecocardiografía como parte de la evaluación basal. No se objetivaron diferencias en ambos grupos en los parámetros analíticos y escalas habituales de función hepática (Child-Pugh y MELD). Sin embargo, si se observó alteración significativa en los parámetros de función renal en los pacientes con ascitis refractaria, así como en la presión arterial media. En la **tabla 3** se detallan las características basales de los pacientes incluidos.

	<b>Ascitis sensible a diuréticos n =16</b>	<b>Ascitis refractaria n =17</b>	<b>p</b>
<b>Edad, años</b>	55 (52-59)	59 (54-65)	0,4
<b>Sexo, varón</b>	13 (81,2%)	14 (82,3%)	1
<b>Etiología de la cirrosis hepática</b>			0,26
Alcohol	13 (81,2%)	10 (58,8%)	
Viral	3 (18,8%)	7 (41,2%)	
<b>Escalas de función hepática</b>			
Child-Pugh, B/C	13 (81,2%) / 3 (18,8%)	10 (58,8%) / 7 (41,2%)	0,26
MELD	12 (10-16)	16 (13-17)	0,12
<b>Parámetros de laboratorio</b>			
Bilirrubina (mg/dL)	1,9 (1-3,5)	2,2 (1,3-3,6)	0,63
Albúmina (g/dL)	3 (2,5-3,3)	2,9 (2,6-3,3)	0,97
INR	1,3 (1,3-1,5)	1,5 (1,3-1,6)	0,17
Creatinina (mg/dL)	0,7 (0,7-0,8)	0,9 (0,7-1)	0,08
TFGe (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	103 (84-120)	79 (58-87)	<b>0,01</b>
Cistatina C (mg/dL)	1,2 (1,1-1,2)	1,6 (1,2-2)	<b>0,03</b>
Sodio (mEq/L)	135 (133-137)	132 (131-134)	<b>0,01</b>
<b>Parámetros hemodinámicos</b>			
Presión arterial media (mmHg)	91 (85-97)	80 (74-92)	<b>0,006</b>
Resistencias vasculares sistémicas (dinas.seg.cm <sup>-5</sup> /m <sup>2</sup> )	1006 (828-1170)	937 (784-1179)	0,69
GPVH (mmHg)	21 (19-25)	23 (19-25)	0,81
EIVPD (mmHg)	4,1 (3,2-5,4)	4,6 (2,9-5,8)	0,65

**Tabla 5. Características basales de los pacientes cirróticos.** Las variables cuantitativas se proporcionan como mediana y rango intercuartílico; las variables cualitativas como valores absolutos y relativos. MELD: del inglés *model for end-stage liver disease*; INR: índice normalizado internacional (del inglés *international normalized ratio*); TFGe: tasa de filtración glomerular estimada; GPVH: gradiente de presión venosa hepática; EIVPD: diferencia pico de presión de eyección intraventricular (del inglés *ejection intraventricular pressure difference*).

Los niveles séricos basales de miRNAs no se correlacionaron con las escalas clásicas de la función hepática (MELD, MELD-sodio Child-Pugh).

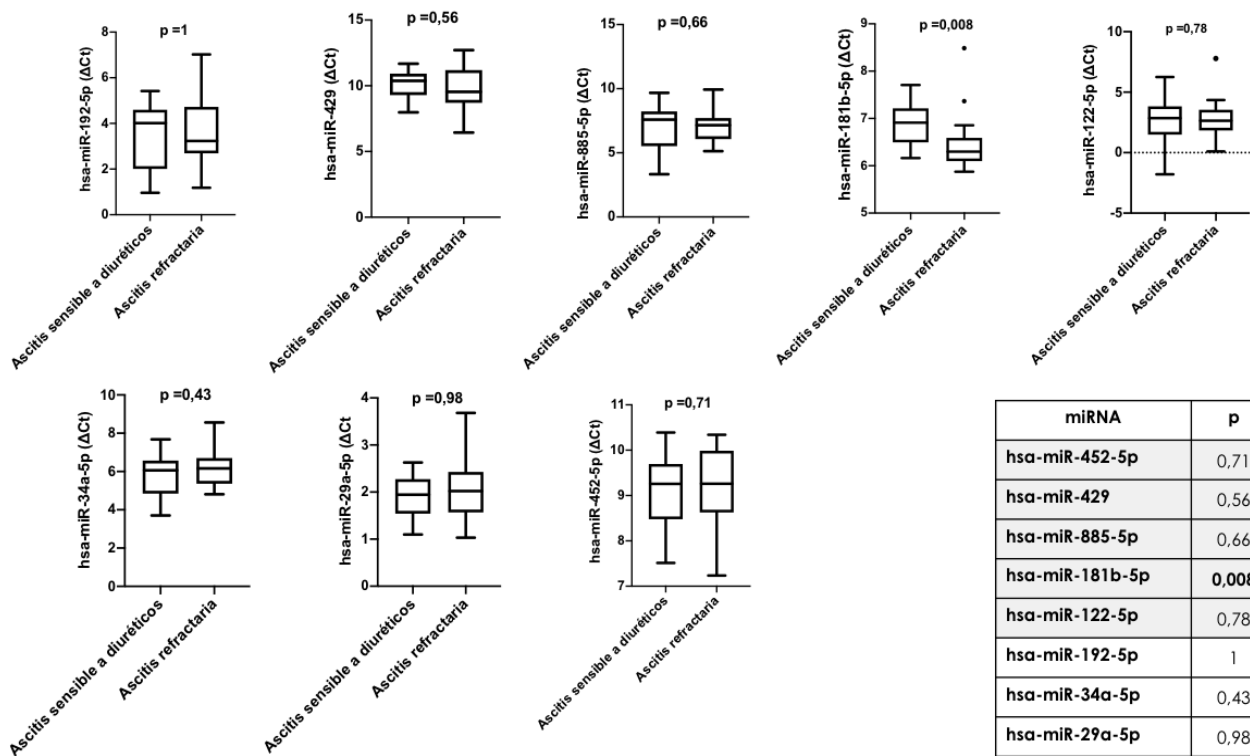
miRNA	MELD	MELD-Na	Child-Pugh
<b>hsa-miR-452-5p</b>	$\rho = 0,13$ $p = 0,45$	$\rho = 0,11$ $p = 0,51$	$\rho = 0,24$ $p = 0,16$
<b>hsa-miR-429</b>	$\rho = 0,02$ $p = 0,89$	$\rho = -0,02$ $p = 0,9$	$\rho = -0,02$ $p = 0,87$
<b>hsa-miR-885-5p</b>	$\rho = 0,17$ $p = 0,31$	$\rho = 0,14$ $p = 0,4$	$\rho = 0,3$ $p = 0,08$
<b>hsa-miR-181b-5p</b>	$\rho = -0,15$ $p = 0,38$	$\rho = -0,14$ $p = 0,41$	$\rho = -0,15$ $p = 0,38$
<b>hsa-miR-122-5p</b>	$\rho = 0,17$ $p = 0,32$	$\rho = 0,23$ $p = 0,18$	$\rho = 0,32$ $p = 0,06$
<b>hsa-miR-192-5p</b>	$\rho = 0,11$ $p = 0,52$	$\rho = 0,14$ $p = 0,43$	$\rho = 0,14$ $p = 0,42$
<b>hsa-miR-34a</b>	$\rho = 0,05$ $p = 0,74$	$\rho = 0,2$ $p = 0,24$	$\rho = 0,14$ $p = 0,43$
<b>hsa-miR-29a-5p</b>	$\rho = 0,04$ $p = 0,8$	$\rho = 0,06$ $p = 0,7$	$\rho = 0,04$ $p = 0,81$

**Tabla 6. Correlación de los niveles séricos de microRNAs con las escalas de función hepática.** Los microRNAs integrantes de la firma aparecen resaltados en la tabla. miRNA: microRNA. MELD: del inglés, *model for end-stage liver disease*. MELD-Na: MELD-sodio.

Un mes después de iniciar tratamiento con BBNS (propranolol), a los 33 pacientes se les realizó nuevamente una evaluación completa incluyendo análisis de sangre, estudio hemodinámico hepático y cardiopulmonar y ecocardiografía. Se objetivó respuesta hemodinámica (caída del GPVH  $\geq 10\%$ ) en 8 (50%) pacientes con ascitis sensible a diuréticos y 9 (53%) pacientes con ascitis refractaria ( $p = 0,87$ ). Respecto al impacto en la función sistólica con tratamiento BBNS, los pacientes con ascitis refractaria presentaron una reducción significativa de la función sistólica estimada por EIVPD (basal: 4,6 (2,9-5,8) mmHg; tras BBNS: 3,3 (3-4,1) mmHg,  $p = 0,005$ ) que no presentaron los pacientes con ascitis sensible a diuréticos ( $p = 0,3$ ).

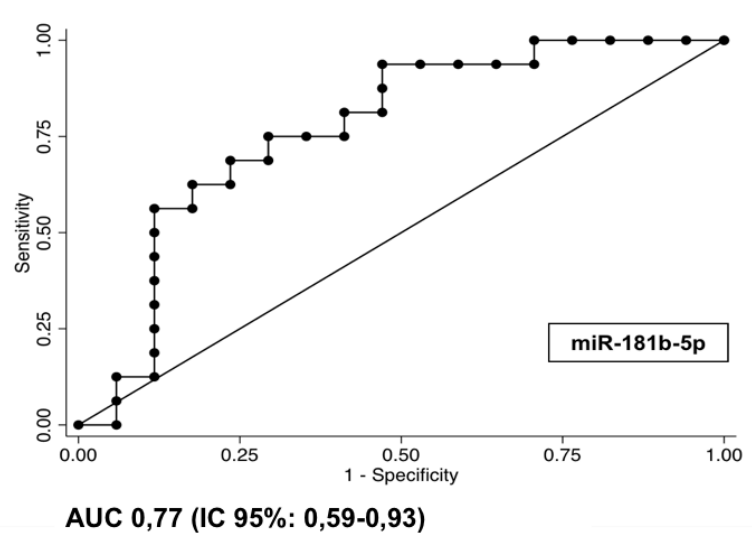
### 3.2 Niveles séricos de microRNAs y ascitis refractaria

Los niveles séricos basales de miR-181b-5p fueron significativamente más altos en pacientes con ascitis refractaria comparado con los pacientes con ascitis sensible a diuréticos ( $p = 0,008$ ). Los otros miRNAs examinados no presentaron diferencias significativas en pacientes con ascitis refractaria y ascitis sensible a diuréticos. Estas diferencias se mantuvieron al realizar el análisis en las muestras de pacientes con tratamiento BBNS ( $p = 0,04$  para miR181b-5p, resto de miRNAs  $> 0,05$ ).



**Figura 15. Niveles séricos de microRNAs en pacientes con ascitis sensible a diuréticos y ascitis refractaria.** Las líneas verticales indican el rango, salvo cuando existen valores extremos que se simbolizan con un punto. La línea horizontal central es la mediana y los límites horizontales de los cuadros representan el primer y tercer cuartil. Los microRNAs integrantes de la firma aparecen resaltados en la tabla incorporada en la figura. miRNA: microRNA.

miR-181b-5p mostró un AUC de 0,77 (IC del 95%: 0,59-0,93; sensibilidad 75%; especificidad 70,6% para el punto de corte 6,57) para identificar ascitis refractaria.

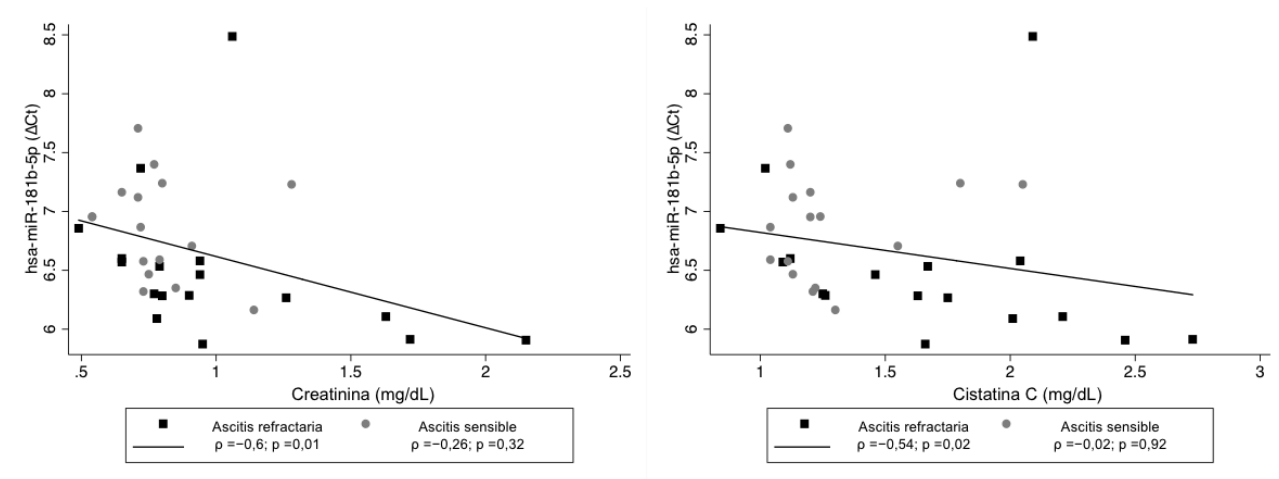


**Figura 16. Representación del área bajo la curva de miR-181b-5p para identificar ascitis refractaria.** Cada punto de la curva representa un valor de corte diferente para un par de sensibilidad-especificidad. AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza.

Los niveles séricos de miR-181b-5p mostraron una correlación inversa con los parámetros de función renal. Al analizar por separado ambos grupos, la correlación se mantuvo solo en pacientes con ascitis refractaria.

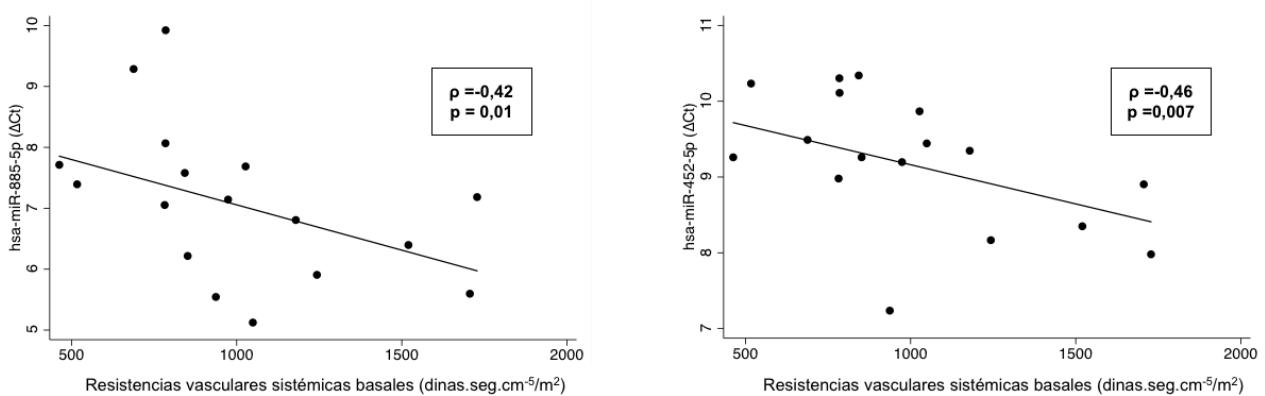
	<b>Todos los pacientes n =33</b>	<b>Ascitis sensible a diuréticos n =16</b>	<b>Ascitis refractaria n =17</b>
<b>Creatinina sérica- hsa-miR-181b-5p</b>	$\rho =-0,5$ ; $p =0,002$	$\rho =-0,26$ ; $p =0,32$	$\rho =-0,6$ ; $p =0,01$
<b>Cistatina C- hsa-miR-181b-5p</b>	$\rho =-0,44$ ; $p =0,01$	$\rho =-0,02$ ; $p =0,92$	$\rho =-0,54$ ; $p =0,02$

**Tabla 7. Correlación de los niveles séricos de miR-181b y parámetros de función renal.**



**Figura 17. Correlación de los niveles séricos de miR-181b y parámetros de función renal.** Los puntos representan pacientes individuales.

Los niveles séricos de miR-452-5p y miR-885-5p se correlacionaron con la gravedad de la vasodilatación arterial sistémica. Los pacientes con resistencias vasculares sistémicas basales más bajas presentaron niveles séricos inferiores de miR-452-5p ( $\rho = -0,46$ ;  $p = 0,007$ ) y miR-885-5p ( $\rho = -0,42$ ;  $p = 0,01$ ).



**Figura 18. Correlación entre los niveles basales de miR-452-5p y miR-885-5p en suero con las resistencias vasculares sistémicas basales en pacientes con ascitis refractaria.** Los puntos representan pacientes individuales.

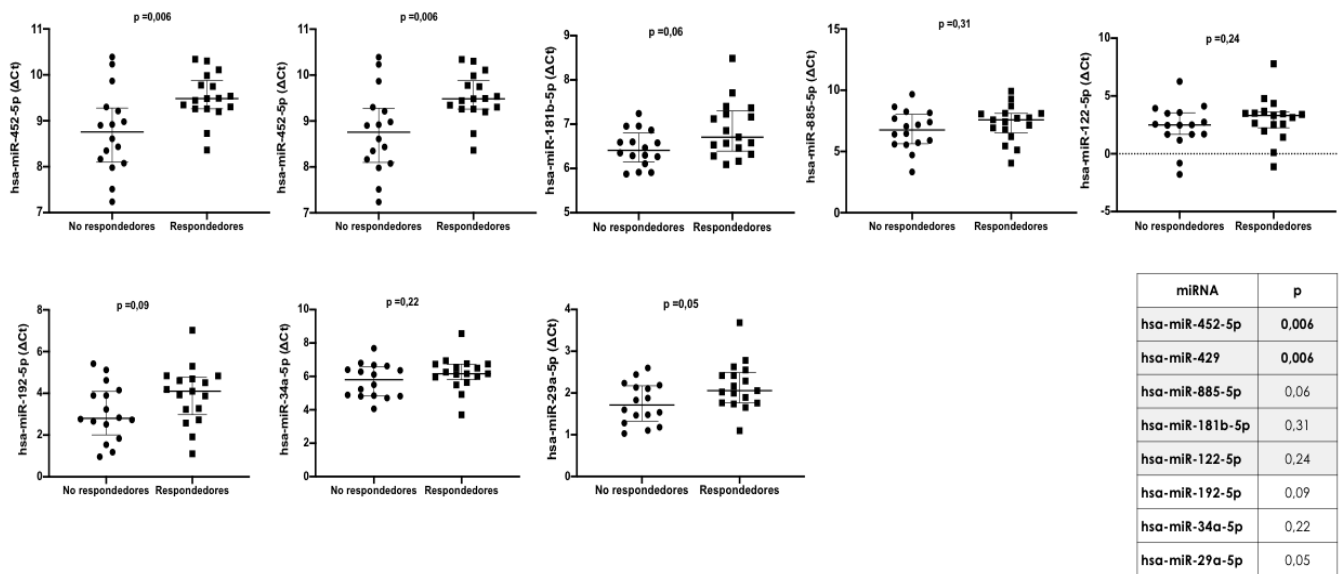
### 3.3 Niveles séricos de microRNAs y respuesta hemodinámica

No se evidenció correlación entre los niveles séricos basales de miRNAs y el GPVH basal.

miRNA	GPVH (mmHg)
hsa-miR-452-5p	$\rho = 0,18$ $p = 0,29$
hsa-miR-429	$\rho = 0,06$ $p = 0,71$
hsa-miR-885-5p	$\rho = -0,05$ $p = 0,76$
hsa-miR-181b-5p	$\rho = 0,21$ $p = 0,23$
hsa-miR-122-5p	$\rho = 0,01$ $p = 0,92$
hsa-miR-192-5p	$\rho = -0,12$ $p = 0,49$
hsa-miR-34a	$\rho = 0,04$ $p = 0,79$
hsa-miR-29a-5p	$\rho = 0,29$ $p = 0,09$

**Tabla 8. Correlación de los niveles séricos de microRNAs con el gradiente de presión venosa hepática basal.** Los microRNAs integrantes de la firma aparecen resaltados en la tabla. miRNA: microRNA. GPVH: gradiente de presión venosa hepática.

