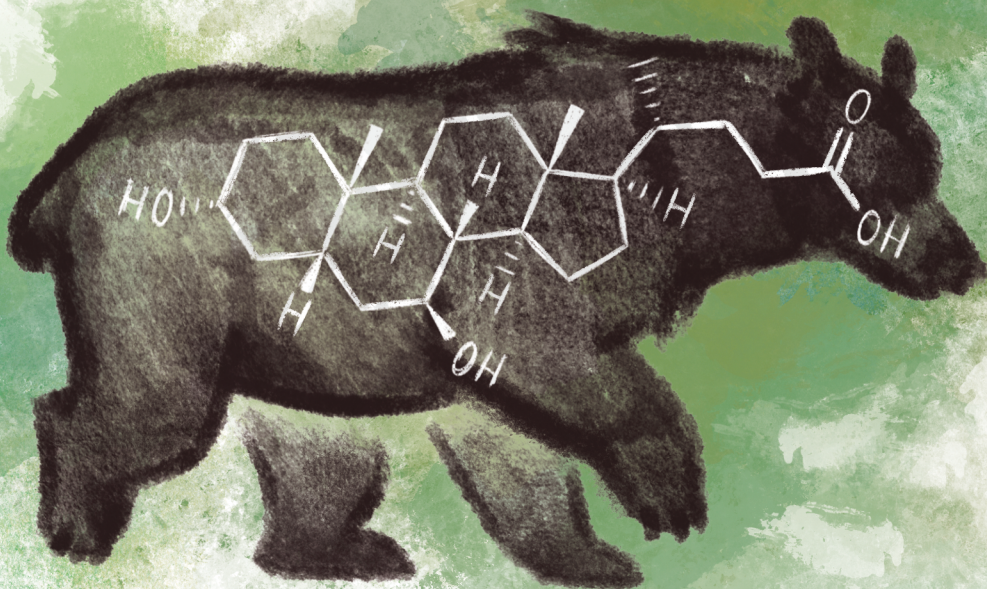


VNiVERSiDAD D SALAMANCA

Facultad de Farmacia

Departamento de Fisiología y Farmacología



**HIPERTRANSAMINASEMIA ASOCIADA A DEFICIENCIA
DE ACOX2 (HADA): AVANCES EN LA ETIOPATOGENIA,
TRATAMIENTO Y DESARROLLO
DE MODELOS EXPERIMENTALES**

Tesis Doctoral

Ricardo Antonio Espinosa Escudero

2022

La bilis del oso negro asiático (*Ursus thibetanus*) se ha utilizado durante siglos en la medicina tradicional china como tratamiento de diversas afecciones hepatobiliares. Sus propiedades terapéuticas se deben a la presencia en grandes cantidades de ácido ursodesoxicólico, una molécula colerética con efecto antioxidante, antiapoptótico e inmunomodulador.

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**HIPERTRANSAMINASEMIA ASOCIADA A DEFICIENCIA
DE ACOX2 (HADA): AVANCES EN LA ETIOPATOGENIA,
TRATAMIENTO Y DESARROLLO DE MODELOS
EXPERIMENTALES**

TESIS DOCTORAL

RICARDO ANTONIO ESPINOSA ESCUDERO

2022

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**HIPERTRANSAMINASEMIA ASOCIADA A DEFICIENCIA
DE ACOX2 (HADA): AVANCES EN LA ETIOPATOGENIA,
TRATAMIENTO Y DESARROLLO DE MODELOS
EXPERIMENTALES**

Memoria que presenta **D. Ricardo Antonio Espinosa
Escudero** para optar al Título de Doctor por la Universidad de
Salamanca

Salamanca, 14 de julio de 2022

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Hipertransaminasemia Asociada a Deficiencia de ACOX2 (HADA): avances en la etiopatogenia, tratamiento y desarrollo de modelos experimentales" presentada por D. Ricardo Antonio Espinosa Escudero para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los Drs. D. José Juan García Marín y D^a. María Jesús Monte Río, Catedráticos del Departamento de Fisiología y Farmacología, y la Dra. D^a. Elisa Herráez Aguilar, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 14 de julio de 2022.

Fdo. José Juan García Marín

D^a. MARÍA JESÚS MONTE RÍO, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOPATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Hipertransaminasemia Asociada a Deficiencia de ACOX2 (HADA): avances en la etiopatogenia, tratamiento y desarrollo de modelos experimentales" presentada por D. Ricardo Antonio Espinosa Escudero para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los Drs. D. José Juan García Marín y D^a. María Jesús Monte Río, Catedráticos del Departamento de Fisiología y Farmacología, y la Dra. D^a. Elisa Herráez Aguilar, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 14 de julio de 2022.

Fdo. M^a Jesús Monte Río

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, D^a. MARÍA JESÚS MONTE RÍO, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, Y D^a ELISA HERRÁEZ AGUILAR, PROFESORA CONTRATADA DOCTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada "Hipertransaminasemia Asociada a Deficiencia de ACOX2 (HADA): avances en la etiopatogenia, tratamiento y desarrollo de modelos experimentales" presentada por D. Ricardo Antonio Espinosa Escudero para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a día 14 de julio de 2022.

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. María Jesús Monte Río

Fdo. Elisa Herráez Aguilar

FINANCIACIÓN

El doctorando ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de un Contrato de Investigación Predoctoral cofinanciado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo (EDU/574/2018).

El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido en parte financiado con cargo al CIBERehd (Instituto de Salud Carlos III) y a los siguientes Proyectos de Investigación:

Consejería de Educación, Junta de Castilla y León. Proyecto SA063P17. “Deficiencia parcial de ACOX2 (APD): una nueva enfermedad rara (OMIM-601641) que cursa con riesgo oculto de lesión hepática”. Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2017-2019.

Fundación AECC Investigación contra el cáncer. Proyectos cáncer infantil y cáncer poco frecuente 2017. "Estudio multidisciplinar del colangiocarcinoma: diagnóstico, patogenia y nuevas terapias". Coordinador: Jesús María Bañales Asurmendi. Investigador principal de la Universidad de Salamanca: José Juan García Marín. Periodo: 2018-2020.

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Proyectos de Investigación en Salud (AES 2019). Proyecto PI19/00819. “Interés pronóstico y terapéutico de las proteínas SLC y ABC en adenocarcinomas hepáticos y gastrointestinales” Investigador principal: José Juan García Marín; Óscar Briz Sánchez (coIP). Periodo: 2020-2022.

Fundación La Marató de TV3. Proyecto 201916-31 “Contribution of mitochondrial oxysterol and bile acid metabolism to liver carcinogenesis”. Coordinador: José Carlos Fernández Checa. Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2020-2023.

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Proyectos de Investigación en Salud (AES 2020) Modalidad proyectos en salud cofinanciados con Fondos FEDER. Proyecto PI20/00189 “Identificación de biomarcadores diagnóstico y pronóstico en pacientes con cáncer biliar”. Investigadora Principal: Rocío I Rodríguez Macías. Periodo: 2021-2023.

Consejería de Educación, Junta de Castilla y León. Programa de apoyo a proyectos de investigación 2020. Proyecto SA074P20 “Reajustes personalizados en el tratamiento farmacológico del carcinoma hepatocelular basados en la heterogeneidad tumoral y la aparición de sensibilización colateral”. Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2021-2023.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido publicados como artículos en las siguientes revistas:

Alonso-Peña M, **Espinosa-Escudero R**, Herraiez E, Briz O, Cagigal ML, Gonzalez-Santiago JM, Ortega-Alonso A, Fernandez Rodriguez C, Bujanda L, Calvo Sanchez M, D'Avola D, Londoño MC, Diago M, Fernandez-Checa JC, Garcia-Ruiz C, Andrade RJ, Lammert F, Prieto J, Crespo J, Juamperez J, Diaz-Gonzalez A, Monte MJ, Marin JJG. Beneficial Effect of Ursodeoxycholic Acid in Patients with ACOX2 Deficiency-Associated Hypertransaminasemia. *Hepatology*, 2022 Apr 8. *Online ahead of print*.

Espinosa-Escudero R, Herraiez E, Sanchez-Martin A, Sanchon-Sanchez P, Marin JJG, Monte MJ. Cholestasis Associated to Inborn Errors in Bile Acid Synthesis. *Exploration of Digestive Diseases*. *Accepted, not published*.

Los resultados de esta Tesis Doctoral se han publicado en forma de abstract en las siguientes revistas:

Alonso-Peña M, Hermanns HM, Herráez E, Briz O, Monte MJ, Sánchez-Martín M, Berrocal P, García-Tuñón I, **Espinosa-Escudero RA**, Prieto J, Geier A, Marín JJG. Mecanismos implicados en la disminución de la expresión/función de la enzima Acil-CoA oxidasa 2 (ACOX2) que conduce a estrés oxidativo y estrés de retículo endoplásmico en los hepatocitos. *Gastroenterología y Hepatología*. 2019;42:34.

Alonso-Peña M, Hermanns HM, Herráez E, Briz O, Monte MJ, Sánchez-Martín M, Berrocal P, García-Tuñón I, **Espinosa-Escudero RA**, Prieto J, Geier A, Marín JJG. Genetic and pathophysiological factors leading to deficient acyl-CoA oxidase 2 (ACOX2) activity in hepatocytes, an alteration which causes oxidative and endoplasmic reticulum stress in liver cells. *Journal of Hepatology*. 2019;70(Suppl.):e579.

Monte MJ, Alonso-Peña M, **Espinosa-Escudero R**, Herráez E, Briz O, Cagigal ML, Ortega-Alonso A, Fernández Rodríguez C, Bujanda L, Calvo Sánchez M, D'Avola D, González-Santiago JM, Andrade RJ, Lammert F, Crespo J, Díaz-González A, Juampérez J, Prieto J, Marín JJG. Déficit de acil-CoA oxidasa 2 (ACOX2) como potencial causa de hipertransaminasemia no filiada. *Gastroenterología y Hepatología* 44 (Especial Congreso). 2021; 3.

Alonso-Peña M, **Espinosa-Escudero R**, Herraez E, Briz O, Cagigal ML, Gonzalez-Santiago JM, Ortega-Alonso A, Fernandez Rodriguez C, L Bujanda, M Calvo Sanchez, D D'Avola, M-C Londoño, M Diago, JC Fernandez-Checa, Garcia-Ruiz C, Andrade RJ, Lammert F, Prieto J, Crespo J, Juamperez J, Diaz-Gonzalez A, Monte MJ, Marin JJG. ACOX2 deficiency-induced liver fragility (ADILF), a not-so-rare inborn error in bile acid metabolism that responds to ursodeoxycholic acid treatment. *Journal of Hepatology*, 77(S1), S59-S60, 2022.

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos:

Espinosa-Escudero RA, Alonso-Peña M, Briz O, Herráez E, Monte MJ, Sánchez Martín M, Berrocal P, García-Tuñón I, Prieto J, Marín JJG. Desarrollo de un modelo experimental in vivo en ratón de deficiencia parcial de Acil-CoA oxidasa 2 (ACOX2), que cursa con alteraciones en la síntesis de ácidos biliares. 1ª Reunión de Hepatología Traslacional: Status Quo y nuevos horizontes en el estudio del hígado. San Sebastián, 2019. Asociación Española para el Estudio del Hígado.

Serrano MA, Alonso-Peña M, **Espinosa-Escudero RA**, Briz O, Herráez E, Monte MJ, Hermanns HM, Sánchez-Martín M, Berrocal P, García-Tuñón I, Prieto J, Geier A, Marín JJG. Factors leading to deficient acyl-CoA oxidase 2 (ACOX2), an alteration which causes oxidative and endoplasmic reticulum stress in liver cells. 41 Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y

Biología Molecular. Madrid, 2019. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

Espinosa Escudero R. Twin peaks: desenmascarando una enfermedad rara. Ponencia. Farmaforum 2019 – Farmacia Verde: Innovando cada día por un mundo mejor. Salamanca, 2019. Facultad de Farmacia de Salamanca.

Alonso-Peña M, Hermanns HM, Herraez E, Briz O, Monte MJ, Sanchez-Martin M, Berrocal P, García-Tuñón I, **Espinosa-Escudero RA**, Prieto J, Geier A, Marin JJG. Genetic and pathophysiological factors leading to deficient acyl-CoA oxidase 2 (ACOX2) activity in hepatocytes, an alteration which causes oxidative and endoplasmic reticulum stress in liver cells. The International Liver Congress 2019. Viena, Austria, 2019. European Association for the Study of the Liver.

Alonso-Peña M, Hermanns HM, Herráez E, Briz O, Monte MJ, Sánchez-Martín M; Berrocal P, García-Tuñón I, **Espinosa-Escudero RA**, Prieto J; Geier A, Marín JJG. Mecanismos implicados en la disminución de la expresión/función de la enzima Acil-CoA Oxidasa 2 (ACOX2) que conduce a estrés oxidativo y estrés de retículo endoplásmico en los hepatocitos. 44º Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid, 2019. Asociación Española para el Estudio del Hígado.

Espinosa-Escudero R, Alonso-Peña M, Herráez E, Monte MJ, Briz O, Sánchez-Martín M, García-Tuñón I, Berrocal P, Cives-Losada C, S. de Blas B, Prieto J, Marín JJG. Toxicidad del ácido trihidroxicolestanoico (THCA) en modelos in vitro e in vivo de Deficiencia Parcial de Acil-CoA Oxidasa 2 (ACOX2). XIV Jornadas CIBER Enfermedades Hepáticas y Digestivas. Online, 2020. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas.

Monte MJ, Alonso-Peña M, **Espinosa-Escudero R**, Herráez E, Briz O, Cagigal ML, Ortega-Alonso A, Fernández Rodríguez C, Bujanda L, Calvo Sánchez M, D'Avola D, González-Santiago JM, Andrade RJ, Lammert F, Crespo J, Díaz-González A, Juampérez J, Prieto J, Marín JJG. Déficit de acil-

CoA oxidasa 2 (ACOX2) como potencial causa de hipertransaminasemia no filiada. 46º Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH), Madrid, 2021. Asociación Española para el Estudio del Hígado.

Espinosa-Escudero R, Alonso-Peña M, Herráez E, Briz O, Monte MJ, Hermanns HM, Geier A, Marín JJG. Papel de receptores nucleares y citoquinas inflamatorias en la regulación de las enzimas peroxisomales implicadas en la biosíntesis de ácidos biliares. 43rd Annual meeting of the Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology (SEBBM). Online, 2021. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

R Espinosa-Escudero R, Alonso-Peña M, Herraiez E, Briz O, Cagigal ML, Gonzalez-Santiago JM, Ortega-Alonso A, Fernandez Rodriguez C, L Bujanda, M Calvo Sanchez, D D'Avola, M-C Londoño, M Diago, JC Fernandez-Checa, Garcia-Ruiz C, Andrade RJ, Lammert F, Prieto J, Crespo J, Juamperez J, Diaz-Gonzalez A, Monte MJ, Marin JJG. Identificación de nuevos casos de hipertransaminasemia asociada a la alteración en el metabolismo de ácidos biliares por deficiencia en acil-CoA oxidasa 2. 3º Reunión de Hepatología Traslacional (AEHH) "Enfermedad hepática metabólica: del hígado graso a la cirrosis y sus complicaciones". Alicante, 2021. Asociación Española para el Estudio del Hígado.

Macías RIR, **Espinosa-Escudero R**, Alonso-Peña M, Herraiez E, Briz O, Cagigal ML, Gonzalez-Santiago JM, Ortega-Alonso A, Fernandez Rodriguez C, L Bujanda, M Calvo Sanchez, D D'Avola, M-C Londoño, M Diago, JC Fernandez-Checa, Garcia-Ruiz C, Andrade RJ, Lammert F, Prieto J, Crespo J, Juamperez J, Diaz-Gonzalez A, Monte MJ, Marin JJG. Identificación de nuevos casos de hipertransaminasemia asociada a la alteración en el metabolismo de ácidos biliares por deficiencia en Acil-CoA oxidasa 2. XV Jornadas Científicas CIBERehd. Barcelona, 2021. Centro de Investigación Biomédica en Red – Enfermedades hepáticas y digestivas.

Espinosa-Escudero R, Alonso-Peña M, Herraiez E, Briz O, Cagigal ML, Gonzalez-Santiago JM, Ortega-Alonso A, Fernandez Rodriguez C, L Bujanda,

M Calvo Sanchez, D D'Avola, M-C Londoño, M Diago, JC Fernandez-Checa, Garcia-Ruiz C, Andrade RJ, Lammert F, Prieto J, Crespo J, Juamperez J, Diaz-Gonzalez A, Monte MJ, Marin JJG. Beneficial effect of ursodeoxycholic acid in patients with ACOX2 deficiency-associated hypertransaminasemia. I Jornada de encuentro entre grupos de investigación del IBSAL. Salamanca, 2022. Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca.

Alonso-Peña M, **Espinosa-Escudero R**, Herraiez E, Briz O, Cagigal ML, Gonzalez-Santiago JM, Ortega-Alonso A, Fernandez Rodriguez C, Bujanda L, Calvo Sanchez M, D'Avola D, Londoño MC, Diago M, Fernandez-Checa JC, Garcia-Ruiz C, Andrade RJ, Lammert F, Prieto J, Crespo J, Juamperez J, Diaz-Gonzalez A, Monte MJ, Marin JJG. ACOX2 Deficiency-Associated Hypertransaminasemia (ADAH), a not-so-rare inborn error in bile acid metabolisms that responds to ursodeoxycholic acid treatment. International Liver Congress (EASL). Londres, Reino Unido, 2022. European Association for the Study of the Liver.

Monte MJ, **Espinosa-Escudero R**, Alonso-Peña M, Herraiez E, Macias RIR, Briz O, Berrocal P, García-Tuñon I, Prieto J, Sanchez-Martin M, Marin JJG. Development of *in vitro* and *in vivo* models to study ACOX2 Deficiency-Associated Hypertransaminasemia (ADAH). XXVI International Bile Acid Meeting. Amsterdam, Países Bajos, 2022. Falk Foundation.

Alonso-Peña M, **Espinosa-Escudero R**, Herraiez E, Briz O, Cagigal ML, Gonzalez-Santiago JM, Ortega-Alonso A, Fernandez Rodriguez C, Bujanda L, Calvo Sanchez M, D'Avola D, Londoño MC, Diago M, Fernandez-Checa JC, Garcia-Ruiz C, Andrade RJ, Lammert F, Prieto J, Crespo J, Juamperez J, Diaz-Gonzalez A, Monte MJ, Marin JJG. Beneficial Effect of Ursodeoxycholic Acid in Patients with ACOX2 Deficiency-Associated Hypertransaminasemia (ADAH). XXVI International Bile Acid Meeting. Amsterdam, Países Bajos, 2022. Falk Foundation.

Además, durante el periodo de desarrollo de esta Tesis Doctoral, el doctorando ha colaborado en varios proyectos de investigación, que han dado lugar a las siguientes contribuciones científicas:

Publicaciones

Alonso-Peña M, Sánchez Martín A, Sanchon-Sanchez P, Soto-Muñiz M, **Espinosa-Escudero RA**, Marin JJG. Pharmacogenetics of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Cancer Drug Resistance*. 2019;2:680-709.

Alonso-Peña M, **Espinosa-Escudero RA**, Soto-Muñiz M; Sanchon-Sanchez P, Sánchez Martín A, Marin JJG. Role of transportome in the pharmacogenomics of hepatocellular carcinoma and hepatobiliary cancer. *Pharmacogenomics*. 2019;20(13):957-970.

Marin JJG, Macias RIR, Monte MJ, Herraes E, Peleteiro-Vigil A, Sanchez de Blas B, Sanchon-Sanchez P, Temprano AG, **Espinosa-Escudero RA**, Lozano E, Briz O, Romero MRR. Cellular mechanisms accounting for the refractoriness of colorectal carcinoma to pharmacological treatment. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):e2605.

Marin JJG, Macias RIR, Monte MJ, Romero MRR, Asensio m, Sánchez Martín A, Cives-Losada C, Temprano AG, **Espinosa-Escudero RA**, Reviejo M, Bohorquez LH, Briz O. Molecular bases of drug resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):e1663.

Abstracts

Conde de la Rosa L, Ribas Serra V, **Espinosa-Escudero R**, Marín JJG, García Ruiz C, Fernández Checa JC. AASLD - The liver meeting. *Hepatology*. 2019;70(S1):164A.

Temprano AG, Sanchez de Blas B, **Espinosa-Escudero RA**, Cives-Losada C, Lozano E, Briz O, Perez-Melero C, Bermejo F, Romero M, Marin JJG. Extracorporeal non-invasive assessment of the hepatobiliary function using novel bile acid derivatives with near-infrared fluorescence. *Journal of Hepatology*. 2021;75(2):S631.

Romero MR, Temprano AG, Sánchez de Blas B, **Espinosa-Escudero R**, Cives-Losada C, Lozano E, Briz O, Monte MJ, Perez-Melero C, Bermejo F, Marín JJG. Determinación extracorpórea no invasiva de la función hepatobiliar utilizando nuevos derivados de ácidos biliares con fluorescencia en el infrarrojo cercano. *Gastroenterología y Hepatología* 45 (Espec Congr 2). 2022:108.

Comunicaciones a Congresos

Herráez E, Monte MJ, Macías RIR, Sanchón-Sánchez P, **Espinosa-Escudero RA**, Pérez MJ, Serrano MA, Marín MJM. Impaired expression in liver and placenta of key genes involved in progesterone metabolism during cholestasis of pregnancy. 41 Congreso de la SEBBM – Santander, 2018. Santander. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

Pérez Silva L, **Espinosa-Escudero RA**, Lozano E, Al-Abdulla R; Macías RIR, Herráez E; Bañales J, Bujanda L, Briz O, Serrano MA; Marín JJG. Papel de las bombas ABCC4 y ABCC5 en la quimiorresistencia del cáncer gástrico. 41 Congreso de la SEBBM - Santander 2018. Participación tipo póster. Santander, 2018. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

Herráez E, Monte MJ, Macías RIR, Sanchón-Sánchez P, **Espinosa Escudero RA**, Pérez MJ, Serrano MA, Marín JJG. Impaired expression in liver and placenta of key genes involved in progesterone metabolism during cholestasis of pregnancy. XXXIX Congreso de la SECF. Cádiz, 2018. Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas.

Conde de la Rosa L, Ribas V, **Espinosa-Escudero R**, Marín JJG, García Ruiz C, Fernández Checa JC. Role of StARD1 in cholestatic liver injury. AASLD - The liver meeting. Boston, EE.UU., 2019. American Association for the Study of the Liver Diseases.

Pérez Silva L, Al-Abdulla R; **Espinosa Escudero RA**; Lozano E, Herráez E, Macías RIR, Segué Merino N, Abad Hernández M, Briz O, Bujanda L, Marín JJG. Papel de las proteínas exportadoras de fármacos ABCC4 y ABCC5 en la quimiorresistencia del cáncer gástrico. 22ª Reunión Anual de la Asociación

Española de Gastroenterología. Madrid, 2019. Asociación Española de Gastroenterología.

Temprano AG, Sanchez de Blas B, **Espinosa-Escudero RA**, Cives-Losada C, Lozano E, Briz O, Perez-Melero C, Bermejo F, Romero MRR, Marin JJG. Extracorporeal non-invasive assessment of the hepatobiliary function using novel bile acid derivatives with near-infrared fluorescence. The Digital International Liver Congress 2021. Online, 2021.

Temprano AG, Sánchez de Blas B, **Espinosa-Escudero RA**, Cives-Losada C, Lozano E, Briz O, Pérez-Melero C, Bermejo F, Romero MRR, Marín JJG. Determinación extracorpórea no invasiva de la función hepatobiliar utilizando nuevos derivados de ácidos biliares con fluorescencia en el infrarrojo cercano. 3º Reunión de Hepatología Traslacional (AEHH) "Enfermedad hepática metabólica: del hígado graso a la cirrosis y sus complicaciones". Alicante, 2021. Asociación Española para el Estudio del Hígado.

Asensio M, Temprano AG, Sánchez de Blas B, **Espinosa-Escudero RA**, Cives-Losada C, Lozano E, Briz O, Pérez-Melero C, Bermejo F, Romero MRR, Marín JJG. Determinación extracorpórea no invasiva de la función hepatobiliar utilizando nuevos derivados de ácidos biliares con fluorescencia en el infrarrojo cercano. XV Jornadas Científicas CIBERehd. Barcelona, 2021. Centro de Investigación Biomédica en Red – Enfermedades hepáticas y digestivas.

Romero MR, Temprano AG, Sánchez de Blas B, **Espinosa-Escudero RA**, Cives-Losada C, Lozano E, Briz O, Pérez-Melero C, Bermejo F, Marín JJG. Determinación extracorpórea no invasiva de la función hepatobiliar utilizando nuevos derivados de ácidos biliares con fluorescencia en el infrarrojo cercano. 47º Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Madrid, 2022. Asociación Española para el Estudio del Hígado.

Romero MR, Sánchez de Blas B, Temprano AG, **Espinosa-Escudero RA**, Cives-Losada C, Cinca-Fernando P, Lozano E, Briz O, Mori M, Monte MJ, Pérez-Melero C, Bermejo F, Marín JJG. Usefulness of novel bile acid derivatives with near-infrared fluorescence for extracorporeal non-invasive real-time determination of the hepatobiliary function. XXVI International Bile Acid Meeting. Amsterdam, Países Bajos, 2022. Falk Foundation.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores:

Al Dr. José Juan García Marín, por ser un maestro paciente, cercano y comprensivo. Gracias por hacerme crecer como investigador y como persona, y por enseñarme a poner la vela de mi barco siempre en la dirección correcta.

A la Dra. María Jesús Monte Río, que me inculcó el amor por la docencia de la Fisiología y el trabajo en el HPLC-MS/MS. Gracias por recibirme en tu despacho siempre con una sonrisa y dispuesta a ayudarme con mis problemas.

A la Dra. Elisa Herráez Aguilar, mi “Capi” y madre, por no dejar que me rindiese nunca. Gracias por hacer el esfuerzo de regalarme un tiempo que ni siquiera tenías, y por ser el catalizador de madurez que necesitaba.

Al resto de miembros de HEVEPHARM y colaboradores:

A la Dra. M^a Ángeles Serrano, por ser el mejor ejemplo de fuerza de voluntad y superación, especialmente en estos últimos meses tan difíciles. Gracias por ser una gran inspiración científica y personal, siempre pendiente de nosotros.

A la Dra. Rocío I. R. Macías, por toda la ayuda prestada en esta Tesis y los agradables ratos de conversación junto al criostato. Gracias por enseñarme el valor del trabajo minucioso y detallista, aderezado con cariño y dulzura.

Al Dr. Óscar Briz, mi “tito”, que siempre tuvo las puertas abiertas para las consultas a deshora. Gracias por tu paciencia, tu presencia tranquilizadora y el gran esfuerzo para que este trabajo saliera adelante.

A la Dra. Marta R. Romero, con la que di mis primeros pasos en el grupo. Gracias por ser una radiante fuente de alegría y paz, y por todas las conversaciones (café en mano) sobre ciencia o rock que redondeaban el día.

A la Dra. Elisa Lozano, por todo el cariño y esmero que pusiste para enseñarme a volar. Compartir poyata, campana y dulces contigo ha sido una suerte increíble, jefa. Más que si nos hubiera tocado la lotería.

A la Dra. Maitane Asensio, mi madre adoptiva, por ayudarme a mantener la compostura cuando todo se me descalabraba. Gracias por tu paciencia, tu cercanía, tu sinceridad y tu energía positiva.

A la Dra. Marta Alonso, magnífica compañera y colaboradora, pero sobre todo, buena amiga. Gracias por ser la “Chip” de este “Chop”, por compartir conmigo la ilusión por este precioso proyecto y no dejarme caer nunca, Sensei.

A la Dra. Sara Ortiz, mi “prenda”, que entre charlas confidentes y algún que otro mimito, has conseguido reforzar mi amor propio aunque a costa de un impagable esfuerzo. Te debo mil favores.

Al Dr. Álvaro Gacho, la persona con el corazón más grande que he conocido. Me inspiras diariamente con tus cariñosas palabras y tus actos sencillos de amor. Doy gracias a Dios por ponerte en mi camino, una y setenta veces siete.

A la Dra. Ana Peleteiro, por adoptarme desde mi primer día en Salamanca, ser el mejor ejemplo a seguir como veterana y haberme ayudado a que el camino fuera siempre mucho más fácil. Tener una voz preciosa también suma.

A la Dra. Laura P. Silva, por todos los momentos de risas compartidas, ya sea en nuestro rincón del 118 o donde me vieses con necesidad de una palabra de ánimo.

A la Dra. Meraris Soto, por su gracia natural y por divertirnos juntos en cada uno de nuestros encuentros sorpresa por los pasillos.

A Candela, la mejor compañera de laboratorio del mundo, con la que he compartido cientos de aventuras improvisadas. Gracias por los abrazos que siempre llegaban a tiempo, y por guiarme cuando el resto de luces se me apagaban.

A Anabel “*petitsuisse*”, mi eterna compañera en el laboratorio de cultivos, por abrirme nuevos horizontes y compartir juntos música, conversación y a veces un reconfortante silencio.

A Paula, que me llevó a Alicante aun estando en Glasgow. Gracias por tenerme al día de novedades y compartir la carga de nuestros últimos cursos, siempre con un dulce en la mano.

A Bea, por todos los cariñosos achuchones matutinos más necesarios que el café, tu optimismo contagioso, las clases particulares de pádel y los increíbles ratitos de verbeneo que siempre terminaban en el Monumental.

A María, mi novata, la más cuqui de todo el equipo. Gracias por enseñarme a surfear las semanas pensando “que ya es jueves” y por toda la confianza que has depositado en mí a lo largo de estos años. Nunca cambies.

A Nazaret, que ha sido mi grillo de la suerte y me ha cogido de la mano bien fuerte en los momentos más duros de estos últimos meses. Al resto de nuestros alumnos de TFM, Kevin, Vanessa, Marta y Paula, por alegrarnos con vuestra frescura durante este año. A Ana Morente, mi mentoranda, una trabajadora nata a la que le deseo la mayor de las suertes en el camino. A Steffie, que me aportó coraje en el momento oportuno.

A Emilia Flores, por tu jovialidad y buen humor contagiosos, las mañanas sin tus piropos no hubieran sido lo mismo. Gracias tu increíble labor, la cual realizas con todo tu esmero y amor, como una madre.

A la Dra. María José García Pérez. Te echamos mucho de menos.

Al personal del Servicio de Transgénesis, Servicio de Experimentación Animal y Servicio de Secuenciación de Salamanca, por su pulcro trabajo.

A los Drs. Cherkaoui, Andreoletti y Lizard y todo el equipo de BioPeroXIL, que me acogieron en Francia con los brazos abiertos. Y a la Dra. Aline Yaminne, por hacerme sentir como en casa gracias a su dulzura y amabilidad.

A nuestras conserjes, personal de secretaría, de limpieza, copistería y cafetería, por hacernos las cosas lo más fáciles posible.

A mis colegas:

A Raúl, porque Frodo no hubiera llegado tan lejos sin Sam.

A Isa, por todo el cariño y los buenos ratos compartidos en aquel pedacito de Salamanca al que llamamos hogar.

A mis colegas roleros Dani y Juan, que me han ayudado a derrotar a muchos dragones. Y a Álvaro, con el que compartí muchas sendas oscuras hasta que por fin conseguimos salir de la mazmorra.

A Mikel, Jose y Celia, que fueron mi familia en “la Hernán” y han estado ahí para más de una liada. Y al resto de “los Harrelson”, que siempre tuvieron tiempo para tomar una hamburguesa en el TGB y darme palmadas de ánimo junto con una sonrisa cargada de orgullo.

A mis compañeros de la facultad, por los grandes momentos que se quedan en la retina y en el corazón. En especial a Iván Oterino, que ha tenido el don de arreglar todo con una llamada, argumentando que “no tiene importancia quién tira de quién”.

A mis amigas hernanienses de Farmacia, en especial a Elena, Sandra y Marina, por compartir chocolate y abrazos, en los agobios y las alegrías. Y a Pablo, el amigo del carbono, que me hizo enamorarme de la química orgánica.

A Guio, Bea y Marina, que fueron mis escuderas en nuestras divertidas y surrealistas andanzas, me hicieron sentir muy valorado y me dedicaron todo su tiempo y cariño.

A Cris F. Infante y a Carmen Guerrero, que me dieron las fuerzas necesarias para embarcarme en este viaje.

A Mirilú, que siempre tuvo hueco para dar un paseo y ayudarme a distraerme.

A esa gente que tengo lejos pero que en estos años hizo lo posible por estar cerca. A María Juez, por su dulzura. A Marta Salesa, por su risa contagiosa. A Eva M^a Vázquez, mi chica antiarrítmica. A Tito, mi radiólogo de confianza. A Miren, mi vasca favorita. A María Manzano, a la que le debo un abrazo. A Pat, que volvió.

A Susana “Lionrae”, autora de la portada, que ha sabido poner la guinda perfecta a este trabajo.

A mis colegas del pueblo Víctor, Serg, Vicky, Lara, María y Sofía, porque las tardes con ellas son mi mejor medicina.

A la familia Vega Elices, que siempre me ha tratado como a un hijo más.

A Ama, por haber sido mi segunda madre. Y a Jandri, mi hermano de otro vientre. Gracias por cuidarme allá donde estés.

A Cristina del Río, por enseñarme a reconocer a mis monstruos, a aceptarlos y a domarlos para poder seguir adelante.

A Elvira, Paqui, Jose e Isa, que me han visto crecer en la farmacia como persona y como profesional. Gracias por mostrarme el valor del trabajo en equipo.

A mi familia:

A mis tíos Ricardo y Mari Carmen, que me transmitieron su amor por la química y la biología. A mis primos María y Ri, por los veranos juntos repletos de helado, *crepes* y conversaciones algo mordaces. A mi tía Meli y mis primos Carlos y Javi, por todos los ratos de risa desenfadada. A mi tía Zoa, mi más golosa compañía. A mi tía Socorro, que hizo de abuela y siempre tuvo una fe ciega en mí. A la familia Mato Rodríguez, que me ha visto crecer y me ha dado fuerzas en cada paso que he dado.

A mis tíos Alfonso y Floren, por la pasión demostrada en su trabajo. A mis primos Luigi, Gonzalo y Alberto, por su ejemplo de empeño y constancia. A mis tíos Pamela y Alberto, por hacerme sentir como un superhéroe, y a mis primos Pablo y Mario, que me demostraron que lo era. A la familia Orozco López, los mejores *perkins* que uno podría desear.

A mis abuelos, que desde la sencillez me dieron las lecciones vitales más importantes.

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional en cada paso que he dado. Gracias por inculcarme la vocación sanitaria desde pequeño, la capacidad de trabajo y el valor del sacrificio por amor a los demás. Y por ayudarme a levantarme cada vez que me caía. Papá, mamá: lo hemos conseguido.

**A MIS PADRES, PEPE Y M^a ÁNGELES,
Y A MIS ABUELOS PEDRO, JOSEFINA,
RICARDO Y CARMELITA, QUE HAN
SIDO EL MEJOR EJEMPLO DE
ESFUERZO Y PERSEVERANCIA,
Y QUE SIEMPRE CREYERON EN MÍ**

ABREVIATURAS

AB:	Ácido biliar
ACOX:	Acil-CoA oxidasa
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
AH:	Hepatitis alcohólica
AINE:	Antiinflamatorio no esteroideo
AKR1C4:	3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa
AKR1D1:	Δ^4 -3-oxoesteroide-5 β -reductasa
AKT:	Proteínas kinasas B
ALP:	Fosfatasa alcalina
ALT:	Alanina aminotransferasa
AMACR:	α -Metilacil-CoA racemasa
APAP:	Acetaminofeno, paracetamol
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ASBT:	Transportador apical de ABs
ASH:	Esteatohepatitis alcohólica
AST:	Aspartato aminotransferasa
BAAT:	Ácido biliar-CoA aminoácido N-aciltransferasa
BACS:	Ácido biliar-CoA sintetasa
BARE:	<i>Bile acid response element</i>
BRIC:	Colestasis benignas intrahepáticas recurrentes
BSA:	Albúmina sérica bovina
BSEP:	Bomba exportadora de sales biliares
C4:	7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona
C ₂₄ :	Esteroides de 24 átomos de carbono
C ₂₇ :	Esteroides de 27 átomos de carbono
CA:	Ácido cólico
CAR:	<i>Constitutive androstane receptor</i>
CDCA:	Ácido quenodesoxicólico

CoA:	Coenzima A
CPF:	<i>CYP7A1 Promoter binding Factor</i>
Ct:	Ciclo umbral
CTX:	Xantomatosis cerebrotendinosa
CYP:	Citocromo P450
CYP7A1:	Colesterol 7 α -hidroxilasa
CYP7B1:	Oxiesterol 7 α -hidroxilasa
CYP8B1:	Esterol 12 α -hidroxilasa
CYP27A1:	Esterol 27-hidroxilasa
DBD:	<i>DNA-binding domain</i>
DBP:	Proteína D bifuncional
DCA:	Ácido desoxicólico
DCFDA:	Diclorodihidrofluoresceína diacetato
DHCA:	Ácido 3 α ,7 α -dihidroxicolestanoico
DILI:	<i>Drug-induced liver injury</i>
DMSO:	Dimetil sulfóxido
dNTP:	Desoxinucleótido trifosfato
ECL:	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EEM:	Error estándar de la media
EGFP:	Proteína verde fluorescente mejorada
EMA:	<i>European Medical Agency</i>
ERK:	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FBS:	Suero bovino fetal
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF:	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR:	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
FRS2 α :	<i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2α</i>
FTF:	<i>α-Fetoprotein transcription factor</i>
FXR:	<i>Farnesoid X receptor</i>
GAPDH:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GCA:	Ácido glicocólico

GCDCA:	Ácido glicoquenodesoxicólico
GDCA:	Ácido glicodesoxicólico
GGT:	Gamma glutamil transpeptidasa
GLCA:	Ácido glicolitocólico
GPCR:	<i>G-protein coupled receptor</i>
GUDCA:	Ácido glicoursodesoxicólico
HADA:	Hipertransaminasemia asociada a deficiencia de ACOX2
HGF:	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HLA:	Antígeno leucocitario humano
HNF4a:	<i>Hepatocyte nuclear factor 4a</i>
HPLC-MS/MS:	Cromatografía líquida de alta presión acoplado a espectrometría de masas en tándem
HPRT1:	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
HSD3B7:	3β-hidroxi-Δ ⁵ -C ₂₇ -esteroide oxidorreductasa
HyoCA:	Ácido hiocólico
HyoDCA:	Ácido hiodesoxicólico
IBABP:	Proteína citosólica ileal de unión de ácidos biliares
ICP:	Colestasis intrahepática del embarazo
iDILI:	DILI idiosincrásico
IHH:	Hepatocitos humanos inmortalizados
IL:	Interleucina
IP:	Inhibidores de proteínas
IRES:	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
JNK:	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
Kb:	Kilobase
KDa:	Kilodalton
KI:	<i>Knock-in</i>
KO:	<i>Knock-out</i>
LBD:	<i>Ligand-binding domain</i>
LCA:	Ácido litocólico
Lrh-1:	Liver related homologue-1

LXR:	<i>Liver X receptor</i>
MAF:	Frecuencia alélica menor
MCA:	Ácido muricólico
MCS:	<i>Multi-cloning site</i>
MDCA:	Ácido muridesoxicólico
MDR:	<i>Multidrug-resistance protein</i>
MEK:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEM:	<i>Minimum essential medium</i>
MOI:	Multiplicidad de infección
MRP2:	<i>Multidrug resistance protein 2</i>
MTP:	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>
norDCA:	Ácido nor-desoxicólico
NAFLD:	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
NAFL:	Hígado graso no alcohólico, esteatosis no alcohólica
NASH:	Esteatohepatitis no alcohólica
NTCP:	Polipéptido cotransportador de sodio y ácidos biliares
OATP:	Polipéptido transportador de aniones orgánicos
OCA:	Ácido obeticólico
ORF:	<i>Open reading frame</i>
OSM:	Oncostatina M
OST:	Transportador de solutos orgánicos
PAM:	Motivo adyacente de protoespaciador
PBS:	Tampón fosfato salino
PFIC:	Colestasis intrahepática familiar progresiva
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PEI:	Polietilenimina
PGC1 α :	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1α</i>
PMP70:	<i>70-kDa peroxisomal membrane protein</i>
PPAR:	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PXR:	<i>Pregnane X receptor</i>
RN:	Receptor nuclear

RNA-Seq:	<i>RNA sequencing</i>
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RT:	Transcripción reversa
RXR:	<i>Retinoid X receptor</i>
S1P:	Esfingosina 1 fosfato
SCP _x :	Proteína transportadora de esteroides X
SD:	Desviación estándar
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SHP:	<i>Small heterodimer partner</i>
SNP:	Polimorfismo de nucleótido único
SphK2	<i>Sphingosine kinase 2</i>
SULT:	Sulfotransferasa
PKC:	Proteína kinasa C
TBS-T:	<i>Tris buffered saline – tween 20</i>
TCA:	Ácido taurocólico
TCDCa:	Ácido tauroquenodesoxicólico
TDCA:	Ácido desoxicólico
TGFβ:	Factor de crecimiento tumoral β
THCA:	Ácido 3α,7α,12α-trihidroxicolestanoico
TH _{yo} CA:	Ácido taurohiocólico
TH _{yo} DCA:	Ácido taurohiodesoxicólico
TLCA:	Ácido taurolitocólico
TLR:	<i>Toll-like receptor</i>
TMCA:	Ácido tauromuricólico
TMM:	Media recortada de los valores M
TNFα:	Factor de necrosis tumoral α
TPM:	Transcripciones por millón
TSLCA:	Ácido taurosulfolitocólico
TUDCA:	Ácido tauroursodesoxicólico
UAF:	Unidades arbitrarias de fluorescencia
UDCA:	Ácido ursodesoxicólico.