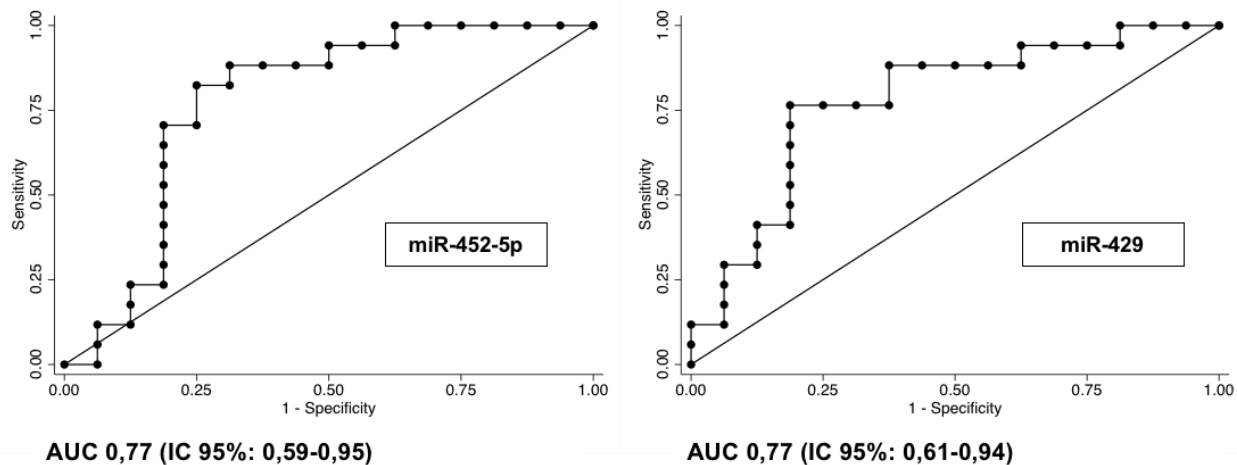
Se objetivó respuesta hemodinámica en 17 (51,5%) pacientes. Los pacientes que desarrollaron respuesta hemodinámica con tratamiento BBNS presentaron niveles séricos basales de miR-452-5p y miR-429 significativamente más bajos que los no respondedores hemodinámicos ( $p < 0,005$ ). Los niveles de miR-181b-5p y miR-29a-5p mostraron una tendencia similar, aunque no significativa ( $p = 0,05$  y  $p = 0,06$ , respectivamente), mientras que otros miRNAs no difirieron significativamente entre respondedores y no respondedores.



**Figura 19. Niveles séricos de microRNAs en pacientes con y sin respuesta hemodinámica a tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos.** La línea horizontal central es la mediana y los límites horizontales de los cuadros representan el primer y tercer cuartil. Los microRNAs integrantes de la firma aparecen resaltados en la tabla incorporada en la figura. Los puntos representan pacientes individuales. BBNS:  $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos. miRNA: microRNA.

El AUC de miR-452-5p para identificar respuesta hemodinámica fue 0,77 (IC del 95%: 0,59-0,95; sensibilidad 82,4%; especificidad 75% para un punto de corte de 9,26) y de miR-429 0,77 (IC del 95%: 0,61-0,94; sensibilidad 76,5%; especificidad 81,2% para un punto de corte de 10,2).

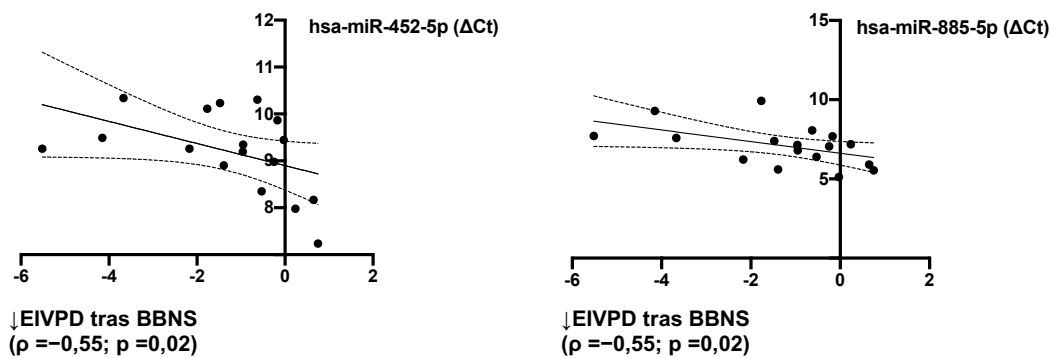




**Figura 20. Representación del área bajo la curva de miR-452-5p y miR-429 para identificar de respuesta hemodinámica.** Cada punto de la curva representa un valor de corte diferente para un par de sensibilidad-especificidad. AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza.

### 3.4 Niveles séricos de microRNAs y deterioro de la función sistólica con tratamiento $\beta$ -bloqueante no cardioselectivo en pacientes con ascitis refractaria

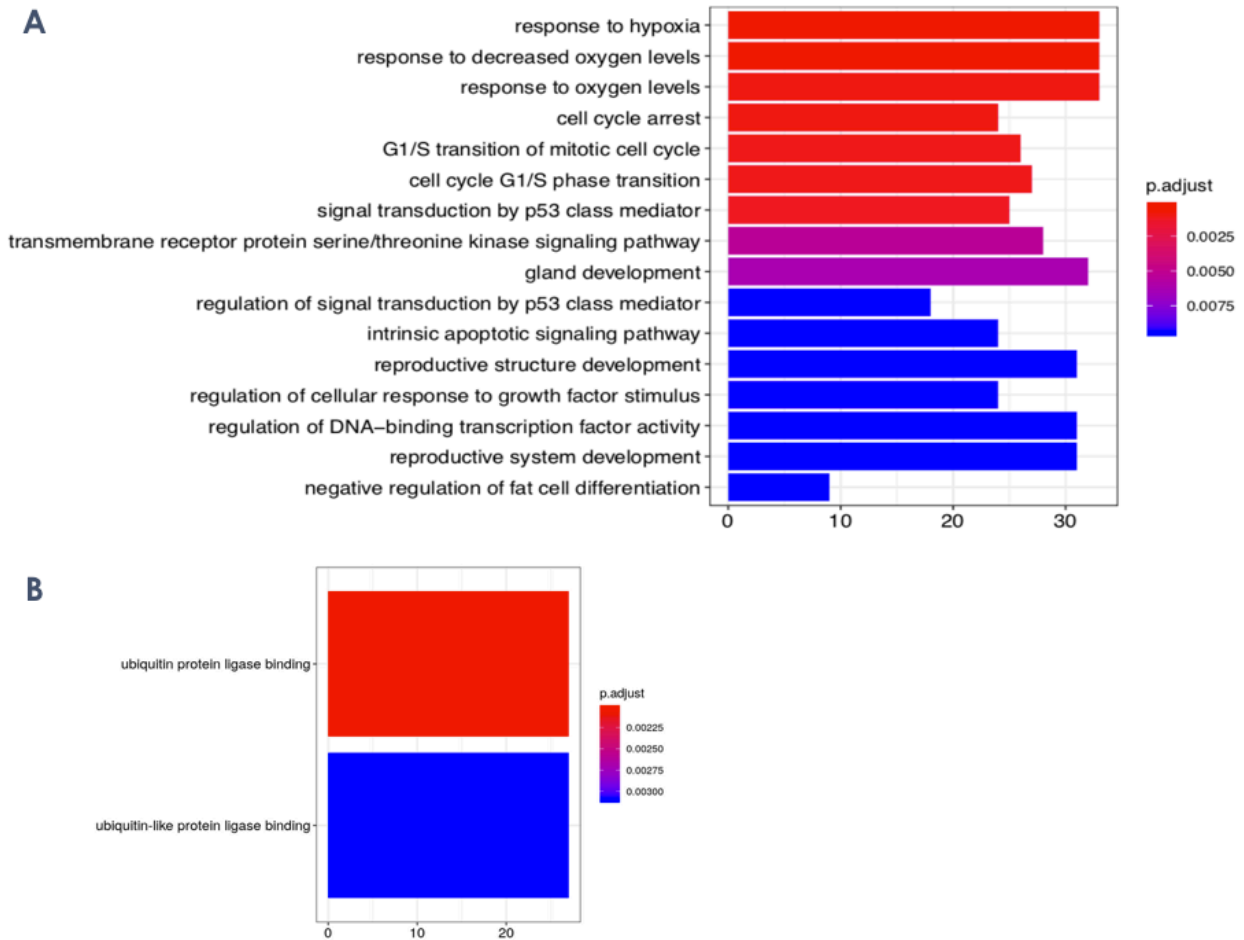
El tratamiento con BBNS redujo de forma significativa la función sistólica cardiaca estimada por EIVPD en pacientes con ascitis refractaria. Los niveles séricos basales de miR-452-5p y de miR-885-5p se correlacionan inversamente con el desarrollo de disfunción sistólica cardiaca con BBNS en pacientes con ascitis refractaria ( $\rho = -0,55$ ;  $p = 0,02$  y  $\rho = -0,55$   $p = 0,02$ , respectivamente).



**Figura 21. Correlación entre los niveles séricos basales de miR-452-5p y miR-885-5p y la caída de la función sistólica con tratamiento  $\beta$ -bloqueante no cardioselectivo en pacientes con ascitis refractaria.** EIVPD: diferencia pico de presión de eyección intraventricular (del inglés *ejection intraventricular pressure difference*). BBNS:  $\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos. Los puntos representan pacientes individuales. Las líneas discontinuas representan el intervalo de confianza.

### 3.5 Significado funcional de los microRNAs integrantes de la firma

Llevamos a cabo un análisis bioinformático para evaluar las posibles implicaciones funcionales de los miRNAs estudiados. Tras el análisis de predicción de genes dianas y su clasificación funcional determinamos que estos miRNAs y sus genes diana están implicados en varios procesos biológicos entre los que destaca la respuesta celular a la hipoxia y a nivel molecular en la degradación proteica vía ubiquitina.



**Figura 22. Análisis de enriquecimiento funcional de las dianas controladas por los microRNAs evaluados.** A) Procesos biológicos. B) Funciones moleculares.

Asimismo, generamos redes bipartitas de interacción funcional con acción cooperativa para analizar los datos biológicos relacionados con la función de miRNAs. Para ello, utilizamos los miRNAs seleccionados como fuente y los genes diana regulados como objetivos para ilustrar la relación en la predicción de objetivos compartidos. De esta forma, objetivamos como miR-452-5p, miR-429, miR-181b-5p, miR-122-5p, miR-192-5p y miR-34a-5p controlan la expresión de objetivos comunes que podrían cooperar para promover la respuesta celular: miR-429, miR-181b-5p y miR-34a-5p se relacionan en su implicación en la expresión del gen *B-cell lymphoma 2* (BCL2) y miR-429, miR-181b-5p y miR-192-5p parecen estar relacionados a través del inhibidor de la proteína de apoptosis ligado al gen X (XIAP). BCL2 y XIAP son genes implicados en la apoptosis.

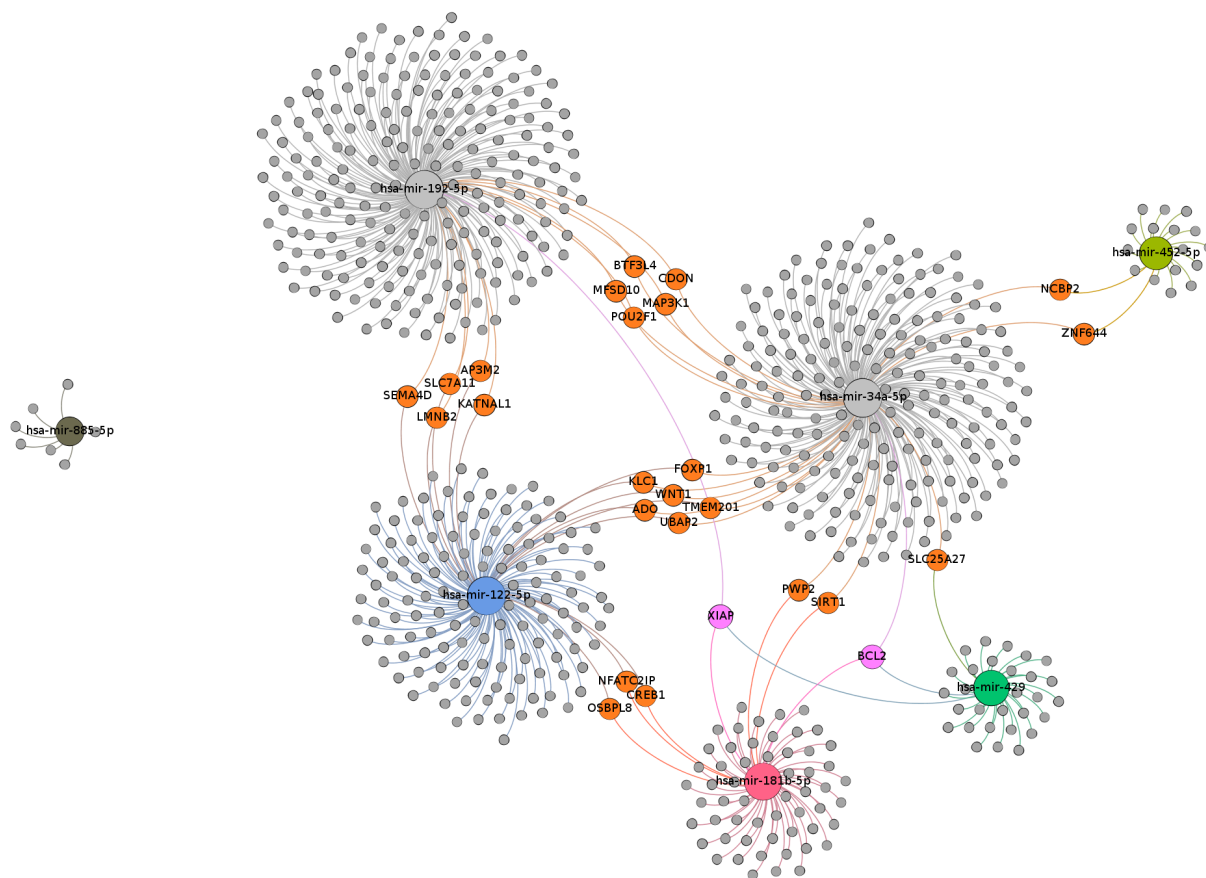


Figura 23. Red bipartita que representa el patrón de interacción entre los microRNAs estudiados a través de los genes diana regulados.

## X. DISCUSIÓN

Los miRNAs circulantes han sido objeto de estudio con anterioridad en pacientes con enfermedad hepática crónica, fundamentalmente para el diagnóstico y la estratificación de MAFLD y hepatopatía viral. Sin embargo, el presente estudio es el primero que se centra en el papel de los miRNAs como biomarcador de estadio de enfermedad en el contexto específico de la cirrosis descompensada. Asimismo, este estudio piloto presenta un innovador abordaje para seleccionar los miRNAs a investigar como potenciales biomarcadores séricos. En este sentido, se planteó un abordaje traslacional identificando en primer lugar una firma de miRNAs con expresión diferencial en vesículas extracelulares pequeñas generadas por hepatocitos de hígados de pacientes con cirrosis descompensada. Dado que el contenido de las vesículas extracelulares pequeñas traduce el estado fisiopatológico de las células de las que derivan (40), esta firma de miRNAs vesiculares caracterizada *in vitro* podría reflejar de forma precisa el estadio de la enfermedad y, de confirmarse en muestras de suero, podría ser un potencial marcador no invasivo para caracterizar la cirrosis descompensada. Una vez identificada la firma se optó por analizar en suero directamente los miRNAs identificados sin aislar previamente vesículas extracelulares pequeñas, puesto que se ha sugerido previamente como alternativa equivalente (119-121). Además de la firma identificada *in vitro*, se examinó a modo de control interno el comportamiento de tres miRNAs previamente relacionados con enfermedad hepática crónica.

Los resultados confirmaron la hipótesis inicial, ya que la firma de miRNAs identificada *in vitro* en las vesículas extracelulares pequeñas pudo ser analizada en suero y se correlacionó con parámetros que reflejan distintos estadios en pacientes con cirrosis descompensada. De esta forma, se determinaron diferencias significativas en los niveles séricos de miRNAs de la firma en pacientes con ascitis refractaria, así como su capacidad para distinguir a los pacientes con mayor vasodilatación arterial periférica, que presentan mayor predisposición a desarrollar disfunción sistólica cardíaca con tratamiento BBNS. Por otra parte, los resultados sugieren que los niveles basales de miRNAs de la firma permitirían identificar aquellos pacientes con cirrosis descompensada que van a presentar respuesta hemodinámica al tratamiento BBNS. Los miRNAs analizados como control fueron capaces de diferenciar a los pacientes cirróticos de los sujetos no cirróticos, pero no permitieron estadificar a los pacientes con cirrosis descompensada ni predecir la respuesta hemodinámica al tratamiento con BBNS.

Seis de los miRNAs examinados, cuatro procedentes de la firma caracterizada *in vitro* (miR-429, miR-885-5p, miR-181b-5p y miR-122-5p) y dos de los miRNAs control (miR-192-5p y miR-29a-5p) presentaron niveles diferentes en suero en pacientes con cirrosis descompensada en comparación con los sujetos no cirróticos. El descenso en los niveles séricos de miR-29a-5p en pacientes cirróticos comparado con individuos sin hepatopatía ya se había objetivado en estudios previos, y en esta cohorte este miRNA presentó la mejor precisión diagnóstica para identificar cirrosis (69). Los otros cinco miRNAs que presentaron niveles significativamente más bajos en el suero de los pacientes con cirrosis fueron por una parte miR-429, que no ha sido estudiado anteriormente en enfermedad hepática, y por otra parte miR-122-5p, miR-885-5p, miR-181b-5p y miR-192-5p, que han presentado niveles séricos más elevados en pacientes con enfermedad hepática crónica en comparación con controles en estudios previos (49-51). Sin embargo, la mayor parte de estos estudios evaluaron el papel

de miRNAs en distintas situaciones de daño hepático crónico como son la hepatitis viral, MAFLD o el carcinoma hepatocelular, pero no incluyeron prácticamente pacientes con cirrosis descompensada. Esto podría explicar las diferencias encontradas en relación a los niveles séricos de estos miRNAs en pacientes cirróticos en este estudio (niveles disminuidos) y lo descrito previamente en la literatura (niveles aumentados). En este sentido, se han objetivado niveles séricos reducidos de miR-122-5p, el miRNA más abundante en el hepatocito, y de miR-885-5p en pacientes con cirrosis descompensada en comparación con pacientes con cirrosis compensada (86, 92, 93). Los niveles séricos de miRNAs más bajos observados en pacientes con enfermedad más avanzada podrían ser secundarios a una disminución de la secreción por una pérdida de hepatocitos funcionales, mientras que en etapas iniciales de la enfermedad hepática se produciría un aumento de su liberación desde hepatocitos lesionados.