UGT:	UDP glucuronosil transferasa
VDR:	<i>Vitamin D receptor</i>
VHC:	Virus de la hepatitis C
VLCS:	Acil-CoA de cadena muy larga sintetasa
WB:	<i>Western blot</i>
WT:	<i>Wild type</i>

ÍNDICE

1.- OBJETIVOS	1
2.- INTRODUCCIÓN	5
2.1.- HÍGADO Y SISTEMA BILIAR	7
2.2.- LOS ÁCIDOS BILIARES	11
2.2.1.- ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	11
2.2.2.- FUNCIONES DE LOS ABS	13
2.2.3.- BIOSÍNTESIS DE LOS ABS PRIMARIOS	15
2.2.4.- CIRCULACIÓN ENTEROHEPÁTICA	23
2.2.5.- TRANSFORMACIÓN DE LOS ABS POR LA MICROBIOTA INTESTINAL	26
2.2.6.- REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE LOS ABS	28
2.2.6.1.- RECEPTORES NUCLEARES ACTIVADOS POR ABS	28
2.2.6.2.- REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE LOS ABS	29
2.2.6.3.- REGULACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN Y EL TRANSPORTE DE LOS ABS	33
2.2.6.4.- MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE ABS INDEPENDIENTES DE RECEPTORES NUCLEARES	34
2.3.- PAPEL DE LOS ABS EN PATOLOGÍAS HEPÁTICAS	36
2.3.1.- COLESTASIS	36
2.3.2.- ESTEATOSIS Y ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA	37
2.3.3.- DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS	38
2.3.4.- ENFERMEDADES CONGÉNITAS	42
2.3.4.1.- DEFICIENCIAS EN LA BIOSÍNTESIS DE ABS	42
2.3.4.2.- DEFICIENCIAS PEROXISOMALES	44
2.3.4.3.- DEFICIENCIAS EN EL TRANSPORTE DE ABS	48
2.3.5.- LOS ABS COMO AGENTES FARMACOLÓGICOS	50
2.4.- EL RATÓN COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE ABS	52
2.4.1.- METABOLISMO DE LOS ABS EN RATONES. PRINCIPALES DIFERENCIAS CON LA ESPECIE HUMANA	52

2.4.2.- MODELOS GENÉTICOS MURINOS PARA EL ESTUDIO DE LOS DEFECTOS EN LA BIOSÍNTESIS DE ABS	56
2.4.3.- MODELOS MURINOS CON HÍGADOS “HUMANIZADOS”	57
2.4.4.- OTROS MODELOS MURINOS NO GENÉTICOS	58
2.5.- ACOX2	59
2.5.1.- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE ACOX2	59
2.5.2.- DEFICIENCIA DE ACOX2	61
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.1.- MATERIAL BIOLÓGICO	65
3.1.1.- MUESTRAS HUMANAS	65
3.1.2.- ANIMALES	65
3.1.3.- LÍNEAS CELULARES	66
3.1.4.- BACTERIAS	66
3.2.- PRODUCTOS	66
3.3.- MEDIOS INSTRUMENTALES	70
3.4.- MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	74
3.4.1.- PCR ANALÍTICA DE ALTA FIDELIDAD	74
3.4.2.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA NO DESNATURALIZANTE	74
3.4.3.- PURIFICACIÓN DE ADN CONTENIDO EN GELES DE AGAROSA Y REACCIONES ENZIMÁTICAS	75
3.4.4.- TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR CHOQUE TÉRMICO	75
3.4.5.- SELECCIÓN DE COLONIAS BACTERIANAS Y CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO	76
3.4.6.- PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE CULTIVOS BACTERIANOS	76
3.4.7.- DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	76
3.4.8.- EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	76
3.4.9.- SECUENCIACIÓN DE ADN	77
3.5.- TÉCNICAS DE CLONACIÓN Y MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	78
3.5.1.- MODIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	78
3.5.2.- SUBCLONACIÓN EN PLÁSMIDOS LENTIVIRALES	78
3.5.3.- CLONACIÓN DE GUÍAS PARA REALIZAR LA TÉCNICA DE CRISPR-Cas9	79

3.6.- OBTENCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES	80
3.6.1.- PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES	80
3.6.2.- DETERMINACIÓN DEL TÍTULO VIRAL POR CITOMETRÍA DE FLUJO	81
3.6.3.- TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS DIANA	82
3.7.- EXPERIMENTOS CON CULTIVOS CELULARES	82
3.7.1.- MEDIOS DE CULTIVO	82
3.7.2.- OBTENCIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DEFICIENTE EN ACOX2	84
3.7.3.- ESTUDIOS DE MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	85
3.7.4.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LA APOPTOSIS	85
3.7.5.- EXPERIMENTOS DE METABOLISMO DE ABS	85
3.7.6.- ESTUDIOS DE CAPTACIÓN DE ABS	86
3.7.7.- DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO	87
3.7.8.- ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR	87
3.8.- EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	87
3.8.1.- ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS EN RATONES	87
3.9.- ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARN_m POR RT-QPCR	88
3.9.1.- EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL	88
3.9.2.- TRANSCRIPCIÓN REVERSA	88
3.9.3.- DISEÑO DE <i>PRIMERS</i>	89
3.9.4.- PCR CUANTITATIVA (qPCR)	91
3.10.- DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT (WB)	91
3.10.1.- OBTENCIÓN DE HOMOGENADOS DE CULTIVOS CELULARES O TEJIDO	92
3.10.2.- ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA	92
3.10.3.- TRANSFERENCIA	93
3.10.4.- INMUNODETECCIÓN	93
3.10.5.- REVELADO	94
3.11.- DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA	94
3.12.- DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA	95
3.13.- DETERMINACIONES POR HPLC-MS/MS	96
3.13.1.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS	96

3.13.1.1.- TEJIDO HEPÁTICO	96
3.13.1.2.- BILIS	96
3.13.1.3.- SUERO	97
3.13.1.4.- MEDIOS DE CULTIVO	97
3.13.2.- DETERMINACIÓN DE ABS	97
3.13.3.- DETERMINACIÓN DE 7 α -HIDROXI-4-COLESTEN-3-ONA (C4)	98
3.14.- OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS	99
3.14.1.- VALORACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	99
3.14.2.- VALORACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	99
3.14.3.- DETERMINACIÓN DE MARCADORES BIOQUÍMICOS HEPÁTICOS	99
3.14.4.- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR	99
3.14.5.- ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	100
3.15.- ESTUDIOS <i>IN SILICO</i>	100
3.16.- ESTUDIO DE VALIDACIÓN	101

CAPÍTULO I: REGULACIÓN DE LAS ENZIMAS PEROXISOMALES IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE LOS ABS. IMPACTO DE LAS ENFERMEDADES HEPÁTICAS INFLAMATORIAS	103
4.1.- RESULTADOS	105
4.1.1.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE ACOX2 MARCADOR NO DEFINIDO.	¡ERROR!
4.1.2.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE BAAT MARCADOR NO DEFINIDO.	¡ERROR!
4.1.3.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE OTRAS ENZIMAS PEROXISOMALES IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE LOS ABS ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.	
4.1.4.- REPERCUSIÓN DE LAS PATOLOGÍAS HEPÁTICAS INFLAMATORIAS MARCADOR NO DEFINIDO.	¡ERROR!
4.2.- DISCUSIÓN	107
CAPÍTULO II: PREVALENCIA Y TRATAMIENTO DE HADA. DESARROLLO DE MODELOS <i>IN VITRO</i>	109

5.1.- RESULTADOS	111
5.1.1.- IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS CASOS DE HADA	113
5.1.1.1.- CASO 1	115
5.1.1.2.- CASO 2	118
5.1.1.3.- CASO 3	119
5.1.1.4.- CASO 4	120
5.1.1.5.- CASO 5	121
5.1.1.6.- ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA	122
5.1.2.- PAPEL DEL UDCA SOBRE LA TOXICIDAD MEDIADA POR EL THCA	124
5.1.3.- DESARROLLO DE UN MODELO <i>IN VITRO</i> DE DEFICIENCIA DE ACOX2	
	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5.2.- DISCUSIÓN	131
5.3.- ANEXO	133

CAPÍTULO III: DESARROLLO DE MODELOS *IN VIVO* DE HADA Y ESTUDIOS DE TOXICIDAD INDUCIDA POR FÁRMACOS

6.1.- RESULTADOS	143
6.1.1.- DESARROLLO DE MODELOS ANIMALES DE HADA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
6.1.2.- ESTUDIOS DE TOXICIDAD INDUCIDA POR FÁRMACOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
6.2.- DISCUSIÓN	147
7.- CONCLUSIONES	149
8.- BIBLIOGRAFÍA	153

9.- ENGLISH SUMMARY ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1.- OBJETIVOS

Los ácidos biliares (ABs) son moléculas derivadas del metabolismo del colesterol secretadas al tubo digestivo a través de la bilis y que, gracias a su marcado carácter anfipático, son capaces de formar micelas que facilitan la digestión y absorción de grasas y vitaminas liposolubles. Asimismo, tienen un papel imprescindible en la generación del flujo de bilis por arrastre osmótico, así como en la transducción de señales implicadas en la regulación tanto de su propio metabolismo como del de glúcidos, lípidos y en la respuesta inflamatoria hepática.

Existe un grupo de trastornos hereditarios de la biosíntesis de ABs considerados como enfermedades raras de presentación pediátrica. Se caracterizan por la aparición de colestasis y daño hepatocelular progresivo, cuya gravedad puede variar de leve, y tratable mediante la suplementación de ABs, a tan grave que puede requerir un trasplante hepático como única solución para estos pacientes. Nuestro grupo ha identificado recientemente, en un paciente con hipertransaminasemia idiopática, un nuevo defecto genético en la enzima peroxisomal acil-CoA oxidasa 2 (ACOX2), implicada en el acortamiento de la cadena lateral de los ABs. La presencia en homocigosis de la mutación c.673C>T en el gen *ACOX2* produce una alteración funcional en la vía de biosíntesis de ABs con acumulación de metabolitos inductores de estrés oxidativo y muerte hepatocelular, lo que podría provocar una mayor susceptibilidad del hígado al daño por otras noxas.

La frecuencia alélica menor (MAF) para c.673C>T en la base de datos de agregación de genomas (gnomAD v3.1) es del 0,03%, lo que sugiere que podría tratarse de una variante poco frecuente en la población general. Sin embargo, los datos del proyecto *Medical Genome* obtenidos recientemente en una cohorte española de individuos sanos dan un valor de MAF del 0,7% para el alelo c.673C>T, lo que sugiere que la deficiencia de ACOX2 puede ser una condición no tan infrecuente en esta población.

La **hipótesis** sobre la que se fundamentó este proyecto de Tesis Doctoral fue que la deficiencia de la enzima ACOX2, y la consiguiente acumulación de intermediarios hepatotóxicos del metabolismo de los ABs, puede estar

OBJETIVOS

implicada en la etiopatogenia de otros casos de hipertransaminasemia persistente de causa no filiada, lo que sería clínicamente relevante si tenemos en cuenta que hasta en un 15% de los pacientes en los que se detecta una elevación persistente de transaminasas en sangre, la causa del trastorno permanece sin identificar.

Con estos antecedentes, nos planteamos como **objetivo global** de esta Tesis Doctoral investigar la prevalencia de la Hipertransaminasemia Asociada a Deficiencia de ACOX2 (HADA) entre los pacientes con hipertransaminasemia idiopática y su respuesta al ácido ursodesoxicólico, dilucidar su mecanismo patogénico y desarrollar, caracterizar y validar modelos experimentales para el estudio de esta alteración.

Para alcanzarlo, nos propusimos los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1: Estudiar los mediadores implicados en la regulación de ACOX2.

Objetivo 2: Analizar la prevalencia de HADA en una cohorte de pacientes con hipertransaminasemia no filiada e identificar las bases genéticas del trastorno.

Objetivo 3: Evaluar la utilidad del ácido ursodesoxicólico como tratamiento de los pacientes con HADA e investigar su acción farmacológica en esta alteración.

Objetivo 4: Desarrollar modelos *in vitro* de células hepáticas con deficiencia de ACOX2 y expresión de otras variantes genéticas descritas para esta enzima, para evaluar su repercusión funcional.

Objetivo 5: Desarrollar y caracterizar modelos murinos de déficit de Acox2, como herramienta para evaluar *in vivo* la repercusión de esta deficiencia sobre la toxicidad hepática aguda provocada por fármacos.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1.- HÍGADO Y SISTEMA BILIAR

El hígado es el órgano más grande del cuerpo humano, excluyendo la piel, con un peso aproximado de 1,5 kg, un 2,5% de la masa total del organismo. Se encuentra situado en el hipocondrio derecho bajo el diafragma, y está envuelto por una membrana fibrosa llamada cápsula de Glisson (1). Embriológicamente se desarrolla como una evaginación ventral del endodermo que surge del extremo caudal del intestino anterior, y que posteriormente se divide en el esbozo hepático, que dará lugar al parénquima hepático, y el esbozo cístico, que formará la vesícula biliar (2).

El hígado recibe el 25% del gasto cardiaco a través de una doble irrigación sanguínea aferente llevada a cabo por la arteria hepática y la vena porta. La sangre procedente de ambos conductos se mezcla a lo largo de los sinusoides hepáticos, los cuales convergen para formar las venas centrolobulillares, que acaban drenando en la vena hepática, que desemboca en la vena cava inferior (3).

Se conoce como sistema biliar al conjunto de conductos intra y extrahepáticos a través de los cuales discurre la bilis desde que se produce hasta que se drena en el intestino delgado. Está formado por la vesícula biliar y el sistema biliar ductal, a su vez conformado por los ductulos biliares o canales de Hering, los ductos biliares intrahepáticos y extrahepáticos, el conducto hepático común, el conducto cístico y el conducto biliar común.

Los hepatocitos son las células parenquimáticas mayoritarias del hígado, llegando a representar el 70% de la masa del mismo. Contienen la maquinaria necesaria para llevar a cabo gran cantidad de reacciones bioquímicas, tales como la producción de bilis, el metabolismo de los azúcares simples y complejos o la detoxificación de xenobióticos, entre otras. Se trata de células que presentan una elevada polaridad, la cual marca grandes diferencias a nivel morfológico y funcional en su membrana plasmática. La membrana basolateral está orientada hacia el espacio perisinusoidal o espacio de Disse, de tal forma que el intercambio de sustancias con el torrente sanguíneo se encuentra facilitado gracias a las fenestraciones presentes en el sinusoides

hepático. La membrana canalicular aparece como una invaginación del hepatocito que permite, junto con los hepatocitos adyacentes, la formación de canaliculos biliares a través de los cuales fluye la bilis generada. Por otra parte, la presencia en la membrana lateral de estructuras tales como desmosomas, *tight junctions* y *gap junctions* facilita la formación de los conductos mencionados y la comunicación funcional entre hepatocitos colindantes (4).

Los colangiocitos, las células epiteliales que conforman los ductos biliares, tienen un papel fundamental en la producción de la bilis. Esto no solamente se debe a que son responsables de la generación del 30% del flujo biliar, sino a que también modifican la composición de este fluido mediante el intercambio de agua, iones y otros solutos (5). Entre otras funciones de los colangiocitos destacan su capacidad inmunoprotectora debida a la secreción de inmunoglobulina A y su contribución a la regeneración hepática cuando la capacidad regenerativa de los hepatocitos está dañada (6).

La presencia de hasta otros 13 tipos celulares diferentes ha sido descrita en el hígado (7), entre los cuales destacan:

- Células endoteliales sinusoidales: caracterizadas por sus fenestraciones, actúan como barrera y filtro de sustancias y fluidos entre la sangre y los hepatocitos.
- Células de Kupffer: macrófagos especializados que derivan de monocitos circulantes, con capacidades fagocíticas y que producen gran cantidad de mediadores inflamatorios.
- Células estrelladas: capaces de producir matriz extracelular, metabolizar y almacenar vitamina A y lípidos, y que pueden transformarse a miofibroblastos cuando se activan. Juegan un papel muy importante en la regeneración y la fibrosis hepática.

La unidad funcional básica del hígado es el lobulillo hepático, una estructura hexagonal formada por placas de hepatocitos separadas por capilares sinusoidales que se disponen de forma radial alrededor de una vena centrolobulillar. Cada esquina del lobulillo presenta una estructura

característica conocida como tríada portal (Figura I1), conformada por una vénula portal, una arteriola hepática y un conductillo biliar. Así, la sangre entra por ambas ramas sanguíneas, irrigando el lobulillo mientras pasa por la red de sinusoides hepáticos antes de abandonar la estructura a través de la vena central. Estos sinusoides están tapizados tanto por células endoteliales sinusoidales como por células de Kupffer, y entre este revestimiento y los hepatocitos se encuentran los espacios de Disse o perisinusoidales, que se comunican con los vasos linfáticos para drenar el exceso de líquido. Las fenestraciones de las células endoteliales permiten el paso de gran cantidad de sustancias plasmáticas hacia el hepatocito y viceversa. Además, en el espacio que generan las dos hileras de hepatocitos que conforman una placa hepatocitaria se encuentran los canalículos biliares, a través de los cuales discurre la bilis canalicular en sentido contrario a la sangre y que drena en el conductillo biliar de una tríada, de tal forma que la bilis continúa su camino a través del árbol biliar hasta llegar a la vesícula biliar donde se acumula y concentra para ser posteriormente secretada al duodeno (8).

El hígado es un órgano de gran importancia metabólica para el resto del organismo, ya que es capaz de llevar a cabo las siguientes funciones:

- Metabolismo de los carbohidratos: gluconeogénesis, glucogenolisis, glucogenogénesis, homeostasis de la glucosa y catabolismo de hexosas.
- Metabolismo lipídico: biosíntesis y catabolismo de colesterol, producción de ácidos grasos y triglicéridos, biosíntesis y metabolismo de lipoproteínas plasmáticas, β -oxidación de ácidos grasos y producción de cuerpos cetónicos durante el ayuno.
- Biosíntesis proteica:
 - Aminoácidos no esenciales.
 - Proteínas plasmáticas: albúmina, lipoproteínas, transferrina, ceruloplasmina.
 - Factores de la coagulación: fibrinógeno y factores II, V, VII, IX y XI.

- Hormonas peptídicas: angiotensinógeno, trombopoyetina, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento de tipo insulínico 1...
 - Otras: transaminasas, hemoglobina, α 1-antitripsina.
- Metabolismo de la vitamina D: hidroxila el colecalfiferol para formar 25-hidroxicolecalciferol.
 - Almacén de vitaminas (A, B₁₂ y D) y metales (hierro y cobre).
 - Detoxificación de la sangre: transformación de amonio en urea, catabolismo de las bases nitrogenadas a ácido úrico, formación de bilirrubina a partir de hemoglobina, y biotransformación de hormonas y xenobióticos.
 - Formación y secreción de bilis al duodeno, una solución acuosa isomolar con el plasma, compuesta por agua, iones, sales biliares, bilirrubina, fosfolípidos, colesterol y sustancias de deshecho hepáticas, con importantes funciones, entre las que destacan facilitar la digestión y absorción de grasas y vitaminas liposolubles, y la excreción de sustancias derivadas del metabolismo endógeno y xenobióticos.

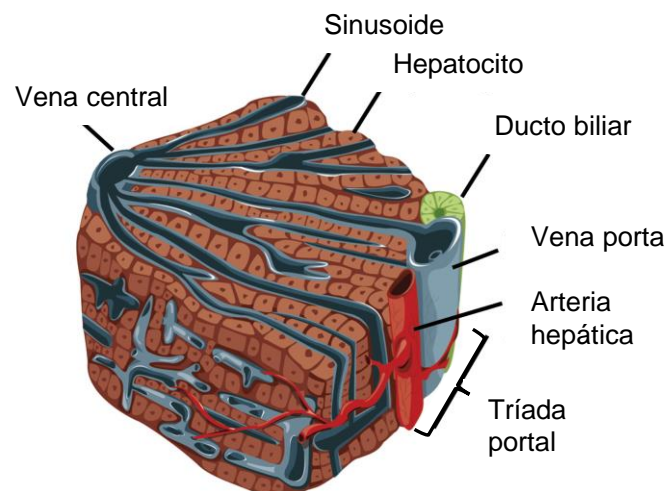


Figura 11.- Arquitectura hepática.

2.2.- LOS ÁCIDOS BILIARES

2.2.1.- Estructura y propiedades fisicoquímicas

Los ácidos biliares (ABs) son moléculas que provienen del metabolismo del colesterol, sintetizadas por los hepatocitos y presentes en la bilis de gran cantidad de animales vertebrados. Químicamente están formados por un esqueleto carbonado multicíclico saturado, conocido como núcleo esteroideo o ciclopentanoperhidrofenantreno, con dos sustituyentes β -metilo en C₁₀ y C₁₃, grupos hidroxilo en número, posición y estereoquímica variable, y una cadena lateral hidrocarbonada de entre cinco y ocho átomos de carbono situada en C₁₇ y que contiene un grupo carboxilato (9). Los ABs denominados “colanoicos” poseen 24 átomos de carbono (C₂₄) y son los que se producen mayoritariamente en humanos y mamíferos, junto con algunos reptiles, peces óseos y aves. Otras especies como algunas aves, escualos, anfibios o reptiles poseen ABs C₂₇ o “colestanoicos” y alcoholes biliares C₂₇ (10).

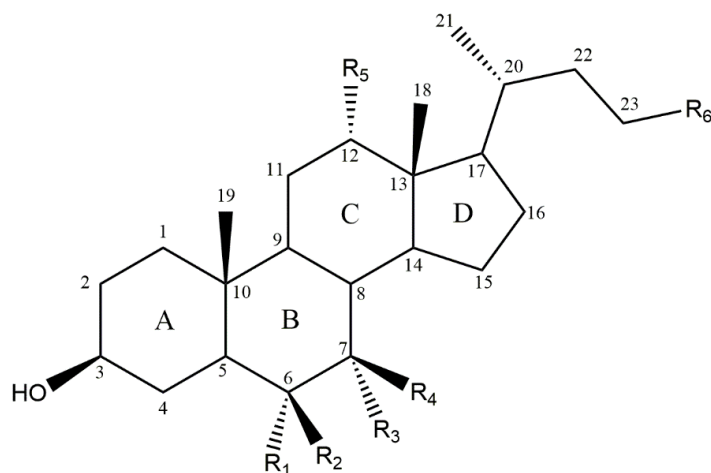
El núcleo esteroideo consiste en tres hexaciclos (A, B y C) y un pentaciclo (D) que pueden disponerse espacialmente en forma curva o plana según la conformación que adopten los anillos A y B. Durante la biosíntesis de los ABs, la isomerización del enlace $\Delta^{5,6}$ del colesterol a la posición $\Delta^{4,5}$ provoca que el hidrógeno en posición C₅ adquiera configuración β , dotando así a los anillos A y B de configuración cis y generando una distribución espacial “en silla”, lo cual repercute en sus peculiares características fisicoquímicas. En algunos reptiles y unos pocos mamíferos aparecen ABs con una configuración A/B trans o “plana” conocidos como “allo”-ABs (9).

Los ABs principales de la especie humana son el ácido cólico (CA), el ácido quenodesoxicólico (CDCA) y el ácido desoxicólico (DCA), en una proporción aproximada de 40:40:20. Sus grupos hidroxilo presentan las configuraciones 3 α ,7 α ,12 α -, 3 α ,7 α - y 3 α ,12 α -, respectivamente. En cambio, la bilis de los roedores contiene principalmente CA y ácidos α -muricólico (α -MCA) y β -muricólico (β -MCA), hidroxilados en las posiciones 3 α , 6 β y 7 α /7 β -, respectivamente. En la bilis de oso es abundante el ácido ursodesoxicólico (UDCA), un compuesto dihidroxilado en 3 α y 7 β de grandes propiedades

coleréticas del que apenas se encuentran trazas en la bilis humana como en otras especies de mamíferos. La mayoría de los ABs primarios en humanos sufren N-acil conjugación con glicina (75%) o taurina (25%) (11) (Figura I2).

Los ABs son moléculas de marcado carácter anfipático. Esta característica viene dada por la existencia de una superficie hidrofílica de forma cóncava generada por la presencia de grupos hidroxilo y del carboxilato de la cadena lateral, y una superficie hidrofóbica de forma convexa debida al esqueleto hidrocarbonado y los grupos metilo orientados en posición β . Como consecuencia, los ABs tienen la capacidad de formar micelas en soluciones acuosas, una característica que determina su función como detergente a nivel intestinal. Esta propiedad se ve modificada por la hidrofobicidad de la propia molécula, de tal forma que cuanto mayor sea la superficie hidrofóbica menor será su concentración micelar crítica, y por lo tanto tendrá mayor facilidad para formar micelas (9).

Tanto el número como la orientación de los grupos hidroxilo y la longitud de la cadena lateral influyen en el balance hidrofilia/lipofilia de los ABs. Así, la localización ecuatorial de los grupos hidroxilo incrementará el área hidrofílica de la molécula. Además, la conjugación de los ABs incrementa su solubilidad, siendo las especies tauroconjugadas más hidrófilas que las glicoconjugadas (11,12). De esta forma, la diversidad de estructuras de los ABs marca las propiedades fisicoquímicas de cada especie molecular tales como su solubilidad, su capacidad de ionización y de formación de micelas, determinando su papel fisiológico y su toxicidad (13).



Nombre	Clasificación		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
	Humano	Ratón	6 α	6 β	7 α	7 β	12 α	23
CA	1 ^o	1 ^o	H	H	OH	H	OH	COOH
CDCA	1 ^o	1 ^o	H	H	OH	H	H	COOH
α -MCA	-	1 ^o	H	OH	OH	H	H	COOH
β -MCA	-	1 ^o	H	OH	H	OH	H	COOH
UDCA	2 ^o	1 ^o	H	H	H	OH	H	COOH
DCA	2 ^o	2 ^o	H	H	H	H	OH	COOH
LCA	2 ^o	2 ^o	H	H	H	H	H	COOH
ω -MCA	-	2 ^o	OH	H	H	OH	H	COOH
MDCA	-	2 ^o	H	OH	H	H	H	COOH
HyoCA	-	2 ^o	OH	H	OH	H	H	COOH
HyoDCA	-	2 ^o	OH	H	H	H	H	COOH

Figura 12.- Estructura molecular de los ácidos biliares mayoritarios en humano y ratón. CA: ácido cólico; CDCA: ácido quenodesoxicólico; α -MCA: ácido α -muricólico; β -MCA: ácido β -muricólico; UDCA: ácido ursodesoxicólico; DCA: ácido desoxicólico; LCA: ácido litocólico; ω -MCA: ácido ω -muricólico; MDCA: ácido muridesoxicólico; HyoCA: ácido hiocólico; HyoDCA: ácido hiodesoxicólico; 1^o: primario; 2^o: secundario.

2.2.2.- Funciones de los ABs

Los ABs son moléculas conocidas principalmente por su importante papel en la digestión y absorción de grasas y vitaminas liposolubles. No obstante, su abanico de funciones es bastante más amplio (11,12).

A nivel biliar, los ABs inducen la secreción de la mayor parte del flujo de bilis debido a su movimiento desde los sinusoides hepáticos hacia los canalículos

biliares, lo que provoca un gradiente osmótico que permite el arrastre de agua hasta la luz del canalículo, generando lo que se conoce como fracción del flujo biliar dependiente de ABs (14). Además, estimulan la secreción de bicarbonato y de fosfolípidos biliares como fosfatidilcolina o lecitina, con los que forman micelas mixtas que facilitan la solubilización del colesterol, las protoporfirinas y los xenobióticos colefílicos excretados. Los ABs conjugados actúan como tampones de calcio, ya que sus sales cálcicas son solubles en agua, lo que previene la formación de cálculos biliares de bilirrubinato de calcio y otras especies moleculares. Estimulan además la contracción canalicular, lo cual colabora en el bombeo de la bilis hacia los conductos colectores del sistema biliar.

Una vez alcanzado el intestino, las micelas mixtas emulsionan la grasa de la dieta, aumentando la solubilidad de las mismas y facilitando su ataque por las lipasas pancreáticas y posterior absorción, como ocurre con las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) (15,16). Así, los ABs influyen en la homeostasis del colesterol, facilitando tanto su absorción, gracias a la solubilización del mismo en el intestino, como su eliminación al ser productos de su catabolismo. También contribuyen a la digestión mediante la activación de las lipasas y proteasas pancreáticas, la modulación del tono intestinal, la secreción gastrointestinal de agua y electrolitos y a la liberación de colecistocinina. Además, son potentes agentes bacteriostáticos que regulan el crecimiento y la diversidad bacteriana en el intestino delgado.

Los ABs juegan además un papel importante como moléculas señalizadoras, regulando la expresión de gran cantidad de genes (apartado 2.2.6). Destaca su capacidad para regular su propia biosíntesis a través de la activación del receptor nuclear FXR, mediando así una disminución de la expresión de la enzima llave CYP7A1 (17). Participan también en el control del metabolismo glucídico, la activación de las células estelares hepáticas, y la respuesta inflamatoria mediada por las células de Kupffer. Asimismo, las concentraciones elevadas de ABs en tejido hepático disminuyen la capacidad

de regeneración hepática (18) e inducen la activación de las vías apoptóticas celulares (19).

2.2.3.- Biosíntesis de los ABs primarios

En su conjunto, la formación de ABs tiene lugar en un escenario complejo, en el que participan al menos 17 enzimas, uno o más transportadores y distintos compartimentos subcelulares, entre los que se encuentran el retículo endoplasmático, la mitocondria, los peroxisomas y el citosol. En función del orden en el que se produzcan las distintas reacciones se distinguen cuatro vías de biosíntesis: la vía clásica o neutra, la vía alternativa o ácida, la ruta de Yamasaki y la vía de 25-hidroxilación.

La primera reacción de la vía clásica consiste en una hidroxilación en la posición 7 α llevada a cabo por la enzima colesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7A1) (Figura I3). Se considera que esta enzima es la llave de toda la ruta biosintética, y por lo tanto sobre la que convergen mayor cantidad de fenómenos de regulación. El producto de esta reacción es convertido a continuación a la forma 3-oxo- Δ^4 por acción de la 3 β -hidroxi- Δ^5 -C₂₇-esteroide oxidoreductasa (HSD3B7). En este punto, puede ocurrir que la enzima esteroil 12 α -hidroxilasa (CYP8B1) introduzca un grupo hidroxilo en la posición 12 α , generando un intermediario cuyo producto final será el CA. En caso de que esta hidroxilación no se lleve a cabo, el compuesto obtenido será CDCA, lo cual pone de manifiesto el papel de esta enzima sobre el control de la proporción de CA y CDCA biosintetizados. En cualquier caso, el doble enlace en la posición C₄ es reducido seguidamente por la enzima Δ^4 -3-oxoesteroide-5 β -reductasa (AKR1D1), generando un hidrógeno en posición 5 β . La última reacción de modificación del anillo esteroideo es llevada a cabo por la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (AKR1C4), que reduce el grupo 3-oxo a un 3-hidroxilo con estereoquímica en α . Las modificaciones de la cadena lateral comienzan con una 26-hidroxilación por acción de la esteroil 27-hidroxilasa - nótese la discrepancia en la nomenclatura (20). La posterior

Vía clásica o neutra

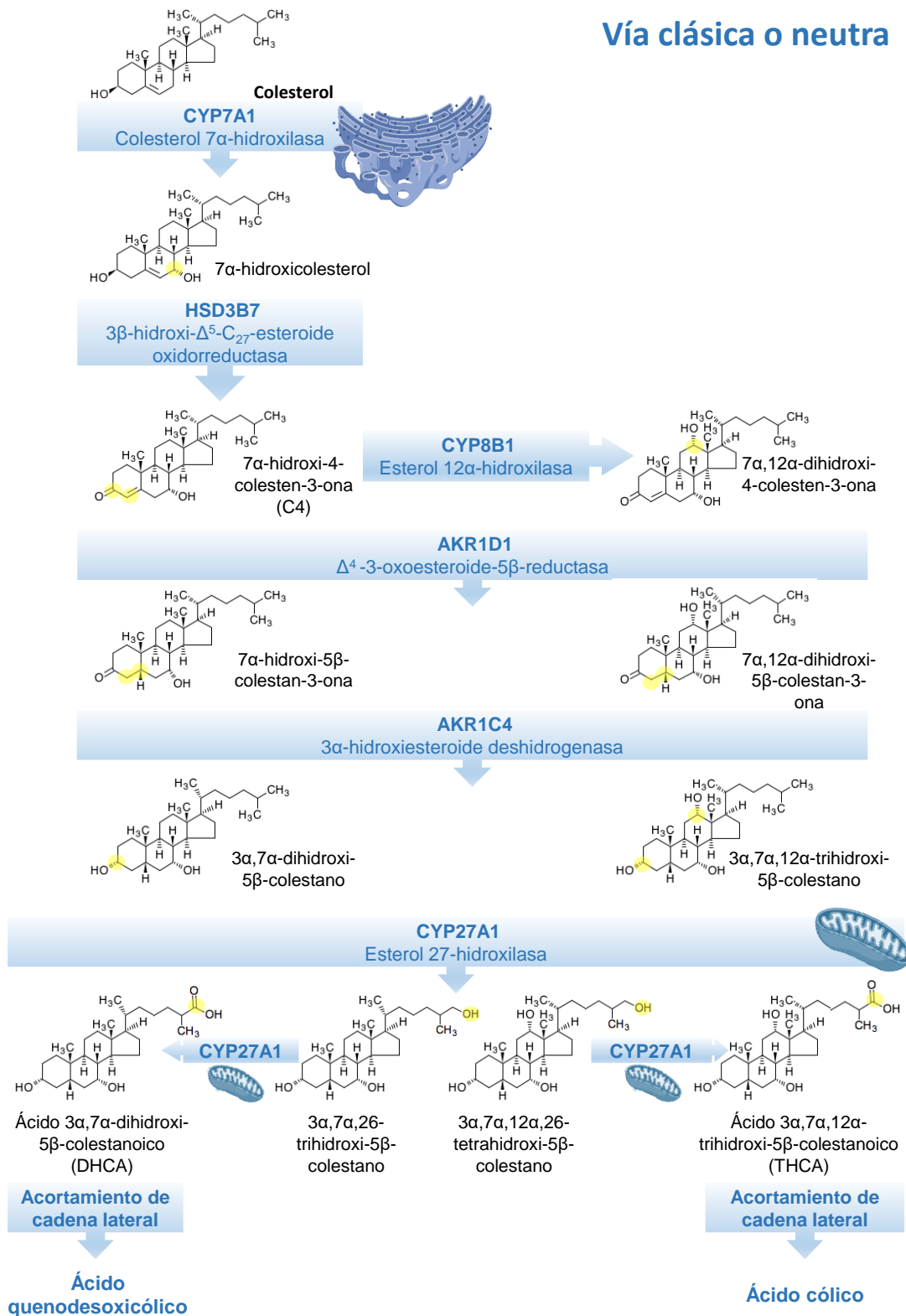
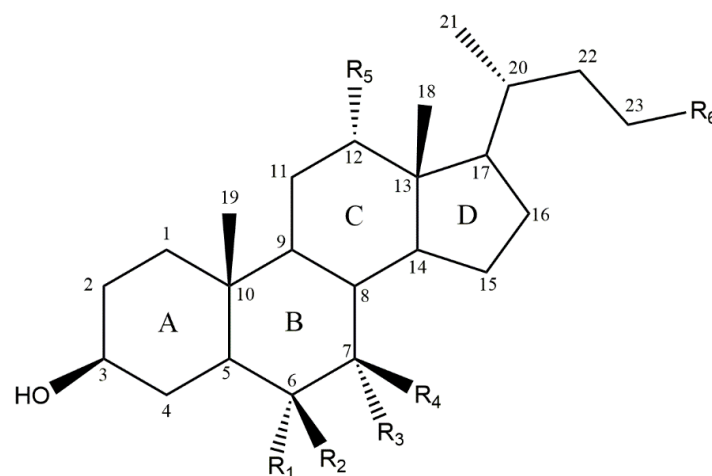


Figura 13.- Esquema de la ruta clásica o neutra de biosíntesis de los ácidos biliares a partir del colesterol.

oxidación hasta un grupo carboxilato permite la formación de los ABs intermediarios C_{27} : ácido $3\alpha,7\alpha$ -dihidroxi- 5β -colestanoico (DHCA) y $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroxi- 5β -colestanoico (THCA) (Figura I4). Dada la proquiralidad de la cadena lateral en la posición 25, cabe destacar la estereoespecificidad de la estero 27-hidroxilasa (CYP27A1) para la producción exclusiva de los estereoisómeros $25R$ de ambas moléculas. A continuación, estos dos compuestos deben ser activados mediante un enlace tioéster con una molécula de acetil-CoA, para lo cual intervienen la ácido biliar-CoA sintetasa (BACS) o la acil-CoA de cadena muy larga sintetasa (VLCS).