El principal hallazgo de este estudio es la diferencia en los niveles séricos de miRNAs de la firma en pacientes con cirrosis y ascitis, lo que sugiere su papel como biomarcadores para estadificar la cirrosis descompensada. La ascitis refractaria representa una etapa de mayor gravedad dentro de la cirrosis descompensada con un pronóstico ominoso. Se caracteriza por la presencia de vasodilatación arterial sistémica intensa que desencadena una hiperestimulación simpática que aumenta la función sistólica al límite para lograr un gasto cardíaco que permita mantener la perfusión renal. Las escalas clásicas de función hepática no reflejan la gravedad de la disfunción cardiocirculatoria y la consecuente labilidad de la función renal que presentan estos pacientes (162). A pesar de que presenta una situación hemodinámica propia y diferente a otras fases de la enfermedad, a día de hoy su diagnóstico atiende a una definición establecida por consenso de expertos en base a la respuesta a tratamiento diurético (161, 201). En esta cohorte, no hubo diferencias en las escalas Child-Pugh y MELD entre pacientes con ascitis refractaria y ascitis sensible a diuréticos, pero miR-181b-5p presentó niveles significativamente más altos en pacientes con ascitis refractaria comparado con pacientes con ascitis sensible a diuréticos, con un AUC de 0,77 para identificar este subgrupo de pacientes. Es más, los niveles séricos de este miRNAs se correlacionaron con parámetros de función renal como son la creatinina sérica y la cistatina C en los pacientes con ascitis refractaria. Los trastornos de la función renal y la retención de sodio y agua que conduce a una expansión del volumen extracelular son clave en la fisiopatología de la ascitis refractaria. Estas diferencias en los niveles séricos de miR-181b-5p en pacientes con ascitis refractaria apoyaría el trasfondo fisiopatológico distintivo que subyace a la diferenciación clínica clásica de los dos subgrupos de pacientes con cirrosis y ascitis. Asimismo, objetivamos niveles séricos superiores de miR-452-5p y miR-885-5p en pacientes con mayor vasodilatación arterial periférica (menores resistencias arteriales sistémicas), lo que sugiere la capacidad de estos miRNAs para identificar a los pacientes con disfunción circulatoria más grave. Es interesante destacar que la gravedad de la vasodilatación periférica se ha relacionado con la reducción de la función sistólica inducida por BBNS en pacientes con ascitis refractaria (162). En esta cohorte, los niveles séricos basales de estos dos miRNAs se correlacionaron no solo con el grado de vasodilatación periférica sino también con la caída de la función sistólica estimada por EIVPD tras tratamiento con BBNS en el grupo de pacientes con ascitis refractaria.

Por otra parte, se evaluó el papel de la firma de miRNAs para predecir el desarrollo de respuesta hemodinámica con tratamiento BBNS. Los BBNS no solo son el pilar del tratamiento para prevenir la hemorragia relacionada con la hipertensión portal, sino que han demostrado importantes beneficios en términos de prevenir la progresión de la enfermedad hepática e incluso de mejorar a supervivencia. Estos beneficios acontecen principalmente cuando se alcanza una reducción del GPVH  $\geq 10\%$ , que ocurre en el 40-60% de los pacientes (154, 180, 183, 184). La medición del GPVH es un procedimiento invasivo y no ampliamente disponible por lo que no se realiza en práctica clínica de forma rutinaria. No se dispone en la actualidad de alternativas no invasivas óptimas que permitan determinar qué pacientes desarrollan respuesta hemodinámica a BBNS y plantear de forma individualizada otras opciones terapéuticas en pacientes no respondedores. Los niveles séricos basales de miR-452-5p y miR-429 se correlacionaron de forma significativa con el desarrollo de respuesta hemodinámica con tratamiento BBNS, de forma que los pacientes respondedores hemodinámicos presentaron niveles basales menores. Ello sugiere la potencial utilidad pronóstica de estos miRNAs circulantes para identificar, antes de iniciar el tratamiento, aquellos pacientes con cirrosis descompensada más proclives a desarrollar hemodinámicos. El empleo de miRNAs circulantes para evaluar la respuesta a BBNS se ha explorado previamente en el contexto de la hipertensión arterial. Así, los niveles de miR-19a, miR-101 y let-7e, que regulan los receptores  $\beta 1$ -adrenérgicos y otros genes relacionados con la farmacodinamia de estos fármacos, se han asociado con la respuesta antihipertensiva (205).

Asimismo, en pacientes con cirrosis avanzada, particularmente con ascitis refractaria, los BBNS provocan una reducción de la función sistólica con la consecuente reducción de la presión de perfusión renal, lo que podría mermar su supervivencia. En esta cohorte, los niveles séricos basales de miR-452-5p y miR-885-5p, que se correlacionaron con la magnitud del deterioro hemodinámico en los pacientes con ascitis refractaria, se relacionaron también con la reducción de la función sistólica cardiaca con BBNS en estos pacientes, por lo que podrían tener una relevante implicación clínica al identificar de forma no invasiva a aquellos pacientes con cirrosis avanzada y disfunción cardiocirculatoria grave en los que los BBNS deberían usarse con precaución o incluso evitarse. Ello permitiría un abordaje terapéutico en consonancia con la llamada "medicina de precisión", en el que el análisis de miRNAs circulantes permitiría adaptar e individualizar el tratamiento a cada paciente, superando el paradigma de un planteamiento uniforme para todos los pacientes y recalcando la importancia de la medicina personalizada vaticinada por Hipócrates de Cos.

Las funciones específicas a nivel intrahepático de varios de los miRNAs integrantes de la firma ha sido estudiada previamente. Así, miR181b-5p se ha implicado en el proceso de fibrogénesis mediante su aumento de expresión en las células estrelladas hepáticas promoviendo su activación y proliferación (206), y miR-429 se ha implicado en la transición epitelio-mesénquima (207). miR-122-5p se expresa de forma selectiva en el hepatocito constituyendo el miRNA más abundante a ese nivel. La disminución de su expresión tanto en el hepatocito como en las células estrelladas hepáticas se ha relacionado con el desarrollo de fibrosis e inflamación, así como el desarrollo de carcinoma hepatocelular (41). Sin embargo, dilucidar el papel de los miRNAs contenidos en vesículas extracelulares



secretadas por el hepatocito, tanto determinar cuál es la célula diana como su función en ella, es mucho más complejo. Además, los mecanismos fisiopatológicos subyacentes en los procesos clínicos abordados como son la ascitis refractaria y la respuesta hemodinámica a BBNS son multifactoriales. Es interesante destacar que los miRNAs que se han postulado en este estudio como posibles biomarcadores para caracterizar la cirrosis descompensada se han asociado previamente con trastornos de la función renal y disfunción cardiocirculatoria, mecanismos implicados en la progresión de la enfermedad hepática crónica avanzada. En este sentido, miR-181b-5p, que discriminó pacientes con ascitis refractaria de ascitis sensible a diuréticos, se ha relacionado a nivel hepático con la proliferación y la activación de células estrelladas hepáticas (89, 208) y con el remodelado cardiovascular (209-211). miR-181b-5p ha demostrado un papel fundamental en la remodelación de la matriz extracelular y la disfunción endotelial en ratones mediante la regulación de la señalización de TGF- $\beta$  en las células lisas, modulando la rigidez vascular, y niveles séricos bajos de este miRNA se han asociado al desarrollo de hipertensión arterial (209). En humanos, se ha objetivado que miR-181b-5p es un regulador crítico relacionado con la progresión de la aterosclerosis y los aneurismas de aorta abdominal (210). miR-181b-5p se ha propuesto como marcador de cirrosis independientemente de la etiología por su asociación con la gravedad de la fibrosis en la enfermedad hepática crónica (90), de progresión de la hepatopatía crónica por VHB (212) y de remodelado cardíaco y disfunción cardíaca en la cardiomiopatía diabética (211). Por otra parte, miR-181b-5p aislado en vesículas extracelulares en muestras de ascitis podría ser útil para discriminar entre ascitis relacionada con la hipertensión portal y ascitis maligna (213).

Por otra parte, cada miRNA puede regular cientos de RNA mensajeros, y varios miRNAs pueden controlar el mismo RNA mensajero. La expresión de los propios miRNAs está regulada por otras especies de ncRNA. Por ello, teniendo en cuenta la complejidad de estas conexiones, es extremadamente difícil predecir de forma precisa las funciones biológicas de un solo miRNA (10, 11). Es más, es probable que el papel de los miRNAs en la modulación de procesos biológicos se desarrolle de forma cooperativa mediante redes de regulación génica más que mediante acciones individuales. Por ello, el análisis de redes se ha convertido en una herramienta útil para comprender mejor las interacciones moleculares de los miRNAs. El análisis bioinformático de predicción de dianas y del potencial significado funcional de los miRNAs reveló su implicación en la respuesta celular a la hipoxia mediante el control de genes críticos en el proceso de muerte celular programada como son BCL2 o XIAP. La hipoxia juega un papel fundamental en la historia natural de la cirrosis hepática, ya que estimula la angiogénesis, inhibe los factores de proliferación celular y promueve la fibrogénesis, contribuyendo a la progresión de la hipertensión portal y al desarrollo de la circulación hiperdinámica (151, 214).

El presente estudio presenta ciertas limitaciones e invita a las siguientes reflexiones:

- En primer lugar, por su naturaleza exploratoria y su reducido tamaño muestral, es necesario que los resultados se validen en cohortes más grandes.
- En segundo lugar, la firma de miRNAs identificada como representativa de los cambios en el secretoma de los hepatocitos de hígados cirróticos se identificó y secuenció a partir de vesículas extracelulares pequeños, mientras que en suero se analizaron miRNAs individuales directamente sin aislar previamente vesículas. Inicialmente se planteó la posibilidad de aislar primero vesículas extracelulares pequeñas en las muestras de suero y luego analizar su contenido en miRNAs. Sin embargo, dado que no se dispone de un método eficiente para la purificación de vesículas extracelulares pequeñas y para evitar perder información, se optó por un enfoque más reproducible y pragmático que no requiere equipos sofisticados y que permitiría un eventual traslado a la práctica clínica. Para ello se aisló todo el contenido de RNA de las muestras de suero, incluyendo el asociado a vesículas extracelulares pequeñas, y posteriormente analizamos los miRNAs individuales.
- Tercero, los miRNAs aislados en circulación proceden de distintos tipos de células y se podría cuestionar que los miRNAs encontrados en el secretoma de los cultivos de hepatocitos primarios podrían diferir de los encontrados en circulación. No obstante, el objetivo del estudio no era dilucidar la fuente celular de los miRNAs circulantes sino explorar su capacidad como biomarcadores en un contexto patológico específico en una muestra de suero.
- Cuarto, tanto los explantes de los que se obtuvieron los hepatocitos para los cultivos como las muestras de suero procedían de pacientes con cirrosis de etiología fundamentalmente enólica, por lo que podría plantearse su aplicabilidad en cirrosis de otras causas. Sin embargo, mientras que en fases iniciales de la hepatopatía crónica la etiología desempeña un papel fundamental en la fisiopatología de la enfermedad, en fases tan avanzadas de la cirrosis es poco probable que suponga un impacto relevante.
- Finalmente, si bien los miRNAs tienen una estabilidad y unas propiedades que los convierten en biomarcadores óptimos, se deben superar varios obstáculos técnicos para que los miRNAs circulantes se trasladen a la práctica clínica. No existe consenso en cuanto a la obtención y preparación de muestras, el método de cuantificación y las técnicas de normalización de datos. La estandarización de protocolos es clave para una adecuada interpretación y generalización de resultados.

## **XI. CONCLUSIONES**

## RESUMEN

- 1) miR-181b-5p presenta niveles séricos significativamente superiores en pacientes con ascitis refractaria comparado con pacientes con ascitis sensible a diuréticos. Asimismo, los niveles séricos de miR-181b-5p se correlacionan con parámetros séricos de función renal (creatinina y cistatina).
- 2) En pacientes con ascitis refractaria, los niveles séricos de miR-452-5p y miR-885-5p se correlacionan con las resistencias arteriales sistémicas y, por tanto, con el grado de vasodilatación arterial periférica que traduce la gravedad de la disfunción circulatoria.
- 3) Los pacientes que desarrollan respuesta hemodinámica al tratamiento con BBNS presentan niveles séricos basales de miR-452-5p y miR-429 significativamente más bajos que los pacientes no respondedores.
- 4) Los niveles séricos basales de miR-452-5p y miR-885-5p, que se correlacionan con la magnitud del deterioro hemodinámico en los pacientes con ascitis refractaria, se relacionan también con la reducción de la función sistólica cardíaca con BBNS en estos pacientes.

## CONCLUSIONES

- 1) Una firma de miRNAs identificada por su expresión diferencial en vesículas extracelulares pequeñas del secretoma de hepatocitos de pacientes con cirrosis descompensada presenta niveles diferentes en suero de pacientes con cirrosis descompensada comparado con controles no cirróticos.
- 2) Esta firma de miRNAs circulantes permite la caracterización molecular de pacientes con cirrosis y ascitis, pudiendo presentar un papel como biomarcador distintivo de la cirrosis descompensada avanzada.
- 3) El análisis de la firma de miRNAs en suero identificó el beneficio y riesgo del tratamiento BBNS en pacientes con cirrosis y ascitis. Por tanto, al anticipar complicaciones, podrían ser biomarcadores de utilidad para un manejo clínico preciso e individualizado, identificando aquellos pacientes con enfermedad hepática más avanzada en los que los BBNS deberían evitarse.

## XII. LÍNEAS DE FUTURO

Este estudio supone una prueba de concepto de la potencial utilidad de los miRNAs como biomarcadores séricos en cirrosis descompensada para identificar las fases más avanzadas de la enfermedad, representadas por la ascitis refractaria, así como la respuesta hemodinámica con tratamiento  $\beta$ -bloqueante no cardiosselectivo y sus posibles efectos deletéreos en estos pacientes. Asimismo, ofrece un abordaje traslacional innovador para la selección de los miRNAs circulantes a estudio.

Sin embargo, es necesario validar su papel predictor de eventos clínicos relevantes en cohortes más amplias de pacientes antes de plantear su implementación en la práctica clínica. Para ello, es crucial avanzar en la estandarización de la metodología de análisis sérico de miRNAs. De confirmarse, su traslado a la clínica como biomarcadores no invasivos permitiría un manejo individualizado de los pacientes con cirrosis hepática y ascitis al identificar aquellos con fases avanzadas de la enfermedad y anticipar la aparición de complicaciones. De igual manera, la validación de estos hallazgos supondría un avance en la monitorización no invasiva de la respuesta hemodinámica al tratamiento  $\beta$ -bloqueante no cardiosselectivo.

Asimismo, la mayoría de los miRNAs que en este estudio se correlacionaron con eventos clínicos se han relacionado previamente con la progresión de la enfermedad hepática crónica a nivel intrahepático y la disfunción cardiocirculatoria. Por ello, estos miRNAs podrían contribuir a la progresión de la cirrosis descompensada. Sin embargo, se requieren estudios funcionales *in vitro* e *in vivo* para evaluar el papel en la patofisiología y progresión de la cirrosis de los miRNAs identificados como biomarcadores.

## XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Crick FH. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol.* 1958; 12:138-63.
2. Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature.* 2011; 470(7333):187-97.
3. Dahariya S, Paddibhatla I, Kumar S, Raghuwanshi S, Palapati A, Gutti RK. Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Mol Immunol.* 2019; 112:82-92.
4. Consortium EP, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature.* 2007; 447(7146):799-816.
5. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol.* 2019; 234(5):5451-65.
6. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004; 5(7):522-31.
7. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(8):509-24.
8. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14(8):475-88.
9. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev.* 2011; 91(3):827-87.
10. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009; 19(1):92-105.
11. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009; 136(2):215-33.
12. 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.
13. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(Database issue):D152-7.
14. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA.* 2003; 9(3):277-9.
15. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker>.
16. Hsu SH, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, et al. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest.* 2012; 122(8):2871-83.
17. Tsang JS, Ebert MS, van Oudenaarden A. Genome-wide dissection of microRNA functions and cotargeting networks using gene set signatures. *Mol Cell.* 2010; 38(1):140-53.
18. Ludwig N, Leidinger P, Becker K, Backes C, Fehlmann T, Pallasch C, et al. Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(8):3865-77.
19. Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, Langthasa M, Rahman M, Bari M, et al. Interplay between miRNAs and human diseases. *J Cell Physiol.* 2018; 233(3):2007-18.
20. Petrovic N, Ergun S. miRNAs as Potential Treatment Targets and Treatment Options in Cancer. *Mol Diagn Ther.* 2018; 22(2):157-68.
21. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008; 18(10):997-1006.



22. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(12):5003-8.
23. Diehl P, Fricke A, Sander L, Stamm J, Bassler N, Htun N, et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res*. 2012; 93(4):633-44.
24. Lemoine S, Thabut D, Housset C, Moreau R, Valla D, Boulanger CM, et al. The emerging roles of microvesicles in liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014; 11(6):350-61.
25. Wang S, Wang JQ, Lv XW. Exosomal miRNAs as biomarkers in the diagnosis of liver disease. *Biomark Med*. 2017; 11(6):491-501.
26. 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.
27. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39(16):7223-33.
28. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci*. 2012; 37(11):460-5.
29. Turchinovich A, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Extracellular miRNA: A Collision of Two Paradigms. *Trends Biochem Sci*. 2016; 41(10):883-92.
30. Iftikhar H, Carney GE. Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs: From expression profiling to functional testing: Potential roles of extracellular miRNAs as indicators of physiological change and as agents of intercellular information exchange. *Bioessays*. 2016; 38(4):367-78.
31. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*. 2012; 22(3):125-32.
32. Guduric-Fuchs J, O'Connor A, Camp B, O'Neill CL, Medina RJ, Simpson DA. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics*. 2012; 13:357.
33. Grasedieck S, Scholer N, Bommer M, Niess JH, Tumani H, Rouhi A, et al. Impact of serum storage conditions on microRNA stability. *Leukemia*. 2012; 26(11):2414-6.
34. Glinge C, Clauss S, Boddum K, Jabbari R, Jabbari J, Risgaard B, et al. Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs - Pre-Analytic Methodological Considerations. *PLoS One*. 2017; 12(2):e0167969.
35. Shigeyasu K, Toden S, Zumwalt TJ, Okugawa Y, Goel A. Emerging Role of MicroRNAs as Liquid Biopsy Biomarkers in Gastrointestinal Cancers. *Clin Cancer Res*. 2017; 23(10):2391-9.
36. Szabo G, Bala S. MicroRNAs in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013; 10(9):542-52.
37. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology*. 2011; 53(1):209-18.
38. Kojima K, Takata A, Vadnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, et al. MicroRNA122 is a key regulator of alpha-fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*. 2011; 2:338.
39. Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB. miR-122--a key factor and therapeutic target in liver disease. *J Hepatol*. 2015; 62(2):448-57.

40. Bala S, Petrasek J, Mundkur S, Catalano D, Levin I, Ward J, et al. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology*. 2012; 56(5):1946-57.
41. Roderburg C, Trautwein C. Cell-specific functions of miRNA in the liver. *J Hepatol*. 2017; 66(3):655-6.
42. Szabo G, Sarnow P, Bala S. MicroRNA silencing and the development of novel therapies for liver disease. *J Hepatol*. 2012; 57(2):462-6.
43. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005; 309(5740):1577-81.
44. Luna JM, Scheel TK, Danino T, Shaw KS, Mele A, Fak JJ, et al. Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122. *Cell*. 2015; 160(6):1099-110.
45. Amador-Canizares Y, Panigrahi M, Huys A, Kunden RD, Adams HM, Schinold MJ, et al. miR-122, small RNA annealing and sequence mutations alter the predicted structure of the Hepatitis C virus 5' UTR RNA to stabilize and promote viral RNA accumulation. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46(18):9776-92.
46. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med*. 2013; 368(18):1685-94.
47. Loyer X, Paradis V, Henique C, Vion AC, Colnot N, Guerin CL, et al. Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting PPARalpha expression. *Gut*. 2016; 65(11):1882-94.
48. Roderburg C, Luedde T. Circulating microRNAs as markers of liver inflammation, fibrosis and cancer. *J Hepatol*. 2014; 61(6):1434-7.
49. Murakami Y, Kawada N. MicroRNAs in hepatic pathophysiology. *Hepatol Res*. 2017; 47(1):60-9.
50. Loosen SH, Schueller F, Trautwein C, Roy S, Roderburg C. Role of circulating microRNAs in liver diseases. *World J Hepatol*. 2017; 9(12):586-94.
51. do Amaral AE, Cisolotto J, Creczynski-Pasa TB, de Lucca Schiavon L. Circulating miRNAs in nontumoral liver diseases. *Pharmacol Res*. 2018; 128:274-87.
52. Roderburg C, Mollnow T, Bongaerts B, Elfimova N, Vargas Cardenas D, Berger K, et al. Micro-RNA profiling in human serum reveals compartment-specific roles of miR-571 and miR-652 in liver cirrhosis. *PLoS One*. 2012; 7(3):e32999.
53. Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, et al. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol Carcinog*. 2011; 50(2):136-42.
54. Zhao XF, Li N, Lin DD, Sun LB. Circulating MicroRNA-122 for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2020; 2020:5353695.
55. Xu Y, Bu X, Dai C, Shang C. High serum microRNA-122 level is independently associated with higher overall survival rate in hepatocellular carcinoma patients. *Tumour Biol*. 2015; 36(6):4773-6.
56. Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012; 56(1):167-75.
57. Ge W, Yu DC, Li QG, Chen X, Zhang CY, Ding YT. Expression of serum miR-16, let-7f, and miR-21 in patients with hepatocellular carcinoma and their clinical significances. *Clin Lab*. 2014; 60(3):427-34.