Nombre	Clasificación		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
	Humano	Ratón	6 α	6 β	7 α	7 β	12 α	23
CA	1 ^o	1 ^o	H	H	OH	H	OH	COOH
CDCA	1 ^o	1 ^o	H	H	OH	H	H	COOH
THCA	Intermediario C_{27}		H	H	OH	H	OH	CH ₂ CH(CH ₃)COOH
DHCA	Intermediario C_{27}		H	H	OH	H	H	CH ₂ CH(CH ₃)COOH

Figura I4.- Estructura molecular de los ácidos biliares primarios mayoritarios en humano y sus intermediarios C_{27} de biosíntesis. CA: ácido cólico; CDCA: ácido quenodesoxicólico; THCA: ácido trihidroxicolestanoico; DHCA: ácido dihidroxicolestanoico; 1^o: primario.

Los ABs C_{27} -CoA son entonces transportados al interior del peroxisoma por el transportador ABCD3, también denominado PMP70, para el acortamiento de la cadena lateral (Figura I5). Las reacciones en este orgánulo comienzan con la racemización del centro quiral de la posición $25R$ hacia la configuración

25S gracias a la acción de la α -metilacil-CoA racemasa (AMACR). A continuación, la enzima estereoespecífica acil-CoA oxidasa 2 (ACOX2) oxida los isómeros 25S, generando un doble enlace en la posición 24, la cual se hidroxila y posteriormente oxida hasta generar un grupo 24-ceto por acción de la proteína D bifuncional (DBP). La proteína transportadora de esteroides X (SCPx) permite seguidamente la separación de su sustrato en propionil-CoA y CA-CoA o CDCA-CoA mediante un mecanismo de escisión tiolítica. Finalmente, la conjugación con glicina o taurina de estos ABs-CoA es catalizada por la aminoácido N-acil transferasa (BAAT), generando los ABs primarios: ácido taurocólico (TCA), glicocólico (GCA), tauroquenodesoxicólico (TCDCA) y glicoquenodesoxicólico (GCDCA).

Los ABs pueden conjugarse adicionalmente con otros compuestos con el fin de aumentar su solubilidad, reducir su toxicidad y facilitar su eliminación. Así, la sulfatación, llevada a cabo por SULT2A1, o la glucuronidación, mediada por UGT1A3 y otras enzimas de la familia UDP glucuronosil transferasa (UGTs), generan especies de ABs que son minoritarias en sujetos sanos, pero que cobran gran importancia en pacientes con colestasis debido a su facilidad de eliminación por vía urinaria (21,22).

La vía ácida (Figura I6) destaca por su mayor importancia durante la infancia, y por la producción preferente de CDCA. Bioquímicamente se caracteriza por la generación inicial de ABs C₂₇ para posteriormente proceder a la modificación del núcleo esteroideo. CYP27A1 es la primera enzima de esta ruta, llevando a cabo la hidroxilación de la posición C₂₆ y generando nuevamente estereoisómeros 25R. Es importante destacar que CYP27A1 no es la enzima limitante de esta vía a pesar de que cataliza la primera reacción. En este caso, el paso clave para la regulación de la ruta es el transporte de su sustrato, el colesterol, hacia la membrana mitocondrial interna mediado por STARD1 (23).

La hidroxilación del (25R)-26-hidroxicolesterol permite la obtención del ácido (25R)-3 β -hidroxi-5-colestenoico, y la 7 α -hidroxilación del mismo es producida por una enzima diferente a la de la vía neutra, la oxiestero 7 α -hidroxilasa

Acortamiento de la cadena lateral

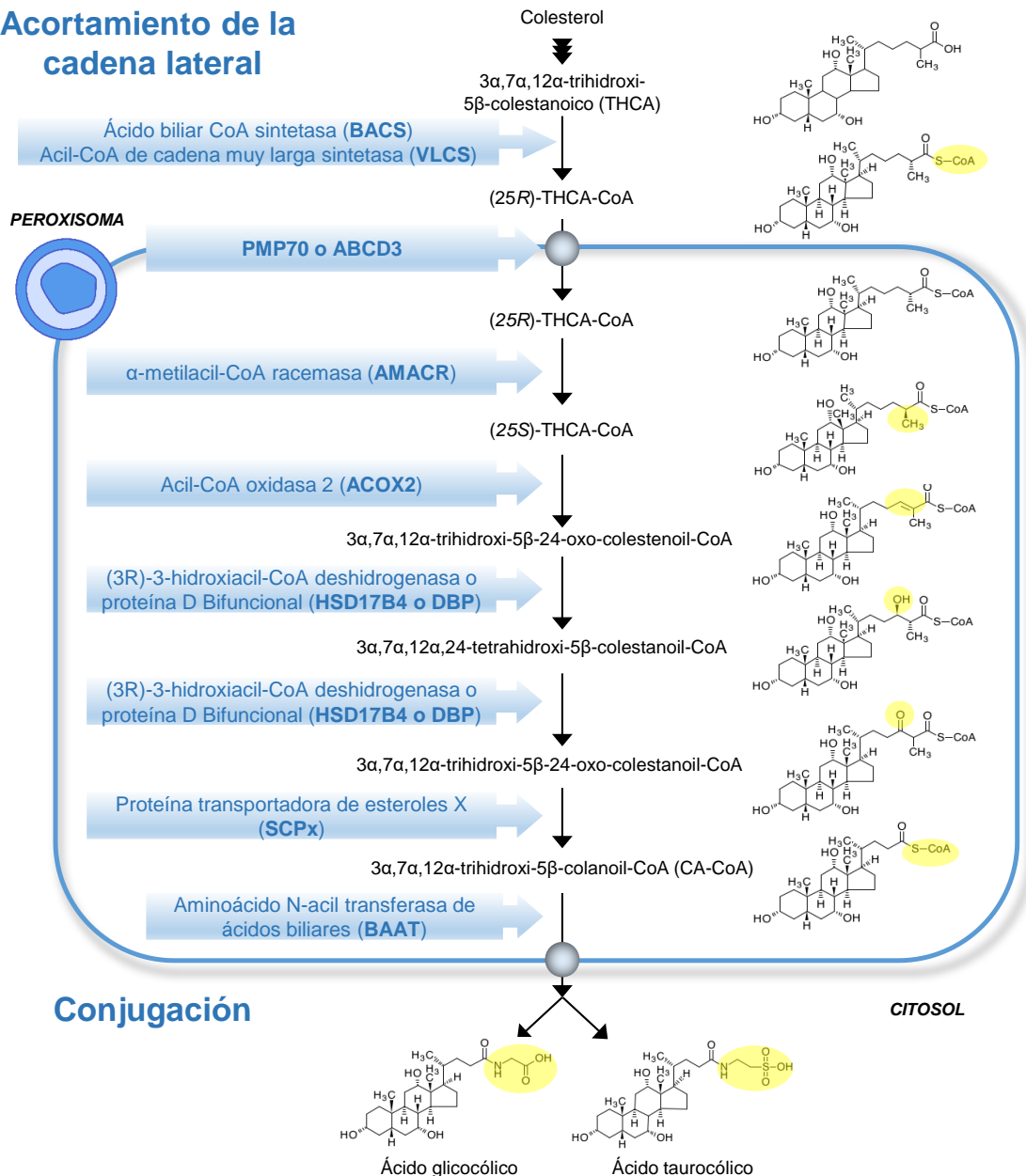


Figura I5.- Esquema del acortamiento por β -oxidación de la cadena lateral del ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colestanoico (THCA) en la biosíntesis del ácido cólico (CA). Este proceso es análogo para la obtención de ácido quenodesoxicólico (CDCA) a partir de ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colestanoico (DHCA).

(CYP7B1). Posteriormente, el ácido (25R)-3 β ,7 α -dihidroxi-5-colestenoico generado sufrirá las mismas reacciones de modificación de los anillos y de acortamiento de la cadena lateral que la vía clásica, mediante las mismas enzimas. Cabe destacar que el 26-hidroxicolesterol también puede proseguir con la modificación del esqueleto previamente a la formación del ácido en la

cadena lateral, dotando de mayor complejidad a la ruta. Otros compuestos como el 24- y 25-hidroxicolesterol, de elevada importancia en la regulación del metabolismo lipídico, también se pueden incorporar a la biosíntesis de los ABs al principio de esta vía. Ambos compuestos pueden ser obtenidos por acción de CYP27A1, mientras que la CYP46A1 cerebral y la colesterol 25-hidroxilasa sólo contribuyen a la obtención de 24- y 25-hidroxicolesterol, respectivamente (24).

La ruta de Yamasaki (Figura I7) comparte con la vía ácida la formación inicial del ácido (25R)-3 β -hidroxi-5-colestenoico por CYP27A1. Posteriormente se lleva a cabo el acortamiento de la cadena lateral por β -oxidación peroxisomal para generar ácido 3 β -hidroxi-5-colenico, cuyo núcleo esteroideo es modificado en el retículo endoplásmico para finalmente formar CDCA mayoritariamente. A pesar de que se desconoce la contribución de esta ruta en la biosíntesis de ABs, la presencia de intermediarios 3 β -hidroxilados en líquido amniótico sugiere su importancia durante el desarrollo fetal (25).

Finalmente, la vía de 25-hidroxilación (Figura I7) se ha descrito como una ruta alternativa en el metabolismo de ABs, cuyo acortamiento de la cadena lateral es independiente de la β -oxidación peroxisomal. Esta cascada comienza con la 25-hidroxilación del 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colestano por acción de la enzima microsomal CYP3A4 (26), generando 3 α ,7 α ,12 α ,25-tetrahidroxi-5 β -colestano que es nuevamente hidroxilado hasta 3 α ,7 α ,12 α ,24S,25-pentahidroxi-5 β -colestano (27). Existen evidencias de que la enzima que cataliza esta última reacción es CYP27A1, gracias a estudios realizados tanto *in vitro* como en pacientes con xantomatosis cerebrotendinosa (*Cerebrotendinous xantomatosis*, CTX), los cuales carecen de CYP27A1 activa y en los que se observa una acumulación del 3 α ,7 α ,12 α ,25-tetrahidroxi-5 β -colestano cuando se administra su precursor directo (28,29). Finalmente, la conversión hasta CA sería llevada a cabo rápidamente a través de un intermediario 24-ceto por una o varias enzimas citosólicas estereoespecíficas para el isómero 24S (28) cuya identidad es todavía desconocida.

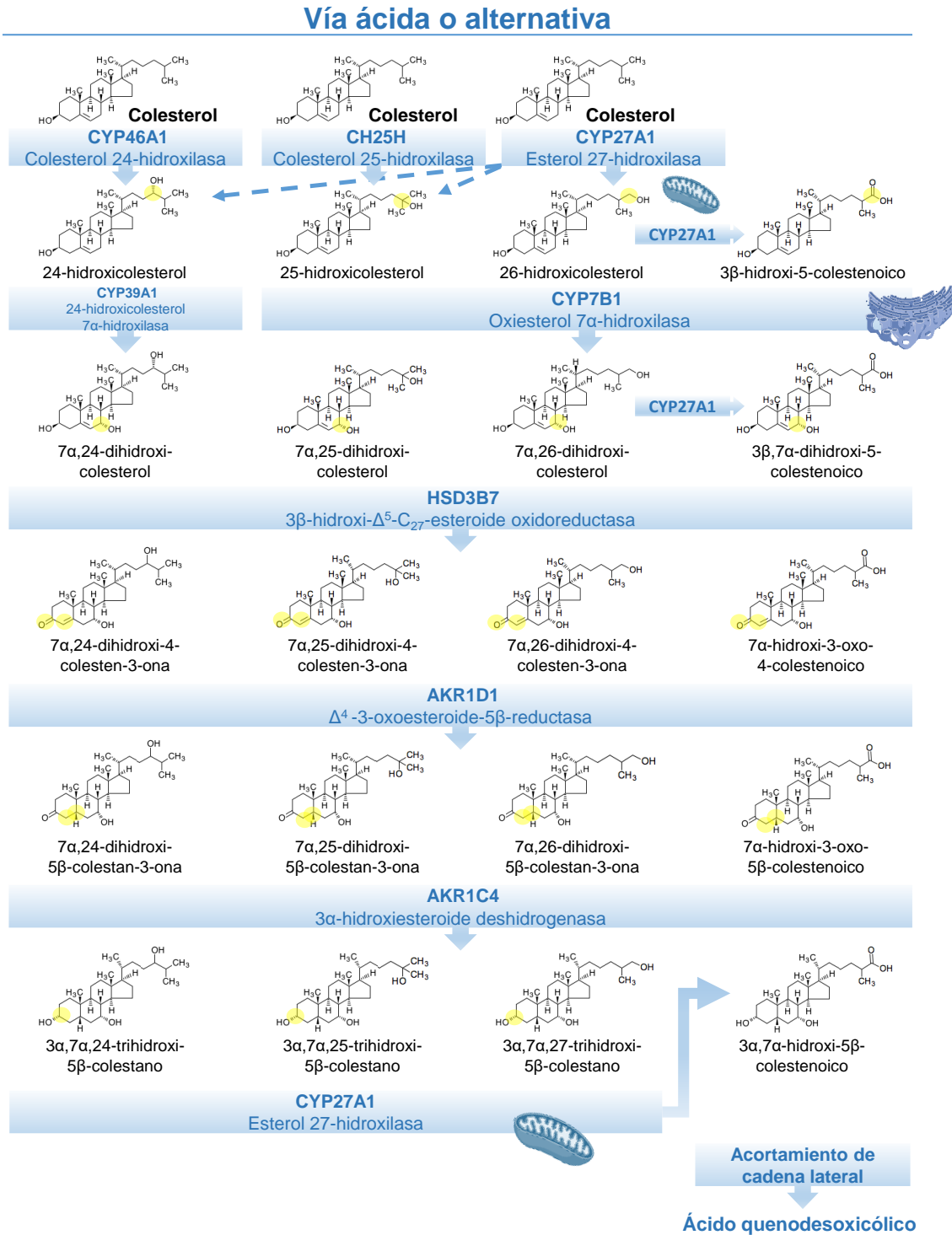


Figura I6.- Esquema de la ruta alternativa o ácida de biosíntesis de los ácidos biliares a partir del colesterol, el cual puede hidroxilarse inicialmente en diferentes posiciones para generar ácido quenodesoxicólico a través de esta vía.

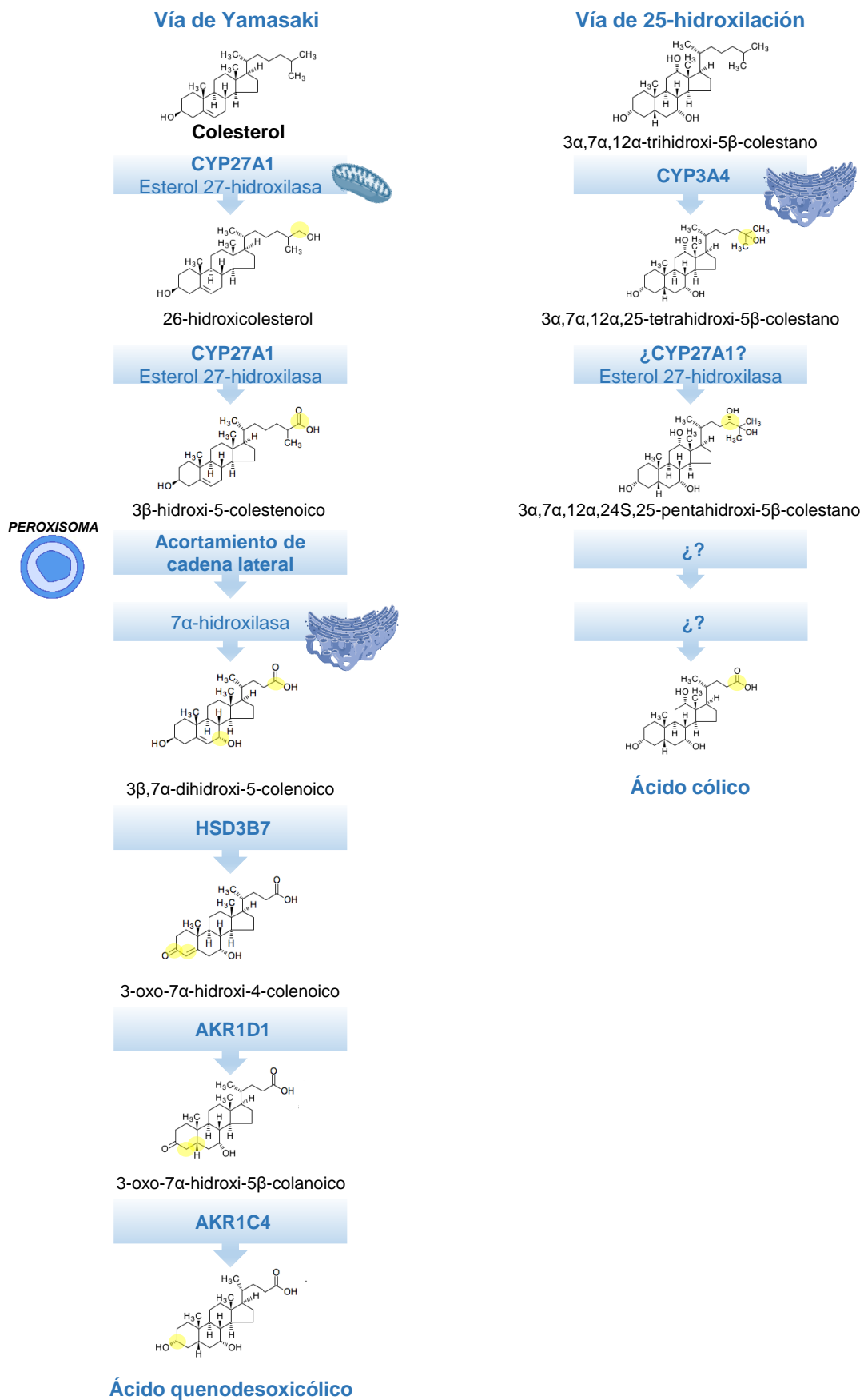


Figura I7.- Representación esquemática de las vías de Yamasaki y 25-hidroxilación para la biosíntesis de ácidos biliares. HSD3B7; 3β-hidroxi-Δ⁵-C₂₇-esteroide oxidorreductasa; AKR1D1: Δ⁴-3-oxoesteroide-5β-reductasa; AKR1C4: 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

2.2.4.- Circulación enterohepática

El término “circulación enterohepática” describe el movimiento cíclico que sufren los ABs desde su secreción en bilis, pasando por su tránsito y concentración en el sistema biliar, liberación al duodeno y absorción en íleon e intestino grueso, hasta su recaptación por los hepatocitos a través de la sangre portal (Figura I8). Se trata de un proceso de elevada eficiencia, ya que diariamente ocurre entre 6 y 10 veces y sólo se pierde por vía fecal el 5% del *pool* de ABs (30).