58. Liu AM, Yao TJ, Wang W, Wong KF, Lee NP, Fan ST, et al. Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. *BMJ Open*. 2012; 2(2):e000825.
59. Sun Q, Li J, Jin B, Wang T, Gu J. Evaluation of miR-331-3p and miR-23b-3p as serum biomarkers for hepatitis c virus-related hepatocellular carcinoma at early stage. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2020; 44(1):21-8.
60. Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2011; 29(36):4781-8.
61. Lin XJ, Chong Y, Guo ZW, Xie C, Yang XJ, Zhang Q, et al. A serum microRNA classifier for early detection of hepatocellular carcinoma: a multicentre, retrospective, longitudinal biomarker identification study with a nested case-control study. *Lancet Oncol*. 2015; 16(7):804-15.
62. Pascut D, Cavalletto L, Pratama MY, Bresolin S, Trentin L, Basso G, et al. Serum miRNA Are Promising Biomarkers for the Detection of Early Hepatocellular Carcinoma after Treatment with Direct-Acting Antivirals. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(11).
63. Bihrer V, Friedrich-Rust M, Kronenberger B, Forestier N, Hauptenthal J, Shi Y, et al. Serum miR-122 as a biomarker of necroinflammation in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol*. 2011; 106(9):1663-9.
64. Kumar S, Chawla YK, Ghosh S, Chakraborti A. Severity of hepatitis C virus (genotype-3) infection positively correlates with circulating microRNA-122 in patients sera. *Dis Markers*. 2014; 2014:435476.
65. Waring JF, Dumas EO, Abel S, Coakley E, Cohen DE, Davis JW, et al. Serum miR-122 may serve as a biomarker for response to direct acting antivirals: effect of paritaprevir/R with dasabuvir or ombitasvir on miR-122 in HCV-infected subjects. *J Viral Hepat*. 2016; 23(2):96-104.
66. Bala S, Tilahun Y, Taha O, Alao H, Kodys K, Catalano D, et al. Increased microRNA-155 expression in the serum and peripheral monocytes in chronic HCV infection. *J Transl Med*. 2012; 10:151.
67. 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.
68. Bihrer V, Waidmann O, Friedrich-Rust M, Forestier N, Susser S, Hauptenthal J, et al. Serum microRNA-21 as marker for necroinflammation in hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2011; 6(10):e26971.
69. Xing TJ, Jiang DF, Huang JX, Xu ZL. Expression and clinical significance of miR-122 and miR-29 in hepatitis B virus-related liver disease. *Genet Mol Res*. 2014; 13(3):7912-8.
70. Winther TN, Bang-Berthelsen CH, Heiberg IL, Pociot F, Hogh B. Differential plasma microRNA profiles in HBeAg positive and HBeAg negative children with chronic hepatitis B. *PLoS One*. 2013; 8(3):e58236.
71. Orr C, Myers R, Li B, Jiang Z, Flaherty J, Gaggar A, et al. Longitudinal analysis of serum microRNAs as predictors of cirrhosis regression during treatment of hepatitis B virus infection. *Liver Int*. 2020; 40(7):1693-700.
72. Liu CH, Ampuero J, Gil-Gomez A, Montero-Vallejo R, Rojas A, Munoz-Hernandez R, et al. miRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2018; 69(6):1335-48.

73. 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.
74. Ninomiya M, Kondo Y, Funayama R, Nagashima T, Kogure T, Kakazu E, et al. Distinct microRNAs expression profile in primary biliary cirrhosis and evaluation of miR 505-3p and miR197-3p as novel biomarkers. *PLoS One*. 2013; 8(6):e66086.
75. Tan Y, Pan T, Ye Y, Ge G, Chen L, Wen D, et al. Serum microRNAs as potential biomarkers of primary biliary cirrhosis. *PLoS One*. 2014; 9(10):e111424.
76. Voigtlander T, Gupta SK, Thum S, Fendrich J, Manns MP, Lankisch TO, et al. MicroRNAs in Serum and Bile of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis and/or Cholangiocarcinoma. *PLoS One*. 2015; 10(10):e0139305.
77. Migita K, Komori A, Kozuru H, Jiuchi Y, Nakamura M, Yasunami M, et al. Circulating microRNA Profiles in Patients with Type-1 Autoimmune Hepatitis. *PLoS One*. 2015; 10(11):e0136908.
78. 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.
79. Ward J, Kanchagar C, Veksler-Lublinsky I, Lee RC, McGill MR, Jaeschke H, et al. Circulating microRNA profiles in human patients with acetaminophen hepatotoxicity or ischemic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(33):12169-74.
80. Yang X, Salminen WF, Shi Q, Greenhaw J, Gill PS, Bhattacharyya S, et al. Potential of extracellular microRNAs as biomarkers of acetaminophen toxicity in children. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015; 284(2):180-7.
81. 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 Int*. 2017; 37(5):757-64.
82. John K, Hadem J, Krech T, Wahl K, Manns MP, Dooley S, et al. MicroRNAs play a role in spontaneous recovery from acute liver failure. *Hepatology*. 2014; 60(4):1346-55.
83. Blaya D, Coll M, Rodrigo-Torres D, Vila-Casadesus M, Altamirano J, Llopis M, et al. Integrative microRNA profiling in alcoholic hepatitis reveals a role for microRNA-182 in liver injury and inflammation. *Gut*. 2016; 65(9):1535-45.
84. Cabral BCA, Hoffmann L, Bottaro T, Costa PF, Ramos ALA, Coelho HSM, et al. Circulating microRNAs associated with liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Biochem Biophys Rep*. 2020; 24:100814.
85. He Y, Huang C, Zhang SP, Sun X, Long XR, Li J. The potential of microRNAs in liver fibrosis. *Cell Signal*. 2012; 24(12):2268-72.
86. Trebicka J, Anadol E, Elfimova N, Strack I, Roggendorf M, Viazov S, et al. Hepatic and serum levels of miR-122 after chronic HCV-induced fibrosis. *J Hepatol*. 2013; 58(2):234-9.
87. El-Ahwany E, Nagy F, Zoheiry M, Shemis M, Nosseir M, Taleb HA, et al. Circulating miRNAs as Predictor Markers for Activation of Hepatic Stellate Cells and Progression of HCV-Induced Liver Fibrosis. *Electron Physician*. 2016; 8(1):1804-10.
88. Lambrecht J, Verhulst S, Reynaert H, van Grunsven LA. The miRFIB-Score: A Serological miRNA-Based Scoring Algorithm for the Diagnosis of Significant Liver Fibrosis. *Cells*. 2019; 8(9).

89. Wang B, Li W, Guo K, Xiao Y, Wang Y, Fan J. miR-181b promotes hepatic stellate cells proliferation by targeting p27 and is elevated in the serum of cirrhosis patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 421(1):4-8.
90. Chen YJ, Zhu JM, Wu H, Fan J, Zhou J, Hu J, et al. Circulating microRNAs as a Fingerprint for Liver Cirrhosis. *PLoS One.* 2013; 8(6):e66577.
91. Jiang S, Jiang W, Xu Y, Wang X, Mu Y, Liu P. Serum miR-21 and miR-26a Levels Negatively Correlate with Severity of Cirrhosis in Patients with Chronic Hepatitis B. *Microna.* 2019; 8(1):86-92.
92. Waidmann O, Koberle V, Brunner F, Zeuzem S, Piiper A, Kronenberger B. Serum microRNA-122 predicts survival in patients with liver cirrhosis. *PLoS One.* 2012; 7(9):e45652.
93. Amaral AED, Rode MP, Cisilotto J, Silva TED, Fischer J, Mاتيollo C, et al. MicroRNA profiles in serum samples from patients with stable cirrhosis and miRNA-21 as a predictor of transplant-free survival. *Pharmacol Res.* 2018; 134:179-92.
94. Lutz P, M MH, Pohlmann A, Lehmann J, Jansen C, Schierwagen R, et al. MicroRNA-155 is upregulated in ascites in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Sci Rep.* 2017; 7:40556.
95. Jansen C, Eiseheid H, Goertzen J, Schierwagen R, Anadol E, Strassburg CP, et al. The role of miRNA-34a as a prognostic biomarker for cirrhotic patients with portal hypertension receiving TIPS. *PLoS One.* 2014; 9(7):e103779.
96. Song G, Jia H, Xu H, Liu W, Zhu H, Li S, et al. Studying the association of microRNA-210 level with chronic hepatitis B progression. *J Viral Hepat.* 2014; 21(4):272-80.
97. Zheng QF, Zhang JY, Wu JS, Zhang Y, Liu M, Bai L, et al. Upregulation of miRNA-130a Represents Good Prognosis in Patients With HBV-Related Acute-on-Chronic Liver Failure: A Prospective Study. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(6):e2639.
98. Cisilotto J, do Amaral AE, Rosolen D, Rode MP, Silva AH, Winter E, et al. MicroRNA profiles in serum samples from Acute-On-Chronic Liver Failure patients and miR-25-3p as a potential biomarker for survival prediction. *Sci Rep.* 2020; 10(1):100.
99. Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One.* 2012; 7(7):e41561.
100. Farid WR, Pan Q, van der Meer AJ, de Ruiter PE, Ramakrishnaiah V, de Jonge J, et al. Hepatocyte-derived microRNAs as serum biomarkers of hepatic injury and rejection after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2012; 18(3):290-7.
101. Salehi S, Tavabie OD, Verma S, McPhail MJW, Farzaneh F, Bernal W, et al. Serum MicroRNA Signatures in Recovery From Acute and Chronic Liver Injury and Selection for Liver Transplantation. *Liver Transpl.* 2020; 26(6):811-22.
102. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell.* 1983; 33(3):967-78.
103. Lasser C, Jang SC, Lotvall J. Subpopulations of extracellular vesicles and their therapeutic potential. *Mol Aspects Med.* 2018; 60:1-14.
104. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood.* 1999; 94(11):3791-9.
105. Yu X, Odenthal M, Fries JW. Exosomes as miRNA Carriers: Formation-Function-Future. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(12).

106. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ Res*. 2017; 120(10):1632-48.
107. Eguchi A, Kostallari E, Feldstein AE, Shah VH. Extracellular vesicles, the liquid biopsy of the future. *J Hepatol*. 2019; 70(6):1292-4.
108. They C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018; 7(1):1535750.
109. Thietart S, Rautou PE. Extracellular vesicles as biomarkers in liver diseases: A clinician's point of view. *J Hepatol*. 2020; 73(6):1507-25.
110. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015; 13(1):17-24.
111. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007; 9(6):654-9.
112. Rautou PE, Bresson J, Sainte-Marie Y, Vion AC, Paradis V, Renard JM, et al. Abnormal plasma microparticles impair vasoconstrictor responses in patients with cirrhosis. *Gastroenterology*. 2012; 143(1):166-76 e6.
113. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*. 2010; 285(23):17442-52.
114. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018; 19(4):213-28.
115. Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A, et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2014; 26(5):707-21.
116. Zhang L, Zhang S, Yao J, Lowery FJ, Zhang Q, Huang WC, et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature*. 2015; 527(7576):100-4.
117. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*. 2008; 3(11):e3694.
118. Rekker K, Saare M, Roost AM, Kubo AL, Zarovni N, Chiesi A, et al. Comparison of serum exosome isolation methods for microRNA profiling. *Clin Biochem*. 2014; 47(1-2):135-8.
119. Mateescu B, Kowal EJ, van Balkom BW, Bartel S, Bhattacharyya SN, Buzas EI, et al. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles*. 2017; 6(1):1286095.
120. Ramirez MI, Amorim MG, Gadelha C, Milic I, Welsh JA, Freitas VM, et al. Technical challenges of working with extracellular vesicles. *Nanoscale*. 2018; 10(3):881-906.
121. Matsuura K, De Giorgi V, Schechterly C, Wang RY, Farci P, Tanaka Y, et al. Circulating let-7 levels in plasma and extracellular vesicles correlate with hepatic fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2016; 64(3):732-45.
122. Andreu Z, Rivas E, Sanguino-Pascual A, Lamana A, Marazuela M, Gonzalez-Alvaro I, et al. Comparative analysis of EV isolation procedures for miRNAs detection in serum samples. *J Extracell Vesicles*. 2016; 5:31655.

123. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013; 2.
124. Hirsova P, Ibrahim SH, Verma VK, Morton LA, Shah VH, LaRusso NF, et al. Extracellular vesicles in liver pathobiology: Small particles with big impact. *Hepatology*. 2016; 64(6):2219-33.
125. Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, Yoshioka Y, et al. Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease. *PLoS One*. 2012; 7(10):e48366.
126. Szabo G, Momen-Heravi F. Extracellular vesicles in liver disease and potential as biomarkers and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017; 14(8):455-66.
127. Wang W, Li H, Zhou Y, Jie S. Peripheral blood microvesicles are potential biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomark*. 2013; 13(5):351-7.
128. Wang H, Hou L, Li A, Duan Y, Gao H, Song X. Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:864894.
129. Li H, Sun L, Chen X, Xiong W, Hu D, Jie S. Microvesicle microRNA profiles and functional roles between chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Clin Transl Oncol*. 2014; 16(3):315-21.
130. Sohn W, Kim J, Kang SH, Yang SR, Cho JY, Cho HC, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med*. 2015; 47:e184.
131. Sugimachi K, Matsumura T, Hirata H, Uchi R, Ueda M, Ueo H, et al. Identification of a bona fide microRNA biomarker in serum exosomes that predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. *Br J Cancer*. 2015; 112(3):532-8.
132. Itami-Matsumoto S, Hayakawa M, Uchida-Kobayashi S, Enomoto M, Tamori A, Mizuno K, et al. Circulating Exosomal miRNA Profiles Predict the Occurrence and Recurrence of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Direct-Acting Antiviral-Induced Sustained Viral Response. *Biomedicines*. 2019; 7(4).
133. Jiao X, Fan Z, Chen H, He P, Li Y, Zhang Q, et al. Serum and exosomal miR-122 and miR-199a as a biomarker to predict therapeutic efficacy of hepatitis C patients. *J Med Virol*. 2017; 89(9):1597-605.
134. Kornek M, Lynch M, Mehta SH, Lai M, Exley M, Afdhal NH, et al. Circulating microparticles as disease-specific biomarkers of severity of inflammation in patients with hepatitis C or nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2012; 143(2):448-58.
135. Lee YS, Kim SY, Ko E, Lee JH, Yi HS, Yoo YJ, et al. Exosomes derived from palmitic acid-treated hepatocytes induce fibrotic activation of hepatic stellate cells. *Sci Rep*. 2017; 7(1):3710.
136. Stravitz RT, Bowling R, Bradford RL, Key NS, Glover S, Thacker LR, et al. Role of procoagulant microparticles in mediating complications and outcome of acute liver injury/acute liver failure. *Hepatology*. 2013; 58(1):304-13.
137. Momen-Heravi F, Saha B, Kodys K, Catalano D, Satishchandran A, Szabo G. Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcoholic hepatitis. *J Transl Med*. 2015; 13:261.
138. Bissonnette J, Altamirano J, Devue C, Roux O, Payance A, Lebrec D, et al. A prospective study of the utility of plasma biomarkers to diagnose alcoholic hepatitis. *Hepatology*. 2017; 66(2):555-63.

139. Chen L, Charrier A, Zhou Y, Chen R, Yu B, Agarwal K, et al. Epigenetic regulation of connective tissue growth factor by MicroRNA-214 delivery in exosomes from mouse or human hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2014; 59(3):1118-29.
140. Povero D, Panera N, Eguchi A, Johnson CD, Papouchado BG, de Araujo Horcel L, et al. Lipid-induced hepatocyte-derived extracellular vesicles regulate hepatic stellate cell via microRNAs targeting PPAR-gamma. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015; 1(6):646-63 e4.
141. Witek RP, Yang L, Liu R, Jung Y, Omenetti A, Syn WK, et al. Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells. *Gastroenterology*. 2009; 136(1):320-30 e2.
142. Lemoine S, Cadoret A, Rautou PE, El Mourabit H, Ratziu V, Corpechot C, et al. Portal myofibroblasts promote vascular remodeling underlying cirrhosis formation through the release of microparticles. *Hepatology*. 2015; 61(3):1041-55.
143. Payance A, Silva-Junior G, Bissonnette J, Tanguy M, Pasquet B, Levi C, et al. Hepatocyte microvesicle levels improve prediction of mortality in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2018; 68(4):1508-18.
144. Engelmann C, Splith K, Krohn S, Herber A, Boehlig A, Boehm S, et al. Absolute quantification of microparticles by flow cytometry in ascites of patients with decompensated cirrhosis: a cohort study. *J Transl Med*. 2017; 15(1):188.
145. Collaborators GBDC. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020; 5(3):245-66.
146. 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. *J Hepatol*. 2013; 58(3):593-608.
147. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol*. 2006; 44(1):217-31.
148. Garcia-Pagan JC, Gracia-Sancho J, Bosch J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *J Hepatol*. 2012; 57(2):458-61.
149. Ripoll C, Groszmann R, Garcia-Tsao G, Grace N, Burroughs A, Planas R, et al. Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology*. 2007; 133(2):481-8.
150. Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology*. 2010; 51(4):1445-9.
151. Fernandez M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol*. 2009; 50(3):604-20.
152. Moller S, Bendtsen F. The pathophysiology of arterial vasodilatation and hyperdynamic circulation in cirrhosis. *Liver Int*. 2018; 38(4):570-80.
153. Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology*. 1994; 20(5):1359-63.
154. Villanueva C, Albillos A, Genesca J, Abraldes JG, Calleja JL, Aracil C, et al. Development of hyperdynamic circulation and response to beta-blockers in compensated cirrhosis with portal hypertension. *Hepatology*. 2016; 63(1):197-206.



155. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodes J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology*. 1988; 8(5):1151-7.
156. Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology*. 2006; 43(2 Suppl 1):S121-31.
157. Stadlbauer V, Wright GA, Banaji M, Mukhopadhy A, Mookerjee RP, Moore K, et al. Relationship between activation of the sympathetic nervous system and renal blood flow autoregulation in cirrhosis. *Gastroenterology*. 2008; 134(1):111-9.
158. Bernardi M, Moreau R, Angeli P, Schnabl B, Arroyo V. Mechanisms of decompensation and organ failure in cirrhosis: From peripheral arterial vasodilation to systemic inflammation hypothesis. *J Hepatol*. 2015; 63(5):1272-84.
159. Gines P, Quintero E, Arroyo V, Teres J, Bruguera M, Rimola A, et al. Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology*. 1987; 7(1):122-8.
160. Planas R, Montoliu S, Balleste B, Rivera M, Miquel M, Masnou H, et al. Natural history of patients hospitalized for management of cirrhotic ascites. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006; 4(11):1385-94.
161. European Association for the Study of the Liver. Electronic address eee, European Association for the Study of the L. EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *J Hepatol*. 2018; 69(2):406-60.
162. Tellez L, Ibanez-Samaniego L, Perez Del Villar C, Yotti R, Martinez J, Carrion L, et al. Non-selective beta-blockers impair global circulatory homeostasis and renal function in cirrhotic patients with refractory ascites. *J Hepatol*. 2020.
163. Moreau R, Delegeue P, Pessione F, Hillaire S, Durand F, Lebrech D, et al. Clinical characteristics and outcome of patients with cirrhosis and refractory ascites. *Liver Int*. 2004; 24(5):457-64.
164. Salerno F, Guevara M, Bernardi M, Moreau R, Wong F, Angeli P, et al. Refractory ascites: pathogenesis, definition and therapy of a severe complication in patients with cirrhosis. *Liver Int*. 2010; 30(7):937-47.
165. Adebayo D, Neong SF, Wong F. Refractory Ascites in Liver Cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2019; 114(1):40-7.
166. Moller S, Henriksen JH. Cirrhotic cardiomyopathy. *J Hepatol*. 2010; 53(1):179-90.
167. Izzy M, VanWagner LB, Lin G, Altieri M, Findlay JY, Oh JK, et al. Redefining Cirrhotic Cardiomyopathy for the Modern Era. *Hepatology*. 2020; 71(1):334-45.
168. Yotti R, Bermejo J, Benito Y, Sanz-Ruiz R, Ripoll C, Martinez-Legazpi P, et al. Validation of noninvasive indices of global systolic function in patients with normal and abnormal loading conditions: a simultaneous echocardiography pressure-volume catheterization study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014; 7(1):164-72.
169. Yotti R, Ripoll C, Benito Y, Catalina MV, Elizaga J, Rincon D, et al. Left ventricular systolic function is associated with sympathetic nervous activity and markers of inflammation in cirrhosis. *Hepatology*. 2017; 65(6):2019-30.
170. Lebrech D, Nouel O, Corbic M, Benhamou JP. Propranolol--a medical treatment for portal hypertension? *Lancet*. 1980; 2(8187):180-2.
171. Lebrech D, Poynard T, Hillon P, Benhamou JP. Propranolol for prevention of recurrent gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis: a controlled study. *N Engl J Med*. 1981; 305(23):1371-4.