Como ya se ha comentado, los ABs tienen un papel muy importante en la secreción de la bilis, generando la fracción del flujo biliar dependiente de ABs. Otra serie de compuestos que también sufren transporte activo a través de la membrana canalicular del hepatocito, generan la fracción independiente de ABs. Entre estas moléculas se encuentran la bilirrubina conjugada, el glutatión, el bicarbonato, otros productos provenientes del metabolismo interno y algunos xenobióticos. La capacidad de los solutos para generar el gradiente osmótico que determina el movimiento de agua hacia el canalículo biliar se denomina actividad colerética, y se define como el volumen de flujo de bilis inducido por unidad de soluto secretada. En este proceso de formación de la bilis, los ABs monoaniónicos son transportados hacia el canalículo biliar por la bomba exportadora de sales biliares (BSEP) dependiente de ATP (31), si bien una minoría de ABs sulfatados o conjugados con ácido glucurónico dianiónicos son secretados por otros transportadores de la familia ABC como MRP2 y BCRP (32), la cual también transporta ABs monoaniónicos (33).

En su paso por los conductos biliares, los ABs dihidroxilados no conjugados pueden ser captados por los colangiocitos y devueltos a la sangre portal en un proceso conocido como circulación colehepática o *cholehepatic shunt* (34). Mediante la acción del transportador apical de ABs dependiente de sodio (ASBT), junto con el transportador de solutos orgánicos heteromérico (OST α /OST β) localizado en la membrana basolateral del colangiocito, estos ABs no conjugados son reexpuestos a los hepatocitos, donde pueden ser conjugados y secretados de nuevo a bilis (35). Además, en el caso de ABs con

elevado pKa como el UDCA, este proceso genera una hipercoleresis rica en bicarbonato. Se considera que su relevancia en condiciones fisiológicas no es elevada debido al bajo porcentaje de ABs no conjugados secretados a bilis. Sin embargo, este mecanismo cobra importancia en los tratamientos farmacológicos con UDCA y nor-UDCA, ya que las dosis administradas suelen superar la capacidad de los sistemas de conjugación (36,37).

La bilis primaria fluye por el árbol biliar hacia la vesícula biliar, donde se concentra gracias a la absorción de agua y electrolitos. Posteriormente, la liberación de colecistocinina mediada por la ingesta de alimento genera un estímulo de contracción de la vesícula biliar, junto con la relajación del esfínter de Oddi al final del conducto biliar común, permitiendo la liberación de bilis al primer tramo del duodeno al inicio de la digestión.

Una vez cumplidas sus funciones digestivas (apartado 2.2.2), la práctica totalidad (95%) de los ABs son reabsorbidos en su tránsito a través del intestino. Una pequeña fracción de ABs puede ser absorbida por difusión pasiva a nivel del yeyuno (38). Sin embargo, es en el íleon distal donde ocurre la mayor reabsorción de ABs gracias a la presencia de ASBT en la membrana apical de los ileocitos. Este transportador sodio-dependiente es capaz de captar la mayoría de especies de ABs, con preferencia por las trihidroxiladas sobre las dihidroxiladas, y de las conjugadas sobre las no conjugadas (39). Alcanzado el interior del enterocito, la proteína citosólica ileal de unión de ABs (IBABP) los atrapa, actuando como un buffer que reduce la interacción de estas moléculas con la membrana celular y facilita su transporte transcelular (40). A continuación, es el heterodímero OST α /OST β , localizado en la membrana basolateral de los enterocitos, el que libera los ABs hacia la sangre, con la que finalmente alcanzan la vena porta (41). No obstante, un pequeño porcentaje de ABs se escapa de la absorción ileal y pasa hacia el intestino grueso y el colon, donde la flora intestinal genera ABs secundarios (apartado 2.2.5), de los cuales una parte son absorbidos por difusión pasiva.

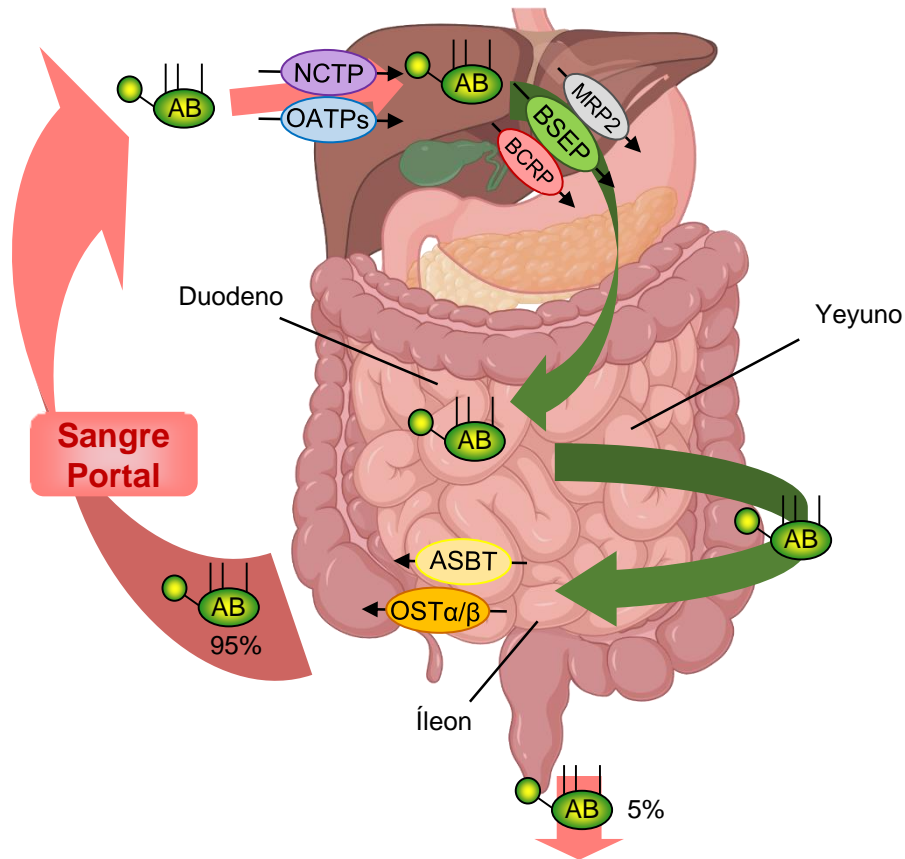


Figura 18.- Proceso de circulación enterohepática de los ácidos biliarios (ABs), mediado por distintos transportadores.

Una vez alcanzada la circulación sanguínea, los ABs se unen a la albúmina plasmática formando agregados que pasan a través de las fenestras de las células sinusoidales endoteliales del hígado. Allí, los hepatocitos periportales, expuestos a las concentraciones más altas de ABs, llevarán a cabo la captación de estas moléculas gracias a los transportadores presentes en su membrana basolateral. Los ABs conjugados son captados principalmente por el polipéptido cotransportador de sodio y taurocolato (NTCP) (42), mientras que los ABs no conjugados son transportados por un mecanismo independiente de sodio mediado por proteínas de la familia de transportadores de aniones orgánicos (OATPs), destacando OATP1B1 y OATP1B3 en la especie humana (43). Finalmente, los ABs recaptados pueden ser reconjugados o sufrir otra serie de reacciones metabólicas, como ocurre en la sulfatación de las especies conjugadas del LCA (44), para volver a ser secretados a la bilis a través de la

membrana canalicular del hepatocito, cerrando así el ciclo de la circulación enterohepática.

No obstante, el efecto de primer paso de los ABs no es completo, aunque tiene una elevada efectividad que varía entre un 50 y un 90% dependiendo de la especie molecular, lo que permite un mínimo escape de los ABs hacia la circulación sistémica (30). Estas moléculas pueden volver al hígado a través de la arteria hepática o llegar al riñón, donde se filtran a través del glomérulo y son recaptados por ASBT a nivel del túbulo contorneado proximal (39). Durante el ayuno, el nivel de ABs plasmáticos totales está en torno a 2 μM , valor que se triplica durante la digestión. Sin embargo, diferentes patologías hepáticas pueden modificar tanto los niveles como el perfil plasmático de ABs, por lo que estas moléculas tienen un gran valor como biomarcadores de daño hepático (45).

2.2.5.- Transformación de los ABs por la microbiota intestinal

Durante su tránsito intestinal, los ABs primarios sufren una serie de modificaciones por acción de las bacterias intestinales, generando ABs secundarios. Las transformaciones más importantes se detallan a continuación.

La desconjugación de los ABs consiste en la rotura del enlace amido presente en la posición C₂₄, permitiendo la liberación del AB no conjugado y de taurina o glicina. Esta reacción es llevada a cabo por las hidrolasas bacterianas de ABs, enzimas presentes en gran cantidad de microorganismos que componen la flora intestinal humana, como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Bacteroides* (46). Esta desconjugación es necesaria para que se puedan llevar a cabo otras reacciones que requieren la presencia de un ácido carboxílico libre en la molécula (47). Una de estas reacciones es la 7 α -deshidroxilación, en la que se generan 7 α -desoxi ABs. Es el proceso de biotransformación bacteriana de ABs más importante a nivel intestinal, y es llevado a cabo por las deshidroxilasas bacterianas de la flora anaerobia, destacando los géneros *Clostridium* y *Eubacterium* (46). De esta manera se

produce la transformación de CA en DCA, y de CDCA en LCA, los ABs secundarios mayoritarios en la especie humana.

La oxidación de los grupos hidroxilo en las posiciones 3 α , 7 α y 12 α genera ceto-ABs por acción de las hidroxisteroide deshidrogenasas bacterianas, presentes en actinobacterias, proteobacterias, firmicutes y bacteroidetes (46). Estas reacciones son reversibles y pueden llevar también a la epimerización generando grupos β -hidroxilo. De esta manera se forma el UDCA a partir de CDCA por 7 α /7 β isomerización, reacción llevada a cabo por *Clostridium absonum* (48). Otros ABs que sufren una transformación similar son el DCA y el LCA, que por 3 β -hidroxiepimerización generan ácido isodesoxicólico y ácido isolitocólico respectivamente (49). Se conoce la existencia de otras reacciones que afectan a los ABs como la esterificación y la polimerización, vías que hasta la fecha han sido poco estudiadas (12).

Las modificaciones comentadas tienden a incrementar la hidrofobicidad y el pKa de las distintas especies de ABs, alterando sus propiedades detergentes, señalizadoras y su toxicidad. De hecho, una elevada concentración de ABs secundarios en sangre, bilis y heces se ha asociado con algunas patologías como el cáncer de colon o la litiasis biliar. Aunque el aumento de la lipofilia facilita la eliminación de una pequeña proporción de ABs por vía fecal, algunos ABs secundarios son absorbidos a nivel colónico, modificando así la composición del *pool* y desencadenando diferentes respuestas de señalización. Además, las distintas proporciones de ABs a nivel intestinal afectan también al crecimiento y a la diversidad de la microbiota intestinal. Así, se pone de manifiesto que la relación ABs-microbioma genera un eje de interacciones complejo en el que hospedador y huésped regulan tanto el tamaño como la composición de la flora bacteriana y del *pool* de ABs, lo cual tiene repercusiones a nivel tanto fisiológico como fisiopatológico (50).

2.2.6.- Regulación de la homeostasis de los ABs

2.2.6.1.- Receptores nucleares activados por ABs

Los receptores nucleares (RNs) son una familia de factores de transcripción dependientes de ligando que regulan una gran cantidad de procesos fisiológicos mediante la interacción con el promotor de sus genes diana, induciendo la transcripción de los mismos. Todos los RNs poseen una estructura proteica similar: una región N-terminal AF-1 (*Activation Function 1*) involucrada en la interacción con co-activadores y co-represores; un dominio altamente conservado de unión a ADN (DBD, *DNA-Binding Domain*) responsable de la interacción con las denominadas “secuencias consenso” del ADN; una región bisagra que facilita su organización tridimensional; un dominio de unión al ligando (LBD, *Ligand-Binding Domain*) con alta variabilidad que determina la afinidad del RN por sus potenciales ligandos y permite su clasificación en distintas subfamilias; y finalmente una región C-terminal AF-2 (*Activation Function 2*) responsable de la activación transcripcional dependiente de ligando y de la dimerización con otros RNs (51). Por lo general, en ausencia de ligando, los RNs se encuentran unidos a co-represores e inactivos. Sin embargo, una vez que ocurre la interacción RN-ligando, los co-activadores desplazan a los co-represores, permitiendo la formación de homo o heterodímeros de RNs que interaccionan con el complejo activador de la transcripción sobre las secuencias consenso reconocidas en los promotores de los genes diana, iniciando así el proceso de transcripción.

El primer RN identificado como receptor de ABs fue FXR (*Farnesoid X Receptor*), y hasta la fecha se mantiene como el principal implicado en la señalización celular mediada por ABs. En el ser humano existen dos genes diferentes para FXR: *FXR β* que constituye un pseudogen; y *FXR α* que mediante usos alternativos del promotor y por *splicing* puede generar hasta cuatro variantes diferentes de FXR α , las cuales se expresan principalmente a lo largo de todos los tejidos implicados en la circulación enterohepática (52,53). La activación de FXR induce su heterodimerización con RXR (*Retinoid X Receptor*), permitiendo su unión a elementos de respuesta a FXR,

aunque también se ha visto que puede interaccionar con el ADN en forma de monómero (54). FXR responde de forma diferencial a las distintas especies de ABs libres y conjugadas, de tal forma que su agonista natural más potente es el CDCA, seguido del LCA, DCA, CA y UDCA; si bien algunos ABs como los MCAs se consideran antagonistas de dicho receptor (55,56).

Otros tres RNs estructuralmente relacionados con FXR y que también están implicados en la homeostasis de los ABs son PXR (*Pregnane X Receptor*), CAR (*Constitutive Androstane Receptor*) y VDR (*Vitamin D Receptor*). PXR y CAR son los principales RNs implicados en la detoxificación de compuestos endógenos y xenobióticos, y se expresan principalmente en hígado e intestino. PXR destaca por su alta promiscuidad de agonistas, ya que puede ser activado por el 60% de los fármacos existentes, mientras que CAR es activo de forma constitutiva. VDR se expresa en la mayoría de los tejidos y se activa principalmente por la 1 α ,25-dihidroxitamina D₃. Tanto PXR como VDR responden a la activación por LCA y su metabolito 3-ceto LCA (57,58), mientras que ningún AB parece ser ligando de CAR (59). Todos ellos heterodimerizan con RXR para llevar a cabo su actividad. Finalmente, el receptor hepático de oxisteroles LXR α (*Liver X Receptor α*) también está implicado en la regulación de la biosíntesis de ABs, aunque estos compuestos no se comportan como ligandos de LXR α .

2.2.6.2.- Regulación de la biosíntesis de los ABs

La vía de regulación principal por la que los ABs controlan su propia biosíntesis se lleva a cabo mediante un mecanismo de *feedback* negativo sobre la transcripción de *CYP7A1*, la enzima llave cuya regulación marca la actividad general de la ruta clásica. En el promotor de *CYP7A1* se han identificado dos secuencias altamente conservadas y esenciales para la transcripción basal, llamadas BARE (*Bile Acid Response Elements*). BARE-I se localiza en -74/-55, y en roedores contiene una secuencia de repetición directa separada por cuatro pares de bases (DR4), a la que se une el factor de transcripción COUP-TFII, Rxr y Lxr α , incrementando la actividad del promotor de *Cyp7a1* (60,61). El promotor del gen *CYP7A1* humano carece de

esa secuencia consenso DR4, por lo que no responde a la activación por LXR α (62). Por otra lado, BARE-II se localiza en -148/-129 y está compuesto por motivos DR1 y DR5 superpuestos a los que se une HNF4 α (*Hepatocyte Nuclear Factor 4 α*) activando la transcripción de *CYP7A1* (63). BARE-II contiene asimismo un sitio de unión para otro factor de transcripción de *CYP7A1*, FTF (*α -Fetoprotein Transcription Factor*) también llamado CPF (*CYP7A1 Promoter binding Factor*), o Lrh-1 (*Liver Related Homologue-1*) para su ortólogo murino (64). Además, el factor de transcripción PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator-1 α*) también puede unirse al promotor de *CYP7A1* incrementando su actividad transcripcional, y consecuentemente la expresión de este gen (65).

El mecanismo más importante por el que los ABs regulan la transcripción de *CYP7A1* se lleva a cabo a través de FXR (Figura I9). A nivel hepático, la activación de FXR mediada por ABs permite la formación del heterodímero FXR-RXR, el cual se une al promotor del gen *NR0B2*, incrementando la transcripción del receptor nuclear SHP (*Small Heterodimer Partner*). Esta proteína se une a continuación con FTF/Lrh-1, impidiendo la interacción de éste con el promotor de *CYP7A1* y reduciendo así su transcripción. Además, SHP sería capaz de regular su propia transcripción a través del mismo mecanismo (66). SHP también puede interaccionar con HNF4 α , disminuyendo nuevamente la transcripción tanto de *CYP7A1* como *CYP8B1* (17,67). Además, la activación de FXR intestinal debida a la entrada de ABs en el ileocito incrementa la síntesis y liberación a la sangre portal de FGF19 (*Fibroblast Growth Factor 19*), o su ortólogo Fgf15 en roedores. Este péptido alcanza la membrana del hepatocito, donde se une al receptor FGFR4 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 4*) el cual necesita de la presencia de su co-receptor β -Klotho, una característica que confiere especificidad hepática a esta ruta de señalización. A continuación el FGFR4 activo fosforila a FRS2 α (*Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2 α*), desencadenando una cascada intracelular mediada por ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) y JNK (*c-Jun N-terminal Kinases*), cuyos efectores aguas abajo para esta ruta se desconocen, y que provocan la caída de la actividad

transcripcional de *CYP7A1* por impedir la interacción de FTF y HNF4 α con el promotor de dicho gen (68). Se ha sugerido que esta vía podría ser independiente de SHP en la especie humana, al contrario que en roedores (69). Estudios en hepatocitos humanos han demostrado que el tratamiento con agonistas de FXR induce la expresión y secreción de FGF19 en estas células, lo cual sugiere la existencia de una regulación autocrina a través de este mecanismo (68).

Parece que la proteína MafG, cuya expresión en roedores es inducida por Fxr, también se encuentra implicada en la regulación del metabolismo de los ABs. Así, el incremento de MafG reprime la expresión de genes codificantes para diversas enzimas tanto de la ruta clásica como alternativa de biosíntesis, como *Cyp7a1*, *Cyp27a1*, *Cyp7b1* y *Cyp8b1* entre otras, modificando tanto el tamaño como la composición del *pool* de ABs. No obstante, se desconoce la implicación real de esta ruta a nivel fisiológico así como su posible existencia en la especie humana (70).

PXR también se encuentra implicado en la regulación de la biosíntesis de los ABs, ya que está descrito como un gen diana de FXR (71) y su activación impide la interacción de los factores de transcripción PGC-1 α y HNF4 α con el promotor de *CYP7A1* (72). VDR puede reprimir la transcripción de *CYP7A1* de una forma similar (73) así como a través de la activación de la vía de ERK1/2 (74). Además, tanto PXR como VDR aumentan la expresión intestinal de FGF19/Fgf15, llevando también a cabo una regulación indirecta sobre *CYP7A1* (75,76). Sin embargo, se ha propuesto que VDR sería capaz de reducir la expresión de SHP, lo que provoca el aumento consecuente de la expresión de *CYP7A1* (77). La activación de CAR también reprime la transcripción de *CYP7A1* en hepatocitos humanos (78), y en ratones es capaz de incrementar la expresión de *Fxr*, *Cyp8b1*, *Cyp27a1* y *Ugt1a1*, disminuyendo el tamaño del *pool* de ABs y haciéndolo más hidrofílico (59).