172. Pascal JP, Cales P. Propranolol in the prevention of first upper gastrointestinal tract hemorrhage in patients with cirrhosis of the liver and esophageal varices. *N Engl J Med*. 1987; 317(14):856-61.
173. Albillos A, Zamora J, Martinez J, Arroyo D, Ahmad I, De-la-Pena J, et al. Stratifying risk in the prevention of recurrent variceal hemorrhage: Results of an individual patient meta-analysis. *Hepatology*. 2017; 66(4):1219-31.
174. D'Amico G, Garcia-Pagan JC, Luca A, Bosch J. Hepatic vein pressure gradient reduction and prevention of variceal bleeding in cirrhosis: a systematic review. *Gastroenterology*. 2006; 131(5):1611-24.
175. Rodrigues SG, Mendoza YP, Bosch J. Beta-blockers in cirrhosis: Evidence-based indications and limitations. *JHEP Rep*. 2020; 2(1):100063.
176. de Franchis R, Baveno VIF. Expanding consensus in portal hypertension: Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J Hepatol*. 2015; 63(3):743-52.
177. Senzolo M, Cholongitas E, Burra P, Leandro G, Thalheimer U, Patch D, et al. beta-Blockers protect against spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients: a meta-analysis. *Liver Int*. 2009; 29(8):1189-93.
178. Reiberger T, Ferlitsch A, Payer BA, Mandorfer M, Heinisch BB, Hayden H, et al. Non-selective betablocker therapy decreases intestinal permeability and serum levels of LBP and IL-6 in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2013; 58(5):911-21.
179. Thiele M, Albillos A, Abazi R, Wiest R, Gluud LL, Krag A. Non-selective beta-blockers may reduce risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of randomized trials. *Liver Int*. 2015; 35(8):2009-16.
180. Villanueva C, Albillos A, Genesca J, Garcia-Pagan JC, Calleja JL, Aracil C, et al. beta blockers to prevent decompensation of cirrhosis in patients with clinically significant portal hypertension (PREDESCI): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 2019; 393(10181):1597-608.
181. Abraldes JG, Tarantino I, Turnes J, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and long-term prognosis of cirrhosis. *Hepatology*. 2003; 37(4):902-8.
182. Bosch J, Abraldes JG, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC. The clinical use of HVPG measurements in chronic liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009; 6(10):573-82.
183. Villanueva C, Aracil C, Colomo A, Hernandez-Gea V, Lopez-Balaguer JM, Alvarez-Urturi C, et al. Acute hemodynamic response to beta-blockers and prediction of long-term outcome in primary prophylaxis of variceal bleeding. *Gastroenterology*. 2009; 137(1):119-28.
184. Hernandez-Gea V, Aracil C, Colomo A, Garupera I, Poca M, Torras X, et al. Development of ascites in compensated cirrhosis with severe portal hypertension treated with beta-blockers. *Am J Gastroenterol*. 2012; 107(3):418-27.
185. Turco L, Villanueva C, La Mura V, Garcia-Pagan JC, Reiberger T, Genesca J, et al. Lowering Portal Pressure Improves Outcomes of Patients With Cirrhosis, With or Without Ascites: A Meta-Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020; 18(2):313-27 e6.
186. Albillos A, Banares R, Gonzalez M, Ripoll C, Gonzalez R, Catalina MV, et al. Value of the hepatic venous pressure gradient to monitor drug therapy for portal hypertension: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2007; 102(5):1116-26.

187. Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace ND, Burroughs AK, Planas R, et al. Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*. 2005; 353(21):2254-61.
188. Villanueva C, Graupera I, Aracil C, Alvarado E, Minana J, Puente A, et al. A randomized trial to assess whether portal pressure guided therapy to prevent variceal rebleeding improves survival in cirrhosis. *Hepatology*. 2017; 65(5):1693-707.
189. Serste T, Melot C, Francoz C, Durand F, Rautou PE, Valla D, et al. Deleterious effects of beta-blockers on survival in patients with cirrhosis and refractory ascites. *Hepatology*. 2010; 52(3):1017-22.
190. Krag A, Wiest R, Albillos A, Gluud LL. The window hypothesis: haemodynamic and non-haemodynamic effects of beta-blockers improve survival of patients with cirrhosis during a window in the disease. *Gut*. 2012; 61(7):967-9.
191. Wong RJ, Robinson A, Ginzberg D, Gomes C, Liu B, Bhuket T. Assessing the safety of beta-blocker therapy in cirrhosis patients with ascites: A meta-analysis. *Liver Int*. 2019; 39(6):1080-8.
192. Giannelli V, Roux O, Laouenan C, Manchon P, Ausloos F, Bachelet D, et al. Impact of cardiac function, refractory ascites and beta blockers on the outcome of patients with cirrhosis listed for liver transplantation. *J Hepatol*. 2020; 72(3):463-71.
193. Ortega-Ribera M, Fernandez-Iglesias A, Illa X, Moya A, Molina V, Maeso-Diaz R, et al. Resemblance of the human liver sinusoid in a fluidic device with biomedical and pharmaceutical applications. *Biotechnol Bioeng*. 2018; 115(10):2585-94.
194. They C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006; Chapter 3:Unit 3 22.
195. Gracia-Sancho J, Manicardi N, Ortega-Ribera M, Maeso-Diaz R, Guixe-Muntet S, Fernandez-Iglesias A, et al. Emericasan Ameliorates Portal Hypertension and Liver Fibrosis in Cirrhotic Rats Through a Hepatocyte-Mediated Paracrine Mechanism. *Hepatol Commun*. 2019; 3(7):987-1000.
196. Royo F, Moreno L, Mleczko J, Palomo L, Gonzalez E, Cabrera D, et al. Hepatocyte-secreted extracellular vesicles modify blood metabolome and endothelial function by an arginase-dependent mechanism. *Sci Rep*. 2017; 7:42798.
197. Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreassen D, Mouritzen P, Wrang Teilmum M, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*. 2013; 59(1):S1-6.
198. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*. 2008; 14(5):844-52.
199. Qureshi R, Sacan A. A novel method for the normalization of microRNA RT-PCR data. *BMC Med Genomics*. 2013; 6 Suppl 1:S14.
200. Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, Pantel K. Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem*. 2015; 61(11):1333-42.
201. Moore KP, Wong F, Gines P, Bernardi M, Ochs A, Salerno F, et al. The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. *Hepatology*. 2003; 38(1):258-66.

202. Yotti R, Bermejo J, Antoranz JC, Rojo-Alvarez JL, Allue C, Silva J, et al. Noninvasive assessment of ejection intraventricular pressure gradients. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43(9):1654-62.
203. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. 2012; 16(5):284-7.
204. Andres-Leon E, Gonzalez Pena D, Gomez-Lopez G, Pisano DG. miRGate: a curated database of human, mouse and rat miRNA-mRNA targets. *Database (Oxford)*. 2015; 2015:bav035.
205. Solayman MH, Langae TY, Gong Y, Shahin MH, Turner ST, Chapman AB, et al. Effect of plasma MicroRNA on antihypertensive response to beta blockers in the Pharmacogenomic Evaluation of Antihypertensive Responses (PEAR) studies. *Eur J Pharm Sci*. 2019; 131:93-8.
206. Zheng J, Wu C, Xu Z, Xia P, Dong P, Chen B, et al. Hepatic stellate cell is activated by microRNA-181b via PTEN/Akt pathway. *Mol Cell Biochem*. 2015; 398(1-2):1-9.
207. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol*. 2008; 10(5):593-601.
208. Yu F, Lu Z, Chen B, Dong P, Zheng J. Identification of a Novel lincRNA-p21-miR-181b-PTEN Signaling Cascade in Liver Fibrosis. *Mediators Inflamm*. 2016; 2016:9856538.
209. Hori D, Dunkerly-Eyring B, Nomura Y, Biswas D, Steppan J, Henao-Mejia J, et al. miR-181b regulates vascular stiffness age dependently in part by regulating TGF-beta signaling. *PLoS One*. 2017; 12(3):e0174108.
210. Di Gregoli K, Mohamad Anuar NN, Bianco R, White SJ, Newby AC, George SJ, et al. MicroRNA-181b Controls Atherosclerosis and Aneurysms Through Regulation of TIMP-3 and Elastin. *Circ Res*. 2017; 120(1):49-65.
211. Copier CU, Leon L, Fernandez M, Contador D, Calligaris SD. Circulating miR-19b and miR-181b are potential biomarkers for diabetic cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2017; 7(1):13514.
212. Yu F, Zhou G, Li G, Chen B, Dong P, Zheng J. Serum miR-181b Is Correlated with Hepatitis B Virus Replication and Disease Progression in Chronic Hepatitis B Patients. *Dig Dis Sci*. 2015; 60(8):2346-52.
213. Yun J, Han SB, Kim HJ, Go SI, Lee WS, Bae WK, et al. Exosomal miR-181b-5p Downregulation in Ascites Serves as a Potential Diagnostic Biomarker for Gastric Cancer-associated Malignant Ascites. *J Gastric Cancer*. 2019; 19(3):301-14.
214. Wilson GK, Tennant DA, McKeating JA. Hypoxia inducible factors in liver disease and hepatocellular carcinoma: current understanding and future directions. *J Hepatol*. 2014; 61(6):1397-406.

## **XIV. GLOSARIO DE TÉRMINOS**

**Ascitis:** acumulación de líquido en la cavidad peritoneal.

**Ascitis refractaria:** ascitis que no se puede movilizar o que reaparece precozmente tras evacuarla (menos de cuatro semanas) a pesar de tratamiento médico adecuado (dieta pobre en sal y diuréticos). Se diferencian dos formas: 1) ascitis resistente a tratamiento con diuréticos, aquella que no responde a dosis máximas de diuréticos y restricción de sodio, y 2) ascitis intratable por aparición de efectos adversos (encefalopatía hepática, deterioro de la función renal o alteraciones iónicas) que limitan el empleo de una dosis eficaz de diuréticos.

**Ascitis sensible a diuréticos:** ascitis moderada o grave que se consigue movilizar sin complicaciones con tratamiento diurético y dieta pobre en sal. Se excluye la ascitis leve (solo identificable mediante pruebas de imagen).

**$\beta$ -bloqueantes no cardioselectivos (BBNS):** fármacos que permiten el descenso de la presión arterial y portal a través del bloqueo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Son el propranolol, nadolol, timolol, sotalol, carvedilol y labetalol.

**Cardiomiopatía cirrótica:** disfunción cardíaca crónica que se desarrolla en el seno de la cirrosis establecida de cualquier etiología en ausencia de otras causas de cardiopatía. Implica una respuesta contráctil ventricular reducida o insuficiente ante determinados estímulos.

**Child-Pugh:** escala de estadificación para evaluar el pronóstico de la cirrosis hepática basada en cinco criterios clínicos (bilirrubina sérica, albúmina sérica, INR, ascitis y encefalopatía hepática). Cada criterio se mide del 1-3, siendo el número 3 el que indica el daño más grave.

**Circulación hiperdinámica:** situación clínica caracterizada por un aumento de la frecuencia cardíaca, disminución de la resistencia arterial sistémica y aumento del gasto cardíaco con el fin de mantener una adecuada perfusión tisular.

**Cirrosis hepática:** etapa final común a toda enfermedad hepática crónica caracterizada por la existencia de fibrosis y nódulos regenerativos, que provoca cambios en la estructura y función del hígado.

**Diferencia pico de presión de eyección intraventricular (EIVPD, del inglés *ejection intraventricular pressure difference*):** parámetro ecocardiográfico basado en la dinámica de fluidos. Se calcula como la diferencia máxima entre la presión en el ápex ventricular y el tracto de salida del ventrículo izquierdo.

**Derivación portal percutánea intrahepática (DPPI):** creación de una comunicación entre la vena porta y una de las venas suprahepáticas mediante la implantación de una prótesis metálica. Permite el descenso de la presión portal y es un tratamiento de la hemorragia varicosa o la ascitis refractaria.

**Encefalopatía hepática:** disfunción cerebral potencialmente reversible ocasionada por la incapacidad del hígado para eliminar toxinas del torrente sanguíneo que acontece en contexto de hipertensión portal.

**Epigenética:** estudio de modificaciones en la expresión de genes que no obedecen a una alteración de la secuencia del DNA.

**Exosoma:** tipo de vesícula extracelular pequeña.

**Gasto cardíaco:** cantidad de sangre impulsada por los ventrículos por cada minuto.

**Gradiente de presión venosa hepática (GPVH):** diferencia entre la presión libre y de enclavamiento medida en una de las venas suprahepáticas. Es la mejor estimación del grado de hipertensión portal en pacientes con cirrosis de origen intrahepático.

**Hipertensión portal:** elevación de la presión en el sistema venoso portal. Acontece cuando el GPVH es igual o mayor a 6 mmHg.

**Hipertensión portal clínicamente significativa:** GPVH igual o mayor a 10 mmHg.

**MELD (del inglés, *model for end-stage liver disease*):** escala de función hepática basada un sistema de puntuación para medir la gravedad de la cirrosis hepática a través de tres valores analíticos: creatinina sérica, INR y bilirrubina plasmática. Es utilizado para establecer la prioridad en la lista de espera de trasplante hepático.

**MELD-sodio:** escala de función hepática que incorpora el sodio plasmático al modelo MELD.

**Microarray:** técnica para estudiar la expresión de muchos genes a la vez. Consiste en colocar miles de secuencias génicas en lugares determinados sobre un portaobjetos de vidrio llamado chip y añadir una muestra que contenga DNA o RNA en contacto con el chip. El apareamiento de las bases complementarias entre la muestra y las secuencias de genes en el chip produce una cantidad de luz que se puede medir. Las áreas del chip que producen luz identifican los genes que se expresan en esa muestra.

**microRNAs (miRNAs):** moléculas monocatenarias de pequeño tamaño (18-25 nucleótidos) implicadas en la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional (promoviendo la degradación del RNA mensajero o bloqueando su traducción).

**Microvesícula:** tipo de vesícula extracelular pequeña.

**Peritonitis bacteriana espontánea (PBE):** infección del líquido ascítico. Se define por un recuento de neutrófilos  $>250/\text{mm}^3$  en el líquido ascítico.

**Profilaxis primaria:** prevención de la aparición del primer episodio de hemorragia variceal.

**Profilaxis secundaria:** prevención de un segundo episodio de hemorragia variceal y sucesivos.

**Resistencias vasculares sistémicas:** hace referencia a la dificultad que opone el sistema vascular (excluyendo la circulación pulmonar) al flujo de sangre. Está determinada por los factores que actúan a nivel de los distintos lechos vasculares. Los mecanismos que inducen vasoconstricción llevan a un aumento, mientras que los que inducen vasodilatación llevan a un descenso. El factor determinante primario es el diámetro del vaso determinado por musculatura lisa que poseen en su pared.

**Respuesta hemodinámica:** caída del GPVH de al menos el 10% del valor inicial con tratamiento BBNS.

**RNA no codificante (ncRNA):** RNA que no se traduce a proteína pero que es funcional y está implicado en la regulación de múltiples procesos biológicos, representando uno de los principales mecanismos epigenéticos.

**Secretoma:** conjunto de moléculas secretadas por una determinada célula, tejido u órgano al espacio extracelular.

**Secuenciación masiva:** conjunto de métodos y protocolos que permiten realizar de forma simultánea o en paralelo muchas operaciones de secuenciación (determinación del orden de nucleótidos o secuencia de DNA), permitiendo analizar miles o millones de genes en un tiempo reducido.

**Vesículas extracelulares pequeñas:** estructuras de doble membrana de tamaño  $<100\text{-}200$  nm que contienen diversos tipos de moléculas



## **XV. ANEXOS**

## **ANEXO 1. Comunicaciones a congresos nacionales e internacionales directamente relacionadas con esta tesis doctoral.**

**Tipo de presentación:** comunicación oral (internacional).

**Título:** A circulating microRNA signature identifies response to beta-blockers and severe circulatory dysfunction in patients with decompensated cirrhosis.

**Autores:** Ana García García de Paredes, Luis Téllez, Nicolo Manicardi, Luis Ibáñez, Félix Royo, Javier Bermejo, Carolina Blanco, Constantino Fondevilla, Laura García-Bermejo, Juan Manuel Falcón, Rafael Bañares, Jordi Gracia-Sancho, Agustín Albillos.

**Congreso:** Liver Meeting 2019.

**Organización:** AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases).

**Fecha:** 8-12 noviembre 2019.

**Ciudad:** Boston, EEUU.

**Revista de publicación:** Hepatology 2019; 70(S1):67A-68A.

**Digital Object Identifier (DOI):** doi.org/10.1002/hep.30940

**Tipo de presentación:** comunicación oral (nacional).

**Título:** Una firma de microRNAs circulantes identifica respuesta a beta-bloqueantes y disfunción circulatoria grave en pacientes con cirrosis descompensada.

**Autores:** Ana García García de Paredes, Luis Téllez, Nicolo Manicardi, Luis Ibáñez, Félix Royo, Javier Bermejo, Carolina Blanco, Constantino Fondevilla, Laura García-Bermejo, Juan Manuel Falcón, Rafael Bañares, Jordi Gracia-Sancho, Agustín Albillos.

**Congreso:** 45º Congreso.

**Organización:** AEEH (Asociación Española para el Estudio del Hígado).

**Fecha:** 12-14 febrero 2020.

**Ciudad:** Madrid, España.

**Tipo de presentación:** comunicación oral (nacional).

**Título:** Evaluación de una firma de microRNAs como biomarcador sérico para identificar respuesta hemodinámica y disfunción cardíaca con beta-bloqueantes en pacientes con cirrosis descompensada.

**Autores:** Ana García García de Paredes, Luis Téllez, Nicolo Manicardi, Luis Ibáñez, Félix Royo, Javier Bermejo, Carolina Blanco, Constantino Fondevilla, Laura García-Bermejo, Juan Manuel Falcón, Rafael Bañares, Jordi Gracia-Sancho, Agustín Albillos.

**Congreso:** I Congreso Virtual Digestivo.

**Organización:** SEPD (Sociedad Española de Patología Digestiva).

**Fecha:** 18-20 junio 2020.

**Ciudad:** Virtual.

**Tipo de presentación:** póster (nacional).

**Título:** Una firma de microRNAs circulantes identifica respuesta a beta-bloqueantes y disfunción circulatoria grave en pacientes con cirrosis descompensada.

**Autores:** Ana García García de Paredes, Luis Téllez, Nicolo Manicardi, Luis Ibáñez, Félix Royo, Javier Bermejo, Carolina Blanco, Constantino Fondevilla, Laura García-Bermejo, Juan Manuel Falcón, Rafael Bañares, Jordi Gracia-Sancho, Agustín Albillos.

**Congreso:** XIV Jornadas.

**Organización:** CIBER Enfermedades Hepáticas y Digestivas.

**Fecha:** 9-11 noviembre 2020.

**Ciudad:** Virtual.

## **ANEXO 2. Publicación relacionada con esta tesis doctoral.**

**Título:** Molecular Profiling of Decompensated Cirrhosis by a Novel MicroRNA Signature.

**Autores:** Ana García García de Paredes, Nicolo Manicardi, Luis Téllez, Luis Ibáñez, Félix Royo, Javier Bermejo, Carolina Blanco, Constantino Fondevila, Val Fernández Lanza, Laura García-Bermejo, Juan Manuel Falcon-Perez, Rafael Bañares, Jordi Gracia-Sancho, Agustín Albillos.










**Revista:** Hepatology Communications.

**Digital Object Identifier (DOI):** doi: 10.1002/hep4.1642.

**Fecha de publicación online:** 2.12.2020

**Referencia:** Garcia Garcia de Paredes A, Manicardi N, Tellez L, Royo F, Bermejo J, Blanco C, et al. Molecular Profiling of Decompensated Cirrhosis by a Novel MicroRNA Signature. Hepatol Commun 2020;5:309-322.

# Molecular Profiling of Decompensated Cirrhosis by a Novel MicroRNA Signature

Ana Garcia Garcia de Paredes <sup>1\*</sup>, Nicolò Manicardi <sup>2\*</sup>, Luis Tellez <sup>1,3\*</sup>, Luis Ibañez <sup>3,4</sup>, Felix Royo,<sup>3,5</sup> Javier Bermejo,<sup>6</sup> Carolina Blanco <sup>7</sup>, Constantino Fondevila,<sup>3,8</sup> Val Fernandez Lanza,<sup>9</sup> Laura Garcia-Bermejo <sup>7</sup>, Juan Manuel Falcon-Perez,<sup>3,5,10</sup> Rafael Bañares <sup>3,4</sup>, Jordi Gracia-Sancho <sup>2,3\*\*</sup> and Agustín Albillos <sup>1,3\*\*</sup>

Noninvasive staging of decompensated cirrhosis is an unmet clinical need. The aims of this study were to characterize and validate a novel microRNA (miRNA) signature to stage decompensated cirrhosis and predict the portal pressure and systolic cardiac response to nonselective beta-blockers (NSBBs). Serum samples from patients with decompensated cirrhosis (n = 36) and healthy controls (n = 36) were tested for a novel signature of five miRNAs (miR-452-5p, miR-429, miR-885-5p, miR-181b-5p, and miR-122-5p) identified in the secretome of primary human hepatocytes and for three miRNAs (miR-192-5p, miR-34a-5p, and miR-29a-5p) previously discovered as biomarkers of chronic liver disease. All patients had ascites, which was refractory in 18 (50%), and were placed on NSBBs for variceal bleeding prophylaxis. In all patients, serum miRNAs, hepatic venous pressure gradient, and an echocardiogram study were performed before and 1 month after NSBBs. Patients with cirrhosis had lower serum levels of miR-429, miR-885-5p, miR-181b-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, and miR-29a-5p ( $P < 0.05$ ). Baseline serum miR-452-5p and miR-429 levels were lower in NSBB responders ( $P = 0.006$ ). miR-181b-5p levels were greater in refractory ascites than in diuretic-sensitive ascites ( $P = 0.008$ ) and correlated with serum creatinine. miR-452-5p and miR-885-5p were inversely correlated with baseline systemic vascular resistance ( $\rho = -0.46$ ,  $P = 0.007$ ; and  $\rho = -0.41$ ,  $P = 0.01$ , respectively) and with diminished systolic contractility ( $\rho = -0.55$ ,  $P = 0.02$ ; and  $\rho = -0.55$ ,  $P = 0.02$ , respectively) in patients with refractory ascites after NSBBs. **Conclusion:** Analysis of a miRNA signature in serum discriminates between patients with decompensated cirrhosis who show more severe systemic circulatory dysfunction and compromised systolic function after beta-blockade and those more likely to benefit from NSBBs. (*Hepatology Communications* 2021;5:309-322).

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNA molecules (18-25 nucleotides) involved in the posttranscriptional regulation of protein-coding genes controlling many cellular processes.<sup>(1)</sup> In serum, miRNAs may be bound to circulating proteins or, more frequently, contained within extracellular vesicles (EVs).<sup>(2)</sup> EVs are nanometric double-membrane structures that envelop miRNAs and shuttle this biological information from one cell type to another. Because their cargo dynamically

*Abbreviations:* AUC, area under the curve; BCL2, B-cell lymphoma 2; CI, confidence interval; Ct, cycle threshold; EIVPD, ejection intraventricular pressure difference; EV, extracellular vesicle; HVPG, hepatic venous pressure gradient; MELD, Model for End-Stage Liver Disease; miRNA/miR, microRNA; NSBB, nonselective beta-blocker; PCR, polymerase chain reaction; qRT-PCR, quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction; vol, volume; XLAP, X-linked inhibitor of apoptosis protein.

Received July 29, 2020; accepted October 23, 2020.

Additional Supporting Information may be found at [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep4.1642/supinfo](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep4.1642/supinfo).

Supported by the Ministerio de Asuntos Economicos y Transformacion and Instituto de Salud Carlos III-Ministerio de Ciencia e Innovacion (SAF 2017-86343-R to A.A. and Instituto de Salud Carlos III (PIE1600050, PI18/01152, PI20/01302 to A.A. CIBEREHD-16PI03 and PI17/00012 to J.G.S.; PI18/01901 to R.B.). CIBEREHD is cofinanced by the European Development Regional Fund "A way to achieve Europe." Supported in part by a grant from Gilead Sciences GLD19/00045

[Corrections added on December 19, 2020, after first online publication: the funder details added "Supported in part by a grant from Gilead Sciences GLD19/00045".]

\*These authors contributed equally to this work. (the first three authors contributed equally to this work).

\*\*These authors contributed equally to this work. (the last two authors share senior authorship).

© 2020 The Authors. *Hepatology Communications* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of the American Association for the Study of Liver Diseases. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com).

DOI 10.1002/hep4.1642

Potential conflict of interest: Nothing to report.

changes depending on different physiopathological stimuli, it has been hypothesized that EVs themselves and/or EV-housed miRNAs may serve as noninvasive biomarkers to assess disease course, progression, and therapeutic response.<sup>(3)</sup>

Cirrhosis is a progressive disease that develops over two consecutive stages, compensated and decompensated, each with different clinical characteristics and prognoses.<sup>(4)</sup> Within the decompensated stage, further decompensation leads to refractory ascites, a stage of cirrhosis characterized by severe peripheral vasodilation, reduced cardiac reserve, and a dismal prognosis.<sup>(5-7)</sup> For patients with cirrhosis, nonselective beta-blockers (NSBBs) are the cornerstone treatment to prevent first and recurrent variceal bleeding.<sup>(8)</sup> The response to NSBBs, as defined by a reduction in the hepatic venous pressure gradient (HVPG)  $\geq$  10%, has been associated with reduced variceal bleeding and ascites development and increased survival.<sup>(9-12)</sup> However, the beneficial effects of NSBBs may not extend to the whole population of patients with decompensated cirrhosis. In fact, NSBBs may be harmful in patients with refractory ascites as they may compromise their cardiac compensatory reserve with the consequences of insufficient cardiac output and renal failure.<sup>(7,13)</sup> Clinicians, therefore, need to be cautious about prescribing NSBBs to these patients with refractory ascites. There is a lack of noninvasive biomarkers to identify patients with decompensated cirrhosis more prone to develop complications. Personalized molecular profiling could be useful to

identify those subjects with severe circulatory dysfunction in which NSBBs may be risky.

This study was designed to examine the correlation of a novel serum miRNA signature with several outcomes in decompensated cirrhosis. This signature was identified according to its differential expression in EVs in the secretome of hepatocytes from livers of patients with cirrhosis. Our working hypothesis was that the proposed miRNA signature would likely reflect disease stage and therefore serve as a valuable biomarker in patients with decompensated cirrhosis. This signature was assessed in terms of its capacity to 1) discriminate between patients with diuretic-sensitive and refractory ascites; 2) anticipate the development of cardiac dysfunction in response to NSBBs; and 3) predict the HVPG response to NSBBs.

## Materials and Methods

### STUDY DESIGN

Our study consisted of three steps: 1) identification of a novel miRNA signature in the secretome of cultures of human hepatocytes; 2) analysis of the miRNA signature in serum samples from a well-characterized cohort of patients with decompensated cirrhosis and from age- and sex-matched healthy controls; and 3) correlation of serum levels of these miRNAs with clinical outcomes in patients with decompensated cirrhosis (Fig. 1).

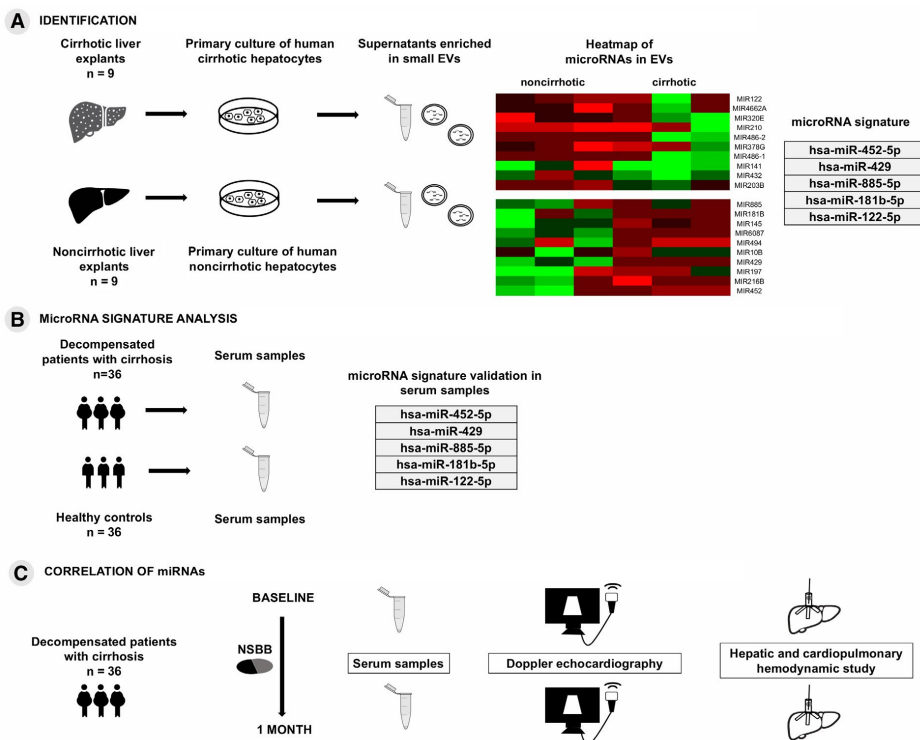
#### ARTICLE INFORMATION:

From the <sup>1</sup>Gastroenterology and Hepatology Department, Hospital Universitario Ramon y Cajal, Instituto Ramon y Cajal de Investigacion Biosanitaria (IRYCIS), Universidad de Alcalá, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Liver Vascular Biology Research Group, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Centro de Investigacion Biomedica en Red de Enfermedades Hepaticas y Digestivas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Gastroenterology and Hepatology Department, Hospital Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigacion Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; <sup>5</sup>Exosomes Laboratory, Center for Cooperative Research in Biosciencias, Basque Research and Technology Alliance Derio, Derio, Spain; <sup>6</sup>Cardiology Department, Hospital Universitario Gregorio Marañón, IISGM, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; <sup>7</sup>Biomarkers and Therapeutic Targets Group, IRYCIS, Madrid, Spain; <sup>8</sup>Liver Surgery and Transplantation Unit, Hospital Clinic, Barcelona, Spain; <sup>9</sup>Microbiology Department and Bioinformatics Core Facility, IRYCIS, Madrid, Spain; <sup>10</sup>IKERBASQUE-Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain.

#### ADDRESS CORRESPONDENCE AND REPRINT REQUESTS TO:

Agustin Albillos, Ph.D.  
Gastroenterology and Hepatology Department  
Hospital Universitario Ramon y Cajal  
M-607, km. 9.100

28034 Madrid, Spain  
E-mail: agustin.albillos@uah.es  
Tel.: +34 91 3368592



**FIG. 1.** Study design. The study was developed in three steps: A) Identification of a novel miRNA signature in the secretome of cultures of human hepatocytes from cirrhotic and noncirrhotic livers. The heatmap represents the 20 most deregulated miRNAs (the top 10 up-regulated and the top 10 down-regulated) detected after sequencing small EVs from cirrhotic and noncirrhotic hepatocyte secretome. The five miRNAs integrating the novel signature are those that presented a greater fold change and statistically significant difference. B) miRNA signature analysis in serum samples of patients with decompensated cirrhosis and age- and sex-matched healthy controls. The novel signature of five miRNAs identified in the previous step was measured in serum samples of patients with cirrhosis. C) Correlation of miRNAs in serum and clinical outcomes in patients with decompensated cirrhosis. miRNAs were measured in patients' serum at baseline and 1 month after treatment with NSBBs. miRNAs levels were correlated with disease stage (diuretic-sensitive vs. refractory ascites), the cardiac systolic function measured by echocardiography, and the portal pressure response to NSBBs.

This was a collaborative translational project involving human samples. The study protocol adhered to the principles of the Declaration of Helsinki. The study's first stage in which the miRNA signature was identified was conducted at the August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute-Hospital Clinic of Barcelona, and its protocol was approved by this center's Ethics Committee (HCB/2018/0028). The protocol for subsequent stages received approval from the Ethics Committee for Clinical Research of the Hospital Universitario Ramon y Cajal (institutional review board number 362/19; approval date April 1, 2019). All included subjects provided written

informed consent authorizing the storage and research use of their biological samples.

### IDENTIFICATION OF A NOVEL miRNA SIGNATURE IN THE SECRETOME OF CULTURES OF HUMAN HEPATOCYTES

Hepatocytes were isolated from explants of livers from patients with decompensated cirrhosis (n = 9, all of alcoholic etiology) and livers from patients undergoing partial liver resection for hepatic metastases of

colorectal cancer (n = 9) who had not received chemotherapy. The viability of samples from liver metastases was assessed by the Pathology Department to ensure that the isolated hepatocytes were not affected by their proximity to tumor tissue. For the isolation and culture of hepatocytes, we used validated protocols.<sup>(14)</sup> Cells were seeded on collagen-coated 150-cm<sup>2</sup> Petri dishes at a density of  $2 \times 10^7$  cells per dish and cultured (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in Dulbecco's modified Eagle's medium F-12 Ham supplemented with penicillin-streptomycin solution (1% volume [vol]/vol), L-glutamine (1% vol/vol), and exosome-depleted fetal bovine serum (2% vol/vol). After 24 hours of culture, the supernatant was collected, centrifuged at 2,000g for 10 minutes at room temperature, and filtered with 0.22- $\mu$ m filters to remove apoptotic bodies. Subfractions enriched in small EVs generated by the hepatocytes, mainly exosomes, were obtained by subsequent ultracentrifugations.<sup>(15,16)</sup> Small EV subfractions were routinely tested for purity and quality by nanoparticle tracking analysis (NanoSight). The Bradford assay was used to determine protein concentration, and the EVs were stored at -80°C for further analysis. EV samples were pooled in groups of three for proper RNA isolation and analysis. Total RNA was isolated (miRVANA Paris Kit; Ambion/Thermo Fisher Scientific) from 50  $\mu$ g of EV preparation and 2  $\mu$ L of 1 nM. Each sample was spiked with *Caenorhabditis elegans* miR-39-5p. The quantity and profiles of the obtained RNAs were examined using Agilent RNA 6000 Pico Chips (#5067-1513; Agilent Technologies). Sequencing libraries were prepared using NEXTflex Small RNA-Seq Kit v3 (#5132-05; Bioo Scientific Corporation) following the protocol for NEXTflex Small RNA-Seq Kit v3 V16.06. Briefly, RNA samples were incubated for 2 minutes at 70°C, then 3' 4N adenylated adapter and ligase enzyme were added; ligation was conducted overnight at 20°C. After removal of excess 3'-adapter, 5'-adapter and ligase enzyme were added and the mix incubated at 20°C for 1 hour. The ligation product was used for reverse transcription with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in a thermocycler for 30 minutes at 42°C and 10 minutes at 90°C. Next, complementary DNA (cDNA) was enriched by polymerase chain reaction (PCR) cycling as follows: 2 minutes at 95°C; 22-25 cycles of 20 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, and 15 seconds at 72°C; final elongation for 2 minutes at 72°C; and the reaction stopped at 4°C. PCR products were resolved on 6% Novex Tris/borate/ethylene diamine tetraacetic acid polyacrylamide gel electrophoresis gels (#EC6265BOX; Thermo

Fisher Scientific), and the band between 150 base pairs (bp) and 300 bp was cut out from the gel. The products were extracted from the polyacrylamide gel using an adapted protocol in which cDNA from gel slices was diluted in double-distilled H<sub>2</sub>O. Next, the libraries were analyzed quantitatively and qualitatively in an Agilent 2100 Bioanalyzer using the Agilent High Sensitivity DNA Kit (#5067-4626; Agilent Technologies) and Qubit double-stranded DNA HS DNA Kit (#Q32854; Thermo Fisher Scientific). The libraries were single-read sequenced for 51 nucleotides in a HiSeq2500 System (Illumina) at the CIC bioGUNE genome analysis platform. After sequencing, the raw data were processed to identify miRNAs differentially expressed among the established groups by univariate analysis according to the criteria that the fold change was at least 1.5 and  $P < 0.05$  (all microRNAs identified after sequencing are indicated in Supporting Fig. S1). The differential expression of selected miRNAs was validated by specific TaqMan individual quantitative reverse-transcription (qRT)-PCR assays. All five miRNAs comprising the newly identified signature (miR-452-5p, miR-429, miR-885-5p, miR-181b-5p, and miR-122-5p) were registered at the miR-Base database ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)). RNA sequencing data are deposited and stored in Gene Expression Omnibus under accession number GSE150867.

#### ANALYSIS OF THE miRNA SIGNATURE IN SERUM SAMPLES FROM PATIENTS WITH DECOMPENSATED CIRRHOSIS AND HEALTHY CONTROLS

The novel miRNA signature along with three miRNAs (miR-192-5p, miR-34a-5p, and miR-29a-5p) identified previously as biomarkers of chronic liver disease<sup>(17-19)</sup> were measured in serum samples from patients with decompensated cirrhosis and healthy individuals.

Serum samples from patients with decompensated cirrhosis were from a registered collection (C.0005352, Collections Section of the Biobank Registry of Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain) of a cohort of 36 patients with cirrhosis and ascites treated with an NSBB (propranolol) for primary prophylaxis of variceal bleeding. Serum samples were collected before and 4 weeks after starting treatment with NSBBs between April 2016 and December 2018, and miRNA assays were performed in April 2019. Serum samples were centrifuged at



2,000g for 15 minutes at 22°C, and the supernatants aliquoted and stored at -80°C until miRNA analysis.

Healthy individuals were those matched for sex and age with no history of liver disease. Serum samples (n = 36) from the local blood transfusion center were provided by the Hospital Universitario Ramon y Cajal-Instituto Ramon y Cajal de Investigacion Biosanitaria (IRYCIS) (Registry of Biobanks of the Instituto de Salud Carlos III No. B.0000678) within the National Network of Biobanks (PT17/0015/0010). All samples were obtained with the approval of the corresponding ethics and scientific committees and processed following standard procedures. Serum was obtained by centrifugation at 1,100g for 10 minutes at 4°C, then aliquoted and immediately stored at -80°C.

For serum miRNA analysis, we first isolated total RNA from 200 µL of serum with the Plasma/Serum RNA Purification Mini Kit (#55000; Norgen Biotek, Thorold, Canada) according to the manufacturer's protocol. Next, the expression of miRNAs was analyzed through amplification in individual qRT-PCR reactions using commercially available locked nucleic acid probes specific for each miRNA of interest (miRNA primer sets from Exiqon A/S, Vedbæk, Denmark). All reactions were performed in triplicate with Light Cycler 480 equipment (Roche) following the supplier's guidelines. The relative expression of each miRNA was calculated using miR-103a-3p as the housekeeping gene to minimize analytic variability and obtain a reliable and reproducible result. This housekeeping gene showed the least variability among the tested normalizers recommended for serum by the supplier (Qiagen) (miR-103a-3p, miR-191-5p, miR-30a, and miR-124-3p). miR-103a-3p was chosen for data normalization as it showed the lower SD between all samples tested. In fact, miR-103a-3p and miR-191-5p have been reported to be stable endogenous reference genes in serum for data normalization.<sup>(20)</sup> miRNA levels are expressed according to the comparative cycle threshold (Ct) method  $\Delta Ct$ , where  $\Delta Ct = \text{average } Ct_{\text{tested miRNA}} - \text{average } Ct_{\text{miR-103a-3p}}$  (average Ct is the mean of the technical triplicate), which inversely correlates with the amount of miRNA in the serum.