El papel de LXR α sobre la regulación de ABs difiere según la especie animal que tratemos. En el promotor de *Cyp7a1* de rata existe un sitio de unión para

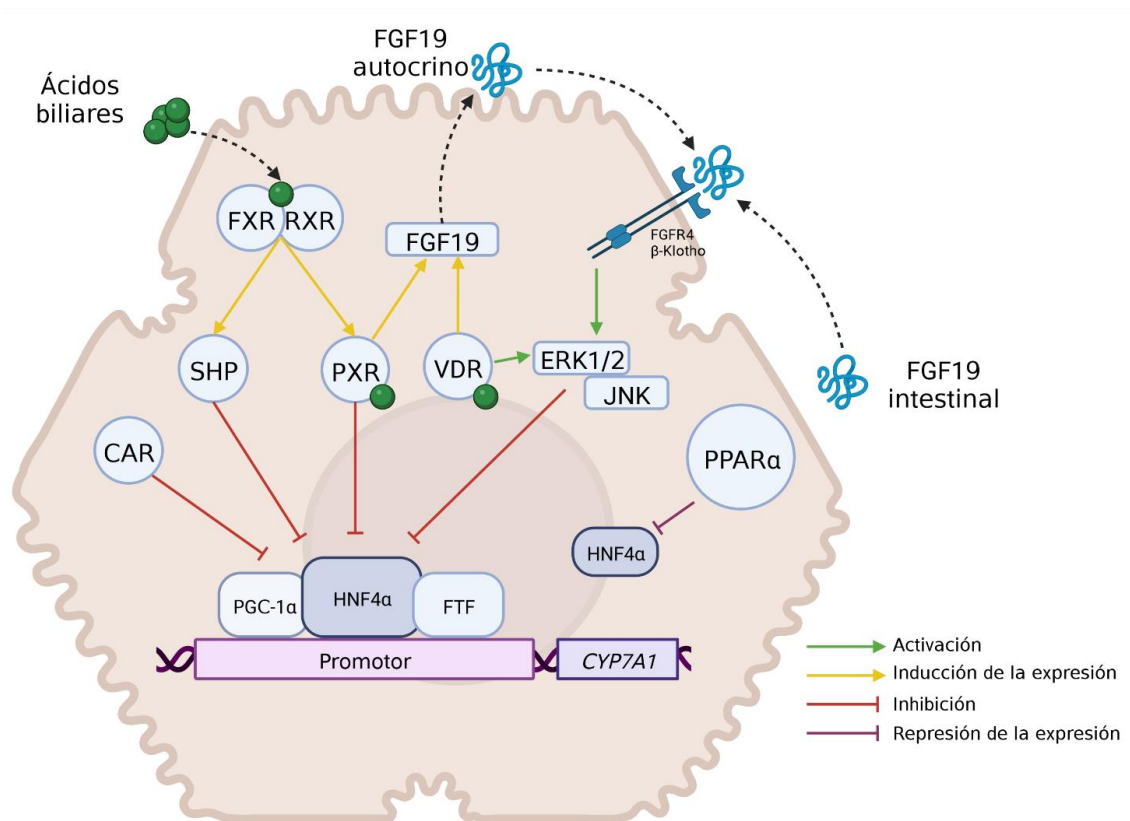


Figura 19.- Regulación de la actividad transcripcional de *CYP7A1* a través de los principales receptores nucleares y el péptido intestinal FGF19.

este RN de oxisteroles (61), y una dieta rica en colesterol se asocia con un incremento de la transcripción de *Cyp7a1* en estos animales (79). Además, ratones *knock-out* para *Lxra* alimentados con esta misma dieta no presentan cambios en la expresión de *Cyp7a1* (80), sugiriendo que *Lxra* actúa como un sensor de colesterol en estas especies y que a través de la regulación de *Cyp7a1* se incrementa la biosíntesis de ABs para facilitar la eliminación de un exceso de colesterol. Por el contrario, esta regulación positiva a través de *LXRα* no solamente no ocurre en humanos (62), sino que la activación de este RN reduce la expresión de *CYP7A1* mediante la inducción de SHP de forma análoga a FXR (81).

La aparición de cálculos biliares asociada al tratamiento de hiperlipidemias con fibratos puso de manifiesto la posible relación entre la diana de estos fármacos, el receptor PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*), y los ABs. Así, se averiguó que los ABs incrementan, a través de FXR, la expresión

de PPAR α , el cual media la represión transcripcional de HNF4 α , disminuyendo consecuentemente la expresión de *CYP7A1* (82). No obstante, existe cierta controversia sobre el papel de PPAR α en el control transcripcional de *CYP7A1*, ya que PPAR α puede unirse al sitio DR1 presente en BARE-II, al que llaman *site II*, induciendo un ligero incremento de la actividad transcripcional (83). En humanos se puede formar el heterodímero LXR α :PPAR α , que se une a un sitio de reconocimiento parcial compartido por ambos (*site I*) localizado en BARE-I (84) generando una caída de la actividad del promotor de *CYP7A1* a pesar de la ausencia de la secuencia DR4 (62). En el caso de los roedores, la activación de PPAR α por ácidos grasos y el consecuente incremento de la transcripción de *Cyp7a1* a través de la unión a *site I* es mucho más marcado (83), y la formación del dímero Lxr α :Ppara tiene un efecto similar al descrito en humanos (85). Sin embargo, el tratamiento de hepatocitos de rata con agonistas de PPAR α reduce tanto la actividad como la expresión de *Cyp7a1*, efecto que se corrobora *in vivo* (86). El nivel de expresión de *CYP27A1* también se ve afectado por la activación de PPAR, si bien parece que puede ser modificado al alza o a la baja en función del tejido y la isoforma de PPAR activada (87).

2.2.6.3.- Regulación de la biotransformación y el transporte de los ABs

El primer proceso que sufren los ABs a fin de aumentar su solubilidad y facilitar su eliminación es la conjugación por N-acil amidación con glicina o taurina. Esta reacción es llevada a cabo por las enzimas BACS y BAAT, cuya transcripción se encuentra regulada por FXR (88). Este RN, junto con PXR, VDR y CAR, también puede inducir la expresión de CYP3A4, permitiendo la hidroxilación de ABs tanto primarios como secundarios y facilitando así su eliminación (89). La regulación positiva de la sulfotransferasa SULT2A1 mediada por FXR, PXR, VDR y CAR juega un papel central en la biotransformación de los ABs (90–93). Además, estas moléculas también pueden ser conjugadas por glucuronidación, favorecida por PXR y CAR al estimular la transcripción de UGT1A1 (94), mientras que FXR hace lo propio con UGT2B4 y UGT2B7 (95,96).

Los ABs pueden promover su propia eliminación. Así, se ha visto que la expresión de BSEP está regulada positivamente por FXR (97), mientras que la regulación transcripcional de MRP2 implica tanto a FXR como a PXR y CAR, algo que puede explicarse debido a la mayor diversidad de sustratos de MRP2 (98). A nivel intestinal la activación de FXR limita la captación de ABs y facilita su eliminación basolateral con el fin de reducir su toxicidad en los enterocitos. Así, FXR reduce la expresión de ASBT tanto por mecanismos dependientes de SHP (99) como de FGF19/Fgf15 (100), y a su vez facilita la transcripción de IBABP (101) y OST α/β (102). Los transportadores de captación de la membrana basolateral de los hepatocitos también se ven afectados por la regulación a través de RNs, de tal forma que la expresión de Ntcp se reduce en roedores a través del eje Fxr/Shp (103), así como la de OATP1B1 (104) y OATP1B3 (105) en humanos. Además, los transportadores implicados en la exportación a través de la membrana sinusoidal como MRP3, MRP4 y OST α/β ven incrementada su transcripción por la activación de FXR, PXR, VDR y CAR (106–108), permitiendo el flujo alternativo de ABs hacia sangre en situaciones de colestasis.

2.2.6.4.- Mecanismos de regulación de la homeostasis de ABs independientes de receptores nucleares

Los ABs se encuentran integrados en la señalización de funciones hepáticas tan importantes como el metabolismo glucídico y lipídico. La insulina puede tener un efecto dual sobre el metabolismo de ABs, de tal forma que a niveles fisiológicos facilita la transactivación de *CYP7A1* debido a la inhibición de FoxO1, un represor de HNF4 α y PGC-1 α (109); mientras que a dosis elevadas disminuye la expresión de *CYP7A1* tanto por activación de la ruta AKT/PKB y quizás ERK1/2 como por incremento de SREBP-1c, el cual interacciona con HNF4 α (110) (Figura I10). Por otro lado, tanto el glucagón como el AMPc activan PKA (*Protein Kinase A*), capaz de fosforilar e inhibir HNF4 α . Por otra parte, los ABs son capaces de modular estas vías metabólicas. Por ejemplo, la activación de SHP por FXR reduce la lipogénesis de novo al reprimir SREBP-1c (111) y reduce la síntesis de VLDL al interaccionar con HNF4 α

sobre el promotor de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomales (*Microsomal triglyceride Transfer Protein*, MTP) (112).

Otras vías de señalización de los ABs implican a algunos receptores de membrana conocidos como GPCR (*G-Protein Coupled Receptor*). Uno de ellos es TGR5, expresado en células de Kupffer y células sinusoidales endoteliales hepáticas. Se caracteriza por una respuesta dosis-dependiente para los ABs en el siguiente orden de potencia: LCA>DCA>CDCA>CA, presentando las especies tauroconjugadas mayor capacidad de activación que las no conjugadas y las glicoconjugadas (113). Su activación incrementa la concentración intracelular de AMPc, lo cual disminuye la traslocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B y reduce la producción de citoquinas proinflamatorias como la interleucina (IL) 1 α (IL1 α), IL1 β , IL6 y el factor de necrosis tumoral α (*Tumoral Necrosis Factor α* , TNF α) en las células de Kupffer (114). Otro GPCR a destacar es S1PR2, expresado en hepatocitos y cuya activación por ABs conjugados desencadena la actividad tanto de AKT como de ERK1/2, lo cual activa a la SphK2 (*Sphingosine Kinase 2*) nuclear lo que produce un incremento en los niveles de esfingosina-1-fosfato (S1P) en el núcleo. S1P inhibe ciertas enzimas histona desacetilasas, lo cual aumenta la acetilación de las histonas y la actividad transcripcional de genes como FXR y otros implicados en el metabolismo glucídico y lipídico como SREBP-1c o LDLR (115). A pesar de que se dispone de poca información sobre la importancia de S1PR2 en la homeostasis de los ABs, los datos obtenidos apoyan la gran relevancia de estos compuestos como parte integral del metabolismo hepático general. Las citoquinas también pueden modificar la biosíntesis de los ABs (Figura I10). Tanto TNF α como IL1 β , liberadas por las células de Kupffer, activan distintos receptores TLR (*Toll-Like Receptors*) desencadenando la señalización a través de MEK4/7 y JNK1/2, lo cual fosforila HNF4 α e inhibe la transcripción de *CYP7A1* (116). Además, el TGF β 1 (*Tumoral Growth Factor β 1*) secretado por las células estrelladas hepáticas activa las vías de SMAD3 y JNK en los hepatocitos, la cual conduce a la inhibición de HNF4 α , con la consecuente caída en la expresión de *CYP7A1* (117). Finalmente, el HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) de las células

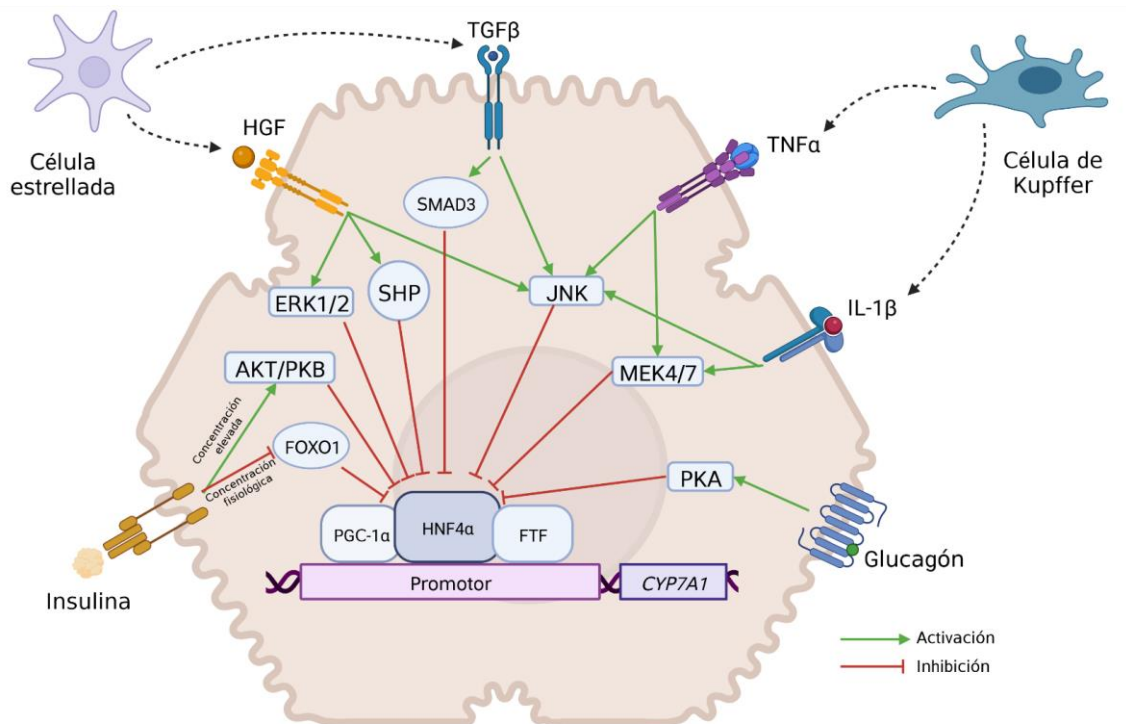


Figura 110.- Regulación de la actividad transcripcional de *CYP7A1* por mediadores independientes del receptor FXR.

estrelladas inhibe de forma rápida la transcripción de *CYP7A1* en los hepatocitos a través de SHP, cJun, ERK1/2 y JNK (118).

2.3.- PAPEL DE LOS ABs EN PATOLOGÍAS HEPÁTICAS

2.3.1.- Colestasis

La colestasis es una condición clínica que consiste en la reducción del flujo de bilis que alcanza el duodeno, y puede clasificarse como intrahepática o extrahepática en función de la localización del trastorno. Las colestasis intrahepáticas se deben a una disminución de la producción de bilis, causada por alteraciones en el metabolismo o transporte de los ABs, exposición a determinados fármacos, cambios hormonales durante el embarazo o trastornos donde la respuesta inmune es crucial, como en la sepsis, la colangitis biliar primaria o la colangitis esclerosante primaria. Por otra parte, las colestasis extrahepáticas se deben a la obstrucción de la luz del árbol biliar como consecuencia de la aparición de formaciones tumorales, cicatrices, bridas, cálculos biliares o determinadas enfermedades císticas (119).

La acumulación de ABs hidrofóbicos, secundaria a la ausencia de un flujo de bilis efectivo, provoca un desbalance en el estado de oxido-reducción de los hepatocitos que conduce a la apoptosis celular (120,121). Como consecuencia, se desencadena un estado proinflamatorio que induce la aparición de depósitos de fibronectina en células ductulares reactivas, lo cual puede conducir a la aparición de fibrosis biliar y periportal, una situación predisponente a la transformación cancerosa (119).

2.3.2.- Esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica

La enfermedad del hígado graso no alcohólica (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) es una patología que abarca un abanico de entidades clínicas, desde la esteatosis simple (*Non-Alcoholic Fatty Liver*, NAFL) caracterizada por la acumulación hepática de triglicéridos, hasta la esteatohepatitis no alcohólica (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis*, NASH) definida por la aparición de inflamación lobular y *ballooning* hepatocitario, con o sin fibrosis. Por degeneración de la terminología, en clínica se utilizan frecuentemente las siglas NAFLD para referirse a la esteatosis sin inflamación o NAFL. La posible progresión de NAFL hacia NASH, cirrosis e incluso la aparición de hepatocarcinoma hace que la NAFLD sea la segunda causa de enfermedad hepática que requiere de trasplante hepático en los países desarrollados. Se considera que su etiopatogenia es multifactorial y que viene definida por alteraciones debidas a la obesidad, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo II. La acumulación excesiva de grasa en los adipocitos y su consecuente muerte producen una inflamación local que promueve la resistencia a la insulina, comprometiendo la capacidad del adipocito para acumular ácidos grasos y facilitando la expulsión de estas moléculas al torrente sanguíneo, de donde son captados por los hepatocitos. La producción excesiva de triglicéridos a nivel hepático puede provocar la aparición de estrés oxidativo, estrés de retículo endoplasmático y activación de receptores de muerte induciendo así la apoptosis y necroptosis de los hepatocitos (122).

Los ABs pueden contribuir a la aparición y progresión de NAFLD, puesto que su homeostasis se encuentra alterada en esta patología. Los niveles séricos de ABs totales se encuentran aumentados en pacientes con NAFLD, con un mayor incremento de ABs primarios y conjugados (123). Asimismo, alteraciones específicas en los niveles de determinadas especies moleculares de ABs pueden asociarse a la severidad de la patología y la progresión de la fibrosis, *ballooning* e inflamación en NASH (124). Algunos de estos cambios se han relacionado con las alteraciones encontradas en NAFLD en las vías de regulación del metabolismo de ABs ya comentadas (apartado 2.2.6). En pacientes con esta enfermedad se observa una caída en los niveles de FXR que correlaciona con la progresión de la misma (125), así como una disminución de la concentración plasmática de FGF19 y un aumento de la expresión hepática de CYP7A1 (126). No obstante, algunas de las comorbilidades asociadas a NAFLD como son la obesidad y la resistencia a la insulina también se caracterizan por presentar alteraciones en los niveles de ABs (127), lo cual dificulta la interpretación del verdadero papel de estas moléculas en NAFLD y si la desregulación observada es causa o consecuencia de dicha patología.

2.3.3.- Daño hepático inducido por fármacos

Se conoce como daño hepático inducido por fármacos (*Drug Induced Liver Injury, DILI*) a cualquier afectación del hígado cuya noxa sea una molécula con actividad farmacológica, la cual provoca una alteración de la bioquímica hepática que puede estar o no asociada con la aparición de manifestaciones clínicas. Se trata de un evento poco frecuente pero de gran relevancia, al ser la causa de la mayor parte de los casos de fallo hepático agudo en Estados Unidos y uno de los principales motivos para la retirada de fármacos del mercado (128).

El DILI intrínseco se define por la aparición de toxicidad dosis-dependiente, habitualmente predecible y explicable a través de mecanismos bien definidos asociados al fármaco. El fármaco en su forma primaria o alguno de sus metabolitos generados por reacciones de fase I se acumulan debido a un

metabolismo de fase II ineficiente, saturado por una producción excesiva del tóxico o por depleción de moléculas conjugantes que faciliten su eliminación. Así, las moléculas reactivas alteran el balance de oxido-reducción y el transporte de ABs, entre otros mecanismos, provocando la apoptosis o necrosis de los hepatocitos, liberando una serie de moléculas que pueden activar la respuesta inmune innata retroalimentando así el proceso dañino (129). El ejemplo más importante de DILI intrínseco es la intoxicación por paracetamol, que en Estados Unidos llega a provocar el 46% de los casos de fallo hepático agudo. La acumulación de N-acetil-p-benzoquinonimina por depleción de las reservas de glutatión provoca una necrosis hepatocelular grave que puede evitarse mediante la administración del antídoto N-acetilcisteína (128).