## CLINICAL CHARACTERIZATION AND STUDY OF PATIENTS WITH DECOMPENSATED CIRRHOSIS

A cohort of 36 patients with decompensated cirrhosis, 18 of whom had refractory ascites defined

according to the International Club of Ascites,<sup>(21)</sup> was examined before and 4 weeks after starting treatment with an NSBB (propranolol) as part of a prospective protocol (ClinicalTrials.gov NCT02163512).<sup>(7)</sup> Examinations included a comprehensive Doppler echocardiography study, hepatic and cardiopulmonary hemodynamic assessment, and blood tests. In brief, heart rate and mean arterial pressure were measured with an automatic sphygmomanometer; free and wedged hepatic venous pressures were obtained by placing a balloon catheter in the hepatic vein; cardiac output was measured by thermodilution using a Swan-Ganz catheter; and color Doppler M-mode images from the five-chamber view were obtained by echocardiography. The HVPG was calculated as the difference between mean wedged and free hepatic pressures. Systemic vascular resistance was estimated according to the formula (mean arterial pressure - right atrial pressure)  $\times 80$  / cardiac output. Hemodynamic response to NSBBs was defined as a decrease in HVPG by  $\geq 10\%$  because this has been proposed as the best target to define a response in primary prophylaxis.<sup>(9,10)</sup> Cardiac systolic function was estimated by Doppler echocardiography using custom software through the ejection intraventricular pressure difference (EIVPD). This index accounts for the difference in pressure between the apex and the left ventricle outflow tract in the normal heart due to blood flow acceleration during early systole. The EIVPD is a robust loading-independent index closely related to the force of contractility of the left ventricle that has been proved highly reliable in decompensated cirrhosis.<sup>(7,22)</sup> Detailed information on the methods used for clinical measurements is provided as online Supporting Material.

## BIOINFORMATICS STUDIES

The potential functional significance and interactions of the miRNAs were assessed through bioinformatics data mining. Functional enrichment analysis was performed on predicted target genes of the selected miRNAs using cluster Profiler software.<sup>(23)</sup> To assess interactions, we used the miRGate database and accepted those predictions with three or more computational validations or one experimental validation.<sup>(24)</sup> Bipartite networks were built using the selected miRNAs as source and regulated genes as targets.

## STATISTICAL ANALYSIS

The Shapiro-Wilk test and distribution plots were used to establish the normality of the data. Continuous variables provided as the median and interquartile range were compared through univariate analysis using a nonparametric test (Mann-Whitney U test). For paired continuous data, the Wilcoxon signed-rank test was used. Categorical variables are provided as absolute and relative frequencies, and the Fisher's exact test was used for intergroup comparisons. The expression of miRNAs was correlated with the response to NSBBs by calculating the Spearman correlation coefficient. The area under the curve (AUC) was used to assess the diagnostic performance of the selected miRNAs. Optimal cutoffs of sensitivity and specificity were calculated for each miRNA based on the receiver operating characteristic curves. Statistical analysis was performed using Stata/IC 14.0. All tests were two-tailed. Significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

### IDENTIFYING AN miRNA SIGNATURE IN THE SECRETOME OF PRIMARY HUMAN HEPATOCYTES

We first analyzed the secretome of primary human hepatocytes isolated from tissue remnants of liver explants and partial hepatic resections from patients with cirrhosis and liver metastases, respectively. This involved examining the noncoding RNA contents of small EVs present in the secretome. We identified a signature of five miRNAs (miR-452-5p, miR-429, miR-885-5p, miR-181b-5p, and miR-122-5p) that were differentially expressed in the secretome of hepatocytes from livers with and without cirrhosis.

### miRNA SIGNATURE VALIDATION IN SERUM SAMPLES OF PATIENTS WITH CIRRHOSIS AND CONTROLS

Our next step was to validate the identified miRNA signature in the serum of patients with decompensated cirrhosis. As a control, we also checked whether three miRNAs (miR-192-5p, miR-34a-5p, and miR-29a-5p) previously identified as biomarkers of chronic

liver disease were differentially expressed in total circulating RNA isolated from patients and healthy controls.

Serum samples from 36 patients with cirrhosis with ascites (50% refractory ascites) and 36 age- and sex-matched healthy controls were tested for the expression of the novel miRNA signature. miRNAs could not be determined in 3 patients with cirrhosis as samples were collected in heparinized tubes causing qRT-PCR inhibition. These 3 patients and their corresponding controls were thus excluded from the study. The baseline characteristics of the study population (33 patients with cirrhosis, 81.8% men, mean age 58 years [range, 54-61], 16 with diuretic-sensitive ascites, and 17 with refractory ascites) are detailed in Table 1.

TABLE 1. BASELINE CHARACTERISTICS OF THE STUDY POPULATION

	Diuretic-Sensitive Ascites n = 16	Refractory Ascites n = 17	P Value
Age, years	55 (52-59)	59 (54-65)	0.4
Male sex	13 (81.2%)	14 (82.3%)	0.64
Etiology of cirrhosis			0.15
Alcohol	13 (81.2%)	10 (58.8%)	
Viral	3 (18.8%)	7 (41.2%)	
Child-Pugh score			0.15
B	13 (81.2%)	10 (58.8%)	
C	3 (18.8%)	7 (41.2%)	
MELD score	12 (10-16)	16 (13-17)	0.12
Baseline laboratory parameters			
Bilirubin (mg/dL)	1.9 (1-3.5)	2.2 (1.3-3.6)	0.63
Albumin (g/dL)	3 (2.5-3.3)	2.9 (2.6-3.3)	0.97
INR	1.3 (1.3-1.5)	1.5 (1.3-1.6)	0.17
Creatinine (mg/dL)	0.7 (0.7-0.8)	0.9 (0.7-1)	0.08
eGFR (mL/minute/1.73 m <sup>2</sup> )	103 (84-120)	79 (58-87)	0.01
Cystatin C (mg/dL)	1.2 (1.1-1.2)	1.6 (1.2-2)	0.03
Sodium (mEq/L)	135 (133-137)	132 (131-134)	0.01
Baseline hemodynamic parameters			
Mean arterial pressure (mm Hg)	91 (85-97)	80 (74-92)	0.006
Systemic vascular resistance (dynes.sec/cm <sup>-5</sup> /m <sup>2</sup> )	1,006 (828-1,170)	937 (784-1,179)	0.69
HVPG (mm Hg)	21 (19-25)	23 (19-25)	0.81
EIVPD (mm Hg)	4.1 (3.2-5.4)	4.6 (2.9-5.8)	0.65

Quantitative variables are provided as median and interquartile range. Qualitative variables are provided as absolute values and percentages. Abbreviations: eGFR, estimated glomerular filtration rate; INR, international normalized ratio; sec, seconds.

Our validation study in serum samples of the miRNA signature confirmed different expression levels in patients versus controls of four of the five miRNAs comprising the signature and two of the three miRNAs assessed as controls. Compared to controls, patients with cirrhosis showed significantly ( $P < 0.005$ ) lower levels of miR-429, miR-885-5p, miR-181b-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, and miR-29a-5p ( $P < 0.05$ ) and similar levels of miR-452-5p and miR-34a-5p (Fig. 2). Of these differentially expressed markers, miR-29a-5p showed the highest AUC for the identification of cirrhosis (AUC, 0.88; 95% confidence interval [CI], 0.8-0.95; sensitivity, 78.8%; specificity, 78.8% for cut-off point 1.53), as depicted in Supporting Fig. S2. Of note, miRNA serum levels did not correlate with the classic scores of liver function (Model for End-Stage Liver Disease

[MELD], MELD-Na, and Child-Pugh), as detailed in Supporting Table S1.

### SERUM miRNA SIGNATURE EXPRESSION AND CLINICAL OUTCOMES IN PATIENTS WITH DECOMPENSATED CIRRHOSIS

#### Serum miRNA Expression in Refractory Ascites

Baseline levels of miR-181b-5p were significantly higher in patients with refractory ascites than diuretic-sensitive ascites ( $P = 0.008$ ). miR-181b-5p levels showed an AUC of 0.77 (95% CI, 0.59-0.93; sensitivity, 75%; specificity, 70.6% for cut-off point 6.57) to identify patients with refractory ascites, as depicted

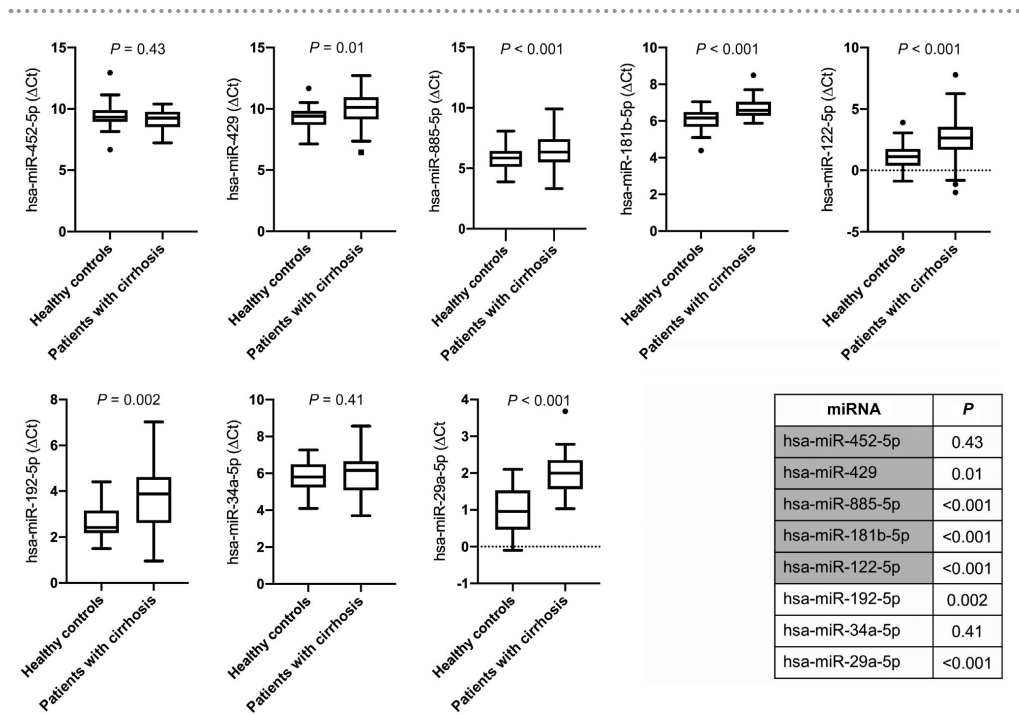
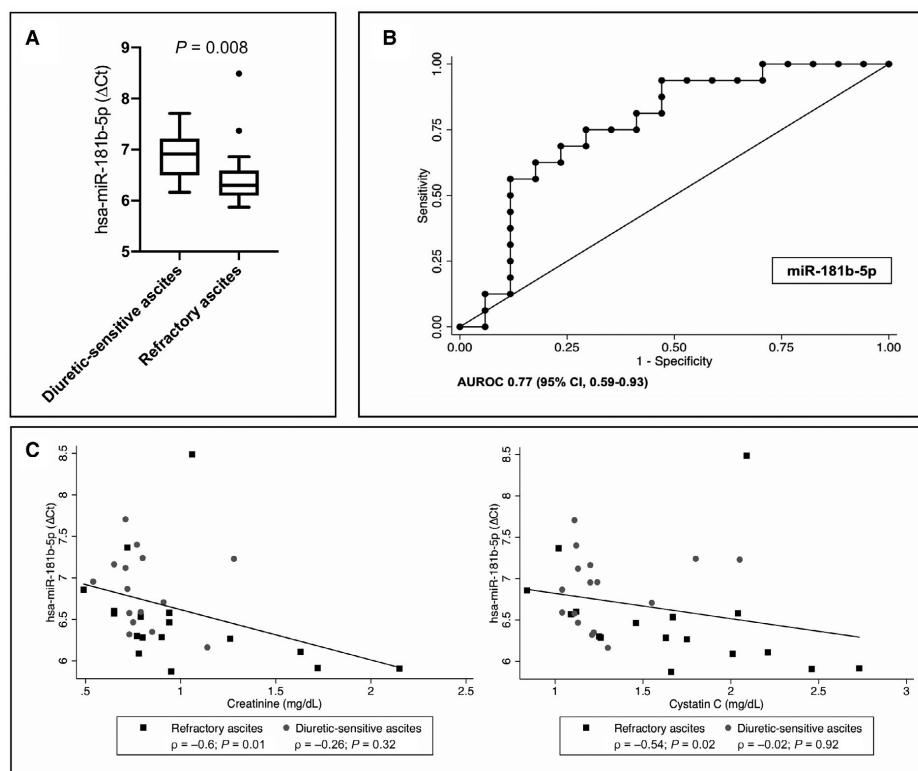


FIG. 2. miRNA serum expression in patients with cirrhosis and healthy controls. The vertical lines indicate the range, the middle horizontal line is the median, and the horizontal boundaries of the boxes represent the first and third quartile. miRNAs from the novel signature appear highlighted in the table.



**FIG. 3.** Diuretic-sensitive versus refractory ascites. (A) miR-181b-5p serum expression in patients with diuretic-sensitive and refractory ascites. The vertical lines indicate the range, the middle horizontal line is the median, and the horizontal boundaries of the boxes represent the first and third quartile. (B) Receiver operator characteristic curve of miR-181b-5p to identify patients with refractory ascites. Each point on the ROC curve represents a different cutoff value for a sensitivity/specificity pair. (C) Correlation between miR-181b-5p and renal function parameters. Points represent individual patients. Abbreviation: AUROC, area under the receiver operator characteristic curve.

in Fig. 3A,B. The other miRNAs examined did not differ significantly in their levels between refractory and diuretic-sensitive ascites (Supporting Fig. S3). Levels of miR-181b-5p expression showed an inverse correlation with indicators of renal function (serum creatinine,  $\rho = -0.5, P = 0.002$ ; and cystatin C,  $\rho = -0.44, P = 0.01$ ). This correlation was restricted to patients with refractory ascites (creatinine,  $\rho = -0.6, P = 0.01$  in refractory ascites vs.  $\rho = -0.26, P = 0.32$  in diuretic-sensitive ascites; cystatin C,  $\rho = -0.54, P = 0.02$  in refractory ascites vs.  $\rho = -0.02, P = 0.92$  in diuretic-sensitive ascites), as detailed in Fig. 3C.

In the whole group of patients with ascites, serum levels of miR-452-5p and miR-885-5p correlated with severity of systemic vasodilation. Lower systemic vascular resistance had lower serum levels of miR-452-5p and miR-885-5p ( $\rho = -0.46, P = 0.007$ ; and  $\rho = -0.42, P = 0.01$ , respectively), as represented in Fig. 4.

### Serum miRNA Expression and Response to Beta-Blockade

Mean HVPG at baseline was 22 mm Hg,<sup>(19-25)</sup> with no significant differences between refractory and

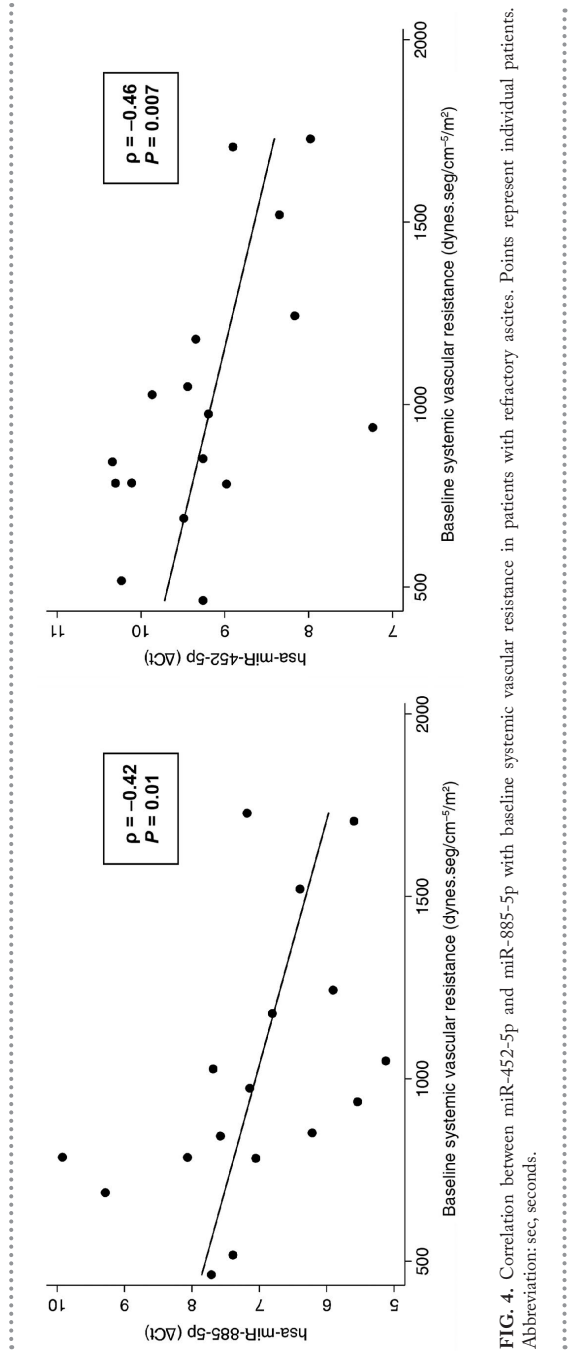


FIG. 4. Correlation between miR-452-5p and miR-885-5p with baseline systemic vascular resistance in patients with refractory ascites. Points represent individual patients. Abbreviation: sec, seconds.

diuretic-sensitive ascites ( $P = 0.81$ ). Baseline serum miRNAs levels showed no correlation with baseline HVPG (Supporting Table S1). miRNA levels did not significantly change after NSBBs, as represented in Supporting Fig. S4. Seventeen patients (51.5%) showed a hemodynamic response to NSBBs defined as a drop in HVPG  $\geq 10\%$ . Baseline serum miR-452-5p and miR-429 levels were significantly lower ( $P < 0.05$ ) in responders than nonresponders to NSBBs (Fig. 5A). Levels of miR-181b-5p and miR-29a-5p showed a similar tendency, albeit non-significant ( $P = 0.05$  and  $P = 0.06$ , respectively), while other miRNAs did not differ significantly between responders and nonresponders (Supporting Fig. S5). Their AUC to identify a response to NSBBs was 0.77 (95% CI, 0.59-0.95; sensitivity, 82.4%; specificity, 75% for a 9.26 cutoff) for miR-452-5p and also 0.77 for miR-429 (95% CI, 0.61-0.94; sensitivity, 76.5%; specificity, 81.2% for a 10.2 cutoff), as represented in Fig. 5B.

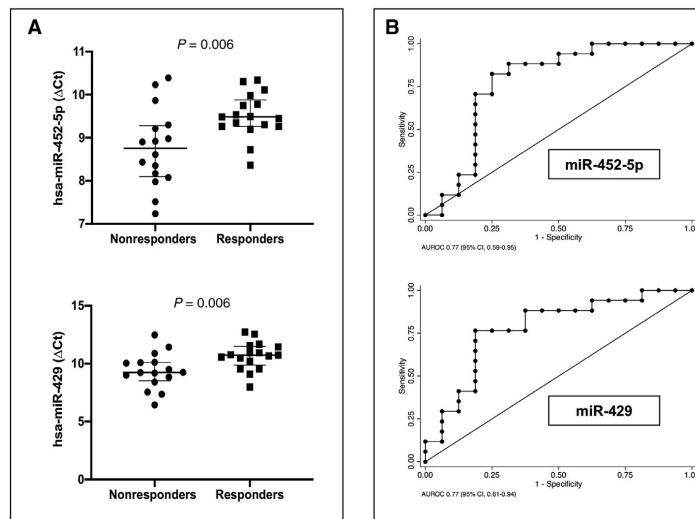
Treatment with NSBBs resulted in significantly reduced systolic cardiac function as estimated by EIVPD in patients with refractory ascites before

NSBBs (mean, 4.6; 2.9-5.8 mm Hg) versus after NSBBs (mean, 3.3; 3-4.1 mmHg;  $P = 0.005$ ) but not in those with diuretic-sensitive ascites ( $P = 0.3$ ). Baseline miR-452-5p and miR-885-5p inversely correlated with impaired systolic function produced after NSBBs in patients with refractory ascites ( $\rho = -0.55$ ,  $P = 0.02$ ; and  $\rho = -0.55$ ,  $P = 0.02$ , respectively), as shown in Fig. 6.

### FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF miRNAs

Our bioinformatics analysis was designed to assess the potential functional implications of the miRNAs examined here. As illustrated in Supporting Fig. S6, these miRNAs and their target genes play essential roles in several biological processes, mostly in cell response to hypoxia.

We found a functional relationship among the validated miRNAs based on shared target prediction, which is represented as a network in Supporting Fig. S7. In this relationship, miR-452-5p, miR-429, miR-181b-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, and



**FIG. 5.** Hemodynamic response to NSBBs. (A) miR-452-5p and miR-429 serum expression in patients with and without hemodynamic response to NSBBs. The vertical lines indicate the range, and the horizontal lines are the median and first and third quartile. Points represent individual patients. (B) Receiver operator characteristic curves of miR-452-5p and miR-429 to predict hemodynamic response to NSBBs. Each point on the ROC curve represents a different cutoff value for a sensitivity/specificity pair. Abbreviation: AUROC, area under the receiver operator characteristic curve.

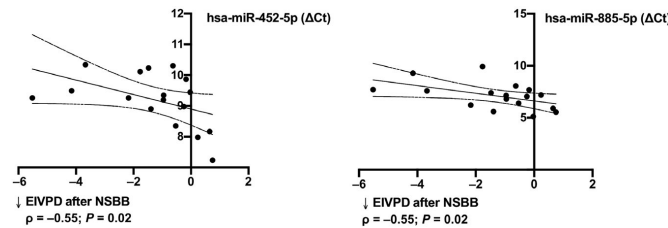


FIG. 6. Correlation between miR-452-5p and miR-885-5p with the fall of systolic function after NSBB.

miR-34a-5p control the expression of common targets that might cooperate to promote cell response; miR-429, miR-181b-5p, and miR-34a-5p control the expression of a common target, B-cell lymphoma 2 (BCL2); and miR-429, miR-181b-5p, and miR-192-5p seem to be related through the gene X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). Additionally, BCL2 and XIAP are genes involved in the apoptotic process.

## Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to focus on circulating miRNAs as potential biomarkers of disease stage in decompensated cirrhosis. Our findings reveal the differential expression of a novel miRNA signature in the serum of patients with refractory ascites. Our study also shows the capacity of this signature to distinguish patients with decompensated cirrhosis with severe peripheral vasodilation, who are more prone to develop significant cardiac impairment after NSBBs, as well as those more likely to respond to NSBBs in terms of HVPG reduction. In addition to the novel signature, we also examined the behavior of three miRNAs that have been previously related to chronic liver disease. We confirmed that two of these three miRNAs were able to differentiate patients with cirrhosis from healthy controls, but they did not serve to characterize decompensated cirrhosis or to predict the response to beta-blockade.

The translational design of our study allowed for the identification of a signature of circulating miRNAs. We hypothesized that serum miRNAs with potential diagnostic value as biomarkers in

decompensated cirrhosis might include, among others, miRNAs previously identified in the secretome of hepatocytes from the cirrhotic livers of patients with decompensated disease. For this purpose, we first identified miRNAs differentially expressed in the EVs of the supernatant of cultures of human hepatocytes from cirrhotic and noncirrhotic livers. We postulated that the miRNA signature characterized *in vitro* could be a marker of clinical outcomes in decompensated cirrhosis. It is conceivable that the miRNA content of EVs is specific of its cell source and reflects the physiological/pathological state of the corresponding tissue.<sup>(25)</sup> In keeping with this approach and for the sake of methodological simplicity, we opted for the analysis of miRNA in serum instead of isolated serum EVs. Our results confirmed our working hypothesis as the miRNA signature first identified in EVs and thereafter in serum was found to correlate with outcomes in patients with decompensated cirrhosis.

Six of the miRNAs examined (miR-429, miR-885-5p, miR-181b-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, and miR-29a-5p) were differentially expressed in our cohort of patients with decompensated cirrhosis compared to controls. The best diagnostic accuracy for cirrhosis was shown by miR-29a-5p, which has been reported to be down-regulated in patients with cirrhosis.<sup>(19)</sup> The five other miRNAs appearing in significantly lower levels in the serum of patients with cirrhosis were miR-429, which has not been studied in liver disease; and miR-122-5p, miR-885-5p, miR-181b-5p, and miR-192-5p, for which higher serum levels have been detected in patients with chronic liver disease compared to controls. The presence of miRNAs has been explored in several liver diseases, such as viral hepatitis, nonalcoholic fatty liver disease

(NAFLD), or hepatocellular carcinoma.<sup>(26-28)</sup> In these studies, however, patients with decompensated cirrhosis were barely represented. This could explain the discrepancies (up-regulation vs. down-regulation) in the levels of circulating miRNAs between our study and those of others. In agreement with our findings, reduced serum levels of miR-122, the most abundant miRNA in the liver, and of miR-885-5p have been reported in patients with decompensated compared to those with compensated cirrhosis.<sup>(29-31)</sup> Such lower serum levels of these miRNAs in patients with more advanced disease may be secondary to their reduced secretion due to a loss of functional hepatocytes rather than to their increased release from injured hepatocytes seen in earlier stages of liver diseases.

A noteworthy finding of our study was the ability of miR-181b-5p to identify patients with refractory ascites. Whereas the role of miRNAs as biomarkers in chronic liver disease has focused on diagnosis and NAFLD stratification,<sup>(32)</sup> ours is the first study to explore their predictive value specifically in decompensated cirrhosis. Refractory ascites is clinically defined by expert consensus as a stage of further decompensation of cirrhosis characterized by severe circulatory dysfunction and limited cardiac reserve.<sup>(7,21)</sup> Classical scores of liver function do not reflect the severity of circulatory dysfunction or the labile nature of renal function these patients feature.<sup>(7)</sup> Indeed, while there were no differences in Child-Pugh and MELD between patients with diuretic-sensitive and refractory ascites in our cohort, remarkably, miR-181b-5p was up-regulated in the serum of patients with refractory ascites and showed an AUC of 0.77 to identify this patient subset. Moreover, serum levels of this miRNA were correlated with the degree of renal impairment. The marked differences in serum miRNA levels between refractory and diuretic-sensitive ascites support the notion of a distinctive pathophysiological background underlying the classical clinical differentiation of the two substages of decompensated cirrhosis, which are accurately identified by the miRNA signature. Further, we have also observed that a greater serum expression of miR-452-5p and miR-885-5p shows a greater severity of peripheral vasodilation, i.e., the ability of these miRNA to identify those patients with the more severe circulatory dysfunction. Interestingly, because the severity of peripheral vasodilation and the reduction in systolic function

induced by beta-blockade are closely related, expression levels of miR-452-5p and miR-885-5p were also linked to the declining systolic function after NSBBs.<sup>(7)</sup> Taken together, our results provide proof-of-concept evidence of the value of miRNA profiling to stratify decompensated cirrhosis.

Our study also explores whether miRNAs are able to predict the HVPG response to NSBBs. NSBBs prevent primary and recurrent variceal bleeding and improve survival in patients with compensated and decompensated cirrhosis.<sup>(9-12)</sup> The benefits of NSBBs for clinical outcomes are closely linked to the fall in HVPG produced in response to beta-blockade, which is largely variable among patients and can only be addressed by its measurement.<sup>(11)</sup> Thus, noninvasive biomarkers, i.e., differential expression of miRNAs, could represent an innovative theranostic approach to identify this HVPG response to NSBBs. We found that HVPG responders to NSBBs had lower baseline serum levels of miR-452-5p and miR-429, suggesting their potential clinical utility as prognostic of the portal pressure response to NSBBs. Similarly, other miRNAs, such as miR-19a, miR-101, and let-7c, which regulate  $\beta$ 1-adrenergic receptors, and other beta-blocker pharmacodynamics-related genes, have been associated with the antihypertensive response to beta-blockers.<sup>(33)</sup>

Elucidating the biological functions of individual miRNAs is complex as they may influence several messenger RNAs and more than one miRNA can regulate one messenger RNA. The search of biomarkers is further complicated by the fact that the underlying mechanisms of the clinical processes addressed in this study, i.e., refractory ascites, HVPG response to NSBBs, are multifactorial. Most of the miRNAs shown here to correlate with clinical outcomes in decompensated cirrhosis have also been associated with disorders of renal function and cardiocirculatory dysfunction, all of which are involved in chronic liver disease progression. In this context, miR-181b-5p, which served to identify the most severe stage of cirrhosis (refractory ascites), has been related to proliferation and activation of hepatic stellate cells<sup>(34,35)</sup> and cardiovascular remodeling.<sup>(36-38)</sup> Accordingly, miR-181b-5p has been proposed as a marker of fibrosis severity in chronic liver disease,<sup>(39)</sup> disease progression in chronic hepatitis B,<sup>(40)</sup> and cardiac dysfunction in diabetic cardiomyopathy.<sup>(38)</sup> However, it is likely that the role of miRNAs in modifying biological processes involves more their cooperation to regulate gene networks and repress one



or more target genes than individual actions. Our analysis of the functions possibly overrepresented in the set of genes regulated by our novel signature revealed their involvement largely in the response to hypoxia by the control of critical genes involved in the apoptotic process, such as BCL2 or XIAP. Hypoxia plays a pivotal role in the natural history of cirrhosis as it stimulates angiogenesis, inhibits cell proliferation factors, and promotes fibrogenesis, contributing to progressive portal hypertension and hyperdynamic circulation.<sup>(41)</sup>

We acknowledge certain limitations of our study. First, its exploratory nature and limited sample size means its results need to be validated in larger cohorts. Second, the miRNA signature identified as representative of changes in the secretome of the hepatocytes from cirrhotic livers was identified and sequenced from small EVs, whereas we analyzed individual miRNAs in total serum. We ruled out our initial plan to only isolate small EVs in the serum samples because there is no efficient method to obtain these vesicles from blood, especially in a large number of samples already collected and aliquoted in small volumes. To avoid losing information, we move toward a more reproducible and pragmatic approach that does not require sophisticated equipment to facilitate clinical use. Thus, using a commercial kit, we isolated the whole RNA content of the sample, including that associated with small EVs and exosomes, and then analyzed the individual miRNAs of the signature. It could also be argued that miRNAs are produced by multiple cell types and miRNAs in primary cell cultures may differ from those in circulation. However, our study does not attempt to identify the cell source of the miRNAs but rather their validity as biomarkers in a specific pathological context, namely, for the non-invasive identification of patients in whom NSBBs could be futile or harmful. Finally, validation of the miRNA signature should include cirrhosis etiologies other than alcohol because the latter was the cause of cirrhosis in the livers from which primary human hepatocytes were obtained as well as the most frequent etiology of cirrhosis in our patient series.

In conclusion, this study identifies a novel circulating miRNA signature that allows for the molecular characterization of patients with decompensated cirrhosis. The up-regulation of miRNA 181b-5p was identified as a feature of refractory ascites. In addition, the down-regulation of miRNA 452-5p and 885-5p

was found to reflect the magnitude of hemodynamic impairment that occurs in these patients as these miRNAs identify patients with severe circulatory dysfunction who are more likely to develop systolic cardiac impairment in response to beta-blockade. Finally, down-regulation of miR-452-5p and miR-429 identified patients more likely to have a significant reduction in portal pressure when treated with NSBBs. The present proof-of-concept study indicates that miRNAs are distinctive biomarkers of advanced decompensated cirrhosis and of relevant clinical outcomes, including the patient response to treatment with NSBBs.

*Acknowledgment:* We thank the Hospital Universitario Ramon y Cajal-IRYCIS Biobank, Genome Analysis Platform of CIC bioGUNE (headed by Ana Maria Aransay), and Bioinformatics service of CIBERehd (headed by Juanjo Lozano) for their support in RNA sequencing analysis. We also thank the Spanish Ministry for the Severo Ochoa Excellence Accreditation (SEV-2016-0644) of CIC bioGUNE.

## REFERENCES

- 1) Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92-105.
- 2) Diehl P, Fricke A, Sander L, Stamm J, Bassler N, Htun N, et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res* 2012;93:633-644.
- 3) Szabo G, Bala S. MicroRNAs in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:542-552.
- 4) D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006;44:217-231.
- 5) Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: in search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology* 2010;51:1445-1449.
- 6) Krag A, Wiest R, Albillos A, Gluud LL. The window hypothesis: haemodynamic and non-haemodynamic effects of beta-blockers improve survival of patients with cirrhosis during a window in the disease. *Gut* 2012;61:967-969.
- 7) Téllez L, Ibáñez-Samaniego L, Pérez del Villar C, Yotti R, Martínez J, Carrión L, et al. Non-selective beta-blockers impair global circulatory homeostasis and renal function in cirrhotic patients with refractory ascites. *J Hepatol* 2020; doi:https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.05.011.
- 8) de Franchis R; Baveno VI Faculty. Expanding consensus in portal hypertension: report of the Baveno VI Consensus Workshop: stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J Hepatol* 2015;63:743-752.
- 9) Villanueva C, Aracil C, Colomo A, Hernandez-Gea V, Lopez-Balaguer JM, Alvarez-Urturi C, et al. Acute hemodynamic response to beta-blockers and prediction of long-term outcome in primary prophylaxis of variceal bleeding. *Gastroenterology* 2009;137:119-128.

- 10) Hernandez-Gea V, Aracil C, Colomo A, Garupera I, Poca M, Torras X, et al. Development of ascites in compensated cirrhosis with severe portal hypertension treated with beta-blockers. *Am J Gastroenterol* 2012;107:418-427.
- 11) Villanueva C, Albillos A, Genesca J, Abraldes JG, Calleja JL, Aracil C, et al. Development of hyperdynamic circulation and response to beta-blockers in compensated cirrhosis with portal hypertension. *Hepatology* 2016;63:197-206.
- 12) Villanueva C, Albillos A, Genesca J, Garcia-Pagan JC, Calleja JL, Aracil C, et al. beta blockers to prevent decompensation of cirrhosis in patients with clinically significant portal hypertension (PREDESC): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* 2019;393:1597-1608. Erratum in: *Lancet* 2019;PMID:31232370.
- 13) Sersté T, Melot C, Francoz C, Durand F, Rautou P-E, Valla D, et al. Deleterious effects of beta-blockers on survival in patients with cirrhosis and refractory ascites. *Hepatology* 2010;52:1017-1022.
- 14) Ortega-Ribera M, Fernández-Iglesias A, Illa X, Moya A, Molina V, Maeso-Díaz R, et al. Resemblance of the human liver sinusoid in a fluidic device with biomedical and pharmaceutical applications. *Biotechnol Bioeng* 2018;115:2585-2594.
- 15) Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006;Chapter 3:Unit 3.22.
- 16) Gracia-Sancho J, Manicardi N, Ortega-Ribera M, Maeso-Díaz R, Guiké-Muntet S, Fernández-Iglesias A, et al. Emricasan ameliorates portal hypertension and liver fibrosis in cirrhotic rats through a hepatocyte-mediated paracrine mechanism. *Hepatol Commun* 2019;3:987-1000.
- 17) Pirola CJ, Fernández Gianotti T, Castaño 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;64:800-812.
- 18) 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:e23937.
- 19) Xing TJ, Jiang DF, Huang JX, Xu ZL. Expression and clinical significance of miR-122 and miR-29 in hepatitis B virus-related liver disease. *Genet Mol Res* 2014;13:7912-7918.
- 20) **Schwarzenbach H, da Silva AM**, Calin G, Pantel K. Data normalization strategies for microRNA quantification. *Clin Chem* 2015;61:1333-1342.
- 21) Moore KP, Wong F, Gines P, Bernardi M, Ochs A, Salerno F, et al. The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. *Hepatology* 2003;38:258-266.
- 22) **Yotti R, Ripoll C**, Benito Y, Catalina MV, Elizaga J, Rincón D, et al. Left ventricular systolic function is associated with sympathetic nervous activity and markers of inflammation in cirrhosis. *Hepatology* 2017;65:2019-2030.
- 23) Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 2012;16:284-287.
- 24) Andres-Leon E, Gonzalez Pena D, Gomez-Lopez G, Pisano DG. miRGate: a curated database of human, mouse and rat miRNA-mRNA targets. *Database (Oxford)* 2015;2015:bav035.
- 25) **Bala S, Petrusek J**, Mundkur S, Catalano D, Levin I, Ward J, et al. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology* 2012;56:1946-1957.
- 26) Murakami Y, Kawada N. MicroRNAs in hepatic pathophysiology. *Hepatol Res* 2017;47:60-69.
- 27) **Loosen SH, Schueller F**, Trautwein C, Roy S, Roderburg C. Role of circulating microRNAs in liver diseases. *World J Hepatol* 2017;9:586-594.
- 28) do Amaral AE, Cisolotto J, Creczynski-Pasa TB, de Lucca Schiavon L. Circulating miRNAs in nontumoral liver diseases. *Pharmacol Res* 2018;128:274-287.
- 29) Waidmann O, Koberle V, Brunner F, Zeuzem S, Piiper A, Kronenberger B. Serum microRNA-122 predicts survival in patients with liver cirrhosis. *PLoS One* 2012;7:e45652.
- 30) Trebicka J, Anadol E, Elfimova N, Strack I, Roggendorf M, Viazov S, et al. Hepatic and serum levels of miR-122 after chronic HCV-induced fibrosis. *J Hepatol* 2013;58:234-239.
- 31) Amaral AED, Rode MP, Cisolotto J, Silva TED, Fischer J, Mاتیollo C, et al. MicroRNA profiles in serum samples from patients with stable cirrhosis and miRNA-21 as a predictor of transplant-free survival. *Pharmacol Res* 2018;134:179-192.
- 32) Liu C-H, Ampuero J, Gil-Gómez A, Montero-Vallejo R, Rojas Á, Muñoz-Hernández R, et al. miRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2018;69:1335-1348.
- 33) Solayman MH, Langae TY, Gong Y, Shahin MH, Turner ST, Chapman AB, et al. Effect of plasma microRNA on antihypertensive response to beta blockers in the Pharmacogenomic Evaluation of Antihypertensive Responses (PEAR) studies. *Eur J Pharm Sci* 2019;131:93-98.
- 34) **Wang B, Li W, Guo K, Xiao Y**, Wang Y, Fan J. miR-181b promotes hepatic stellate cells proliferation by targeting p27 and is elevated in the serum of cirrhosis patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;421:4-8.
- 35) Yu F, Lu Z, Chen B, Dong P, Zheng J. Identification of a novel lincRNA-p21-miR-181b-PTEN signaling cascade in liver fibrosis. *Mediators Inflamm* 2016;2016:9856538.
- 36) Hori D, Dunkerly-Eyring B, Nomura Y, Biswas D, Steppan J, Henao-Mejia J, et al. miR-181b regulates vascular stiffness age dependently in part by regulating TGF-beta signaling. *PLoS One* 2017;12:e0174108.
- 37) Di Gregoli K, Mohamad Anuar NN, Bianco R, White SJ, Newby AC, George SJ, et al. MicroRNA-181b controls atherosclerosis and aneurysms through regulation of TIMP-3 and elastin. *Circ Res* 2017;120:49-65.
- 38) Copier CU, Leon L, Fernandez M, Contador D, Calligaris SD. Circulating miR-19b and miR-181b are potential biomarkers for diabetic cardiomyopathy. *Sci Rep* 2017;7:13514.
- 39) **Chen Y-J, Zhu J-M, Wu H**, Fan J, Zhou J, Hu J, et al. Circulating microRNAs as a fingerprint for liver cirrhosis. *PLoS One* 2013;8:e66577.
- 40) Yu F, Zhou G, Li G, Chen B, Dong P, Zheng J. Serum miR-181b is correlated with hepatitis B virus replication and disease progression in chronic hepatitis B patients. *Dig Dis Sci* 2015;60:2346-2352.
- 41) Fernandez M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009;50:604-620.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found at [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep4.1642/supinfo](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep4.1642/supinfo).