Por el contrario, el DILI idiosincrásico (*idiosyncratic DILI*, iDILI) se asocia a la respuesta de cada individuo a la toxicidad inducida por el fármaco, y se caracteriza por su aparición impredecible e independiente de la dosis de fármaco, con un periodo de latencia variable. Si bien los mecanismos tóxicos clásicos descritos para el DILI intrínseco intervienen en las etapas tempranas, la participación del sistema inmune parece clave en la patogénesis del iDILI. La hipótesis de formación de haptenos propone que la formación de neoantígenos a partir de la unión de la molécula tóxica con proteínas celulares y su posterior presentación al complejo de antígenos leucocitarios humanos (*Human Leukocyte Antigen*, HLA) provoca el reclutamiento de linfocitos T citotóxicos, células *natural killer* e incluso la generación de anticuerpos. Otras posibilidades implican la interacción directa del fármaco o su metabolito sobre el HLA provocando así la activación de células T y la generación de daño hepatocitario. La susceptibilidad a la aparición de iDILI en individuos con determinados polimorfismos en las moléculas del HLA pone de manifiesto la gran relevancia de la presentación antigénica en este proceso, si bien la mayoría de individuos con estas alteraciones genéticas consideradas de riesgo no presentan ningún tipo de daño cuando se ven expuestos a diversos fármacos estudiados. Esta afirmación sugiere la implicación de fenómenos de respuesta adaptativa que

impiden la exacerbación de un daño subletal. Así, el iDILI aparecería como consecuencia de un fallo en este proceso de tolerancia inmune (129).

Puede deducirse, por lo tanto, la relevancia que pueden adquirir diferentes factores de riesgo sobre esta entidad clínica. Algunas características intrínsecas de cada fármaco, como una mayor lipofilia o un elevado grado de metabolismo hepático aumentan su potencial hepatotóxico. Otras propiedades como la posible formación de especies metabólicas reactivas, la capacidad para provocar daño mitocondrial y la alteración de la función de las bombas transportadoras hepatocitarias también deben ser tenidas en cuenta. Respecto de los factores de riesgo del paciente, cabe destacar una mayor incidencia de DILI en individuos de edad avanzada, un hecho que puede explicarse por la reducción de la actividad metabólica hepática y la polimedicación. La existencia de condiciones de daño previo debido a enfermedades hepáticas crónicas se asocia con una mayor gravedad al verse alterada la capacidad regenerativa del hígado. Cabe destacar la importancia de la Farmacogenética en la identificación de mutaciones relacionadas con la aparición de DILI en determinados genes como las ya comentadas para las proteínas HLA, o la variante rs2476601 de PTPN22, un regulador de la actividad de los linfocitos T (129).

La presentación clínica del DILI es muy variable, pudiendo confundirse con gran cantidad de enfermedades hepáticas tanto agudas como crónicas, lo que dificulta su diagnóstico. Habitualmente se observa un incremento de los niveles séricos de transaminasas y/o fosfatasa alcalina, que pueden acompañarse de un aumento de los valores de bilirrubina total. No obstante, los marcadores bioquímicos séricos de disfunción hepática no presentan la especificidad suficiente como para establecer un diagnóstico, además de que en muchas ocasiones estas alteraciones pasan desapercibidas sin presencia de sintomatología y pueden llegar a resolverse tanto con la continuación del tratamiento como con la reducción de la dosis del fármaco en cuestión. Así, el diagnóstico se basa en la exclusión de causas alternativas de daño hepático junto con la obtención de una historia clínica completa que permita el

establecimiento de una asociación temporal. El personal clínico debe tener en cuenta todos los fármacos empleados por el paciente, tanto de prescripción como de venta libre, junto con suplementos dietéticos y plantas medicinales, evaluando el potencial hepatotóxico descrito en la bibliografía e intentando establecer una cronología de uso dentro del posible periodo de latencia de la patología, habitualmente de unos tres meses desde el inicio del tratamiento. Además, debe descartarse la presencia de hepatitis virales, hepatitis autoinmunes, obstrucción biliar, etc. La obtención de una biopsia de tejido únicamente está justificada cuando existen sospechas de alteraciones autoinmunes o cuando tras la retirada del fármaco no se recupera la bioquímica hepática. Una vez descartadas otras posibles causas y determinado el fármaco sospechoso, el diagnóstico de confirmación se realiza mediante la determinación de los valores de bioquímica hepática, que debería volver a los valores normales tras la suspensión del tratamiento (130).

Con el objetivo de estandarizar el diagnóstico del DILI, se ha intentado establecer diversos algoritmos de causalidad, entre los que cabe destacar CIOMS/RUCAM, la única escala validada hasta la fecha. Emplea algunos de los criterios expuestos con anterioridad, como la asociación temporal, los factores de riesgo o el potencial hepatotóxico de los fármacos candidatos para establecer una probabilidad de diagnóstico de DILI. No obstante, es una escala antigua que le da gran peso a la reaparición de alteraciones hepáticas tras la readministración del fármaco, un dato que no suele estar disponible dadas las graves implicaciones bioéticas de administrar una sustancia probablemente perniciosa para el paciente. Así, se están haciendo grandes esfuerzos en la identificación de nuevos biomarcadores que permitan establecer un diagnóstico claro y evaluar el pronóstico de la enfermedad, destacando los niveles séricos de miR-122, glutamato deshidrogenasa, osteopontina o la ratio citoqueratina-19 corta/citoqueratina-19 de longitud completa (131). Cabe destacar que los niveles séricos de ABs se han postulado como marcadores prometedores de DILI. En modelos animales se ha observado un incremento de ABs en suero consecuente a la administración de troglitazona, un fármaco con marcada hepatotoxicidad (132). Asimismo,

existe una correlación entre la aparición de toxicidad y el aumento de ABs en suero, principalmente CA y CDCA, en ratas ante la administración del tóxico metapirileno. De hecho, los cambios observados en los niveles de ABs presentan una mayor sensibilidad que las medidas bioquímicas habituales (133). En el caso de la especie humana, el análisis del perfil sérico de ABs muestra un incremento en la concentración de CA y CDCA en individuos intoxicados con paracetamol, en comparación con sujetos sanos y pacientes con diferentes hepatopatías (45). Además, el aumento de la concentración en suero de ácido glicodesoxicólico (GDCA) se ha postulado como marcador pronóstico en pacientes con intoxicación letal por paracetamol (134).

2.3.4.- Enfermedades congénitas

2.3.4.1.- Deficiencias en la biosíntesis de ABs

La deficiencia de CYP7A1 fue descrita en tres pacientes de la misma familia que presentaban hipercolesterolemia resistente al tratamiento con estatinas. Dos de estos pacientes, que eran varones, también tenían hipertrigliceridemia e historia clínica de litiasis biliar. Esta deficiencia congénita no suele acompañarse de un menor nivel de ABs debido a un incremento compensatorio en la actividad de la ruta alternativa, aunque en uno de los varones identificados se observó en la biopsia hepática una acumulación de colesterol en el parénquima hepático, junto a una disminución de la excreción fecal de ABs y una mayor proporción de CDCA. Los individuos con este defecto en heterocigosis también presentan altos niveles de colesterol y mayor riesgo de aterosclerosis y litiasis biliar, lo que sugiere que se trata de una condición codominante (135).

El defecto genético más frecuente que afecta a la biosíntesis de ABs es la deficiencia de HSD3B7, causada por varias mutaciones de herencia autosómica recesiva (136). En este trastorno aparece un déficit de ABs debido a la incapacidad para reducir el doble enlace de la posición Δ^5 , lo cual impide la epimerización del hidroxilo en 3β y provoca la acumulación de los ABs insaturados $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi-5-colenoico y $3\beta,7\alpha,12\alpha$ -trihidroxi-5-colenoico, los cuales suelen sulfatarse en la posición C_3 . Esta condición se caracteriza por

la aparición de colestasis neonatal, deficiencia de absorción de vitaminas liposolubles, esteatorrea y esplenomegalia, así como predisposición al desarrollo de ciertas patologías hepáticas como cirrosis (137). No obstante, en algunos casos se presenta de forma atípica (138) o incluso se mantiene asintomática (139).

El déficit en AKR1D1 presenta una sintomatología similar a la deficiencia de HSD3B7, si bien en este caso se acumulan ABs 4-colenoicos que pueden o no presentar un grupo 3-oxo, junto con la aparición de “allo”-ABs (140). Distintas mutaciones, tanto en homocigosis como heterocigosis, se han asociado con el desarrollo de esta alteración, y parece que aquellos pacientes con un mayor tiempo de protrombina presentan un peor pronóstico y menor respuesta al tratamiento con ABs (141). Es importante destacar que, como consecuencia de algunas patologías hepáticas, puede aparecer de forma secundaria una deficiencia de AKR1D1, poniendo de manifiesto la necesidad de genotipar a algunos pacientes para determinar la etiología real de la enfermedad (142).

Uno de los defectos en el metabolismo de ABs con menor prevalencia es la deficiencia en CYP7B1. La acumulación de ABs 3β -monohidroxilados y saturados en Δ^5 provoca la aparición de severas alteraciones hepáticas neonatales como colestasis, fibrosis y cirrosis con consecuencias fatales (143), si bien en algunos casos el trasplante hepático (144) o el tratamiento con CDCA (145) resultan efectivos y permiten salvar la vida de algunos pacientes. Junto con el ácido 3β -hidroxi- Δ^5 -colenoico, que constituye el 90% del total de ABs plasmáticos, se acumulan diversos oxiesteroles como el 25-hidroxicolesterol y el 26-hidroxicolesterol que ayudan a diferenciar esta alteración del déficit de AKR1D1 (146). Aunque se trata de un trastorno poco prevalente, un estudio reciente realizado en población asiática pone de manifiesto que es probable que en muchos casos pase desapercibida (147). Además, cabe destacar que otras mutaciones en este mismo gen se han encontrado en pacientes con paraplejia espástica de tipo 5A (SPG5A), con una acumulación de metabolitos en plasma similares a los descritos anteriormente.

La CTX aparece como consecuencia de un déficit en CYP27A1. Durante la infancia se manifiesta con la aparición de colestasis neonatal, diarrea, cataratas y retraso en el crecimiento, mientras que en la edad adulta empeora hasta la aparición de xantomas y síntomas neuropsiquiátricos como la ataxia y la demencia (148). Se caracteriza por el acúmulo de colesterol y colestanol en diferentes tejidos junto con un déficit de ABs. El bloqueo de la vía neutra de biosíntesis de ABs a este nivel genera una acumulación de 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colestano, que se deriva hacia la ruta de 25-hidroxilación para su transformación en CA (29). Aunque esta ruta no es capaz de compensar la carencia de ABs, sí se generan diversos alcoholes biliares que tienen gran utilidad como biomarcadores plasmáticos (149).

Finalmente, la deficiencia en la enzima BACS impide la formación de ABs conjugados con coenzima A, impidiendo así la conjugación de los ABs maduros con taurina o glicina. Las únicas pacientes descritas hasta la fecha con esta patología eran dos hermanas portadoras de una mutación en homocigosis para el gen codificante para BACS, de las que solamente una de ellas desarrolló una patología hepática, aunque ambas presentaban un 85% de ABs no conjugados tanto en suero como en plasma. Este fenotipo diferente se ha achacado a que esta paciente presentaba también una mutación deletérea en homocigosis para el gen del transportador BSEP, mientras que su hermana portaba esta mutación en heterocigosis (150).

2.3.4.2.- Deficiencias peroxisomales

Los peroxisomas son orgánulos celulares implicados en varios procesos, como son la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga, ácido piperólico y fitánico, la biosíntesis de plasmalógenos, colesterol y ABs y la regulación de estado de oxido-reducción. Así, la ausencia de peroxisomas o la alteración de alguna de las enzimas implicadas en estas vías conlleva la acumulación de diversos metabolitos en distintos tejidos, provocando alteraciones fisiopatológicas de diversa índole (151). A continuación se comentan las enfermedades peroxisomales en las que se vea afectado el metabolismo de los ABs.

Los trastornos del espectro del síndrome de Zellweger son un conjunto de trastornos peroxisomales que se caracterizan por la ausencia de peroxisomas funcionales. Esto se debe a diversas mutaciones en los genes *PEX* que impiden la formación de estos orgánulos al estar alterado el transporte de proteínas de membrana y matriz durante la formación inicial de los peroxisomas. Dentro de este grupo se encuentran el síndrome de Zellweger, la adrenoleucodistrofia neonatal y la enfermedad infantil de Refsum. Si bien tienen una clínica heterogénea tanto inter como intraindividualmente, todas mantienen en común la afectación hepática, el retraso en el desarrollo y las alteraciones neurológicas. En pacientes con estas patologías se ha observado la ausencia de ABs maduros, así como acumulación de sus precursores DHCA, THCA y de un compuesto llamado ácido dicarboxílico C₂₉ (152) que probablemente se genera por elongación del THCA-CoA (153).

Otras alteraciones peroxisomales ven alterado el transporte de sustratos hacia su matriz. Este es el caso de la deficiencia de *ABCD3*, gen codificante para el transportador del THCA-CoA y DHCA-CoA llamado PMP70. Esta patología ha sido descrita en un único paciente con hepatoesplenomegalia en el que se observó la acumulación plasmática de los intermediarios mencionados, así como del ácido dicarboxílico C₂₉ (154). Por otra parte, a pesar de que la adrenoleucodistrofia asociada al cromosoma X debida a mutaciones en el gen *ABCD1* nunca se ha asociado con alteraciones en el metabolismo de ABs, en un caso reciente se ha observado una disminución de los niveles de ABs maduros. No obstante, se debe confirmar la ausencia de mutaciones en las enzimas peroxisomales de la ruta biosintética (155).

El déficit de la enzima AMACR es una enfermedad de herencia autosómica recesiva caracterizada por la acumulación plasmática de ácido pristánico y ABs C₂₇. Cabe destacar que debido a la actividad racemasa de esta enzima únicamente se acumulan los isómeros 25R del THCA, DHCA y ácido pristánico, una característica que facilita el diagnóstico de esta patología. La clínica de esta enfermedad muestra una gran variabilidad en su sintomatología. Su forma de presentación infantil se caracteriza por la

malabsorción de vitaminas liposolubles, trastornos en la coagulación debidos al déficit de vitamina K, colestasis y hepatitis, si bien los pacientes responden de forma favorable al tratamiento con ABs (156,157). Por su parte, la presentación en adultos se caracteriza por una neuropatía degenerativa a nivel sensorial y motor, con gran variabilidad interindividual. Así, puede aparecer neuropatía periférica, deficiencias cognitivas, retinosis pigmentaria y disartria cerebelar entre otras alteraciones (158,159).

Debido a que la enzima DBP lleva a cabo dos reacciones secuenciales en el metabolismo peroxisomal de ABs, la deficiencia de esta proteína se clasifica en tres subtipos: el tipo I, caracterizado por la ausencia tanto de actividad hidratasa como deshidrogenasa; el tipo II, donde sólo está afectada la capacidad hidratasa; y el tipo III en el que únicamente existe deficiencia en la actividad deshidrogenasa. Independientemente de esta clasificación, los tres fenotipos de la enfermedad presentan una clínica grave, en la que la mayoría de los pacientes no sobreviven más allá de los dos años de edad. La clínica presenta elevada variabilidad interindividual. Las alteraciones más frecuentes son la hipotonía neonatal acompañada de convulsiones y la dismorfia craneal. Otros síntomas y signos destacables son el retraso en el crecimiento y desarrollo psicomotor, fallos del sistema visual y auditivo y hepatomegalia. En algunos casos la biopsia hepática *post mortem* mostró fibrosis, esteatosis, hemosiderosis, y colestasis con proliferación de los canalículos biliares. Los pocos pacientes con supervivencia mayor a los siete años muestran severo retraso motor, incapacidad para utilizar el lenguaje y alteraciones audiovisuales, junto con signos de desmielinización. Respecto a la bioquímica, cabe destacar la acumulación plasmática de ácidos grasos de cadena muy larga, así como THCA y DHCA. La acumulación de estos intermediarios de ABs no ocurre en todos los pacientes, si bien parece que existe una relación inversa entre los niveles plasmáticos de los mismos y la supervivencia de los pacientes (160).

Únicamente se han descrito dos casos de pacientes con deficiencia de SCPx. El primero fue un varón con historia clínica de tortícolis espasmódica, temblor

distónico de la cabeza, disfemia, y alteraciones de la fertilidad como hipergonadismo gonadotrófico y azoospermia. El empeoramiento de los síntomas neurológicos reveló lesiones cerebrales hipotalámicas, pontinas y occipitales, así como hiposmia, leve hipoacusia, movimientos oculares sacádicos, reflejos disminuidos de la extremidad superior, ataxia cerebelar leve, y alteraciones de la marcha y el equilibrio. Los marcadores bioquímicos hepáticos fueron normales y apenas se encontraron trazas de THCA y DHCA en plasma. Sin embargo, se detectaron grandes cantidades de alcoholes biliares en orina, así como elevados niveles serológicos de ácido pristánico (161). El segundo paciente descrito portaba una mutación distinta al primero y en heterocigosis. Aun así, la clínica de la enfermedad era similar, con alteraciones motrices en las manos, problemas en el equilibrio y sordera. Los exámenes médicos posteriores revelaron alteraciones en la propiocepción, disimetría leve y disdiadococinesis. Además, la serología mostró un incremento de los marcadores plasmáticos de disfunción hepática como transaminasas, gamma glutamil transpeptidasa (GGT), y creatina kinasa, así como acumulación de ácido pristánico (162). En ambos casos, los síntomas mejoraron tras comenzar una dieta restrictiva en ácido fitánico, un precursor del ácido pristánico.

Por último, la deficiencia de BAAT genera una malabsorción de vitaminas liposolubles y un incremento del tiempo de protrombina en los diez pacientes pediátricos en los que ha sido descrita. No obstante, la clínica de la patología presenta una alta variabilidad. Las distintas presentaciones de colestasis neonatal fueron desde leves hasta muy graves, siendo necesario el trasplante hepático para uno de los pacientes que desarrolló colangiopatía de los túbulos biliares que derivó en cirrosis y fallo hepático. Los datos obtenidos a través de biopsia hepática de varios pacientes mostraron hepatitis neonatal idiopática, con proliferación ductular y fibrosis. Asimismo, cuatro de los pacientes sufrieron raquitismo como consecuencia de la deficiencia de vitamina D. Bioquímicamente destaca la ausencia de ABs glicoconjugados y tauroconjugados en plasma, orina y bilis, donde el compuesto mayoritario es el CA. La similitud en el patrón de ABs con los pacientes con deficiencia de

BACS determina que la única forma de diagnosticar correctamente la enfermedad sea a través del genotipado o del inmunomarcaje de la biopsia hepática (16).

2.3.4.3.- Deficiencias en el transporte de ABs

Las alteraciones funcionales de los transportadores hepatocitarios de la membrana canalicular son enfermedades raras que se clasifican según la presencia de mutaciones en uno o ambos alelos, sus consecuencias funcionales y las manifestaciones clínicas derivadas (163). Las formas de presentación más graves de estas patologías se conocen como colestasis intrahepáticas familiares progresivas (*Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis*, PFICs) y se caracterizan por mutaciones en homocigosis con graves consecuencias en la expresión o la función de los transportadores, lo que genera una gran acumulación de ABs y/o fosfolípidos. La enfermedad de Byler o PFIC1 es provocada por mutaciones en el gen *ATP8B1*, codificante para la flipasa de aminofosfolípidos FIC1 que mantiene la distribución asimétrica de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina en la membrana canalicular, necesaria para establecer una rigidez compatible con el anclaje y funcionamiento de otros transportadores como BSEP. Si bien el mecanismo patogénico no está completamente dilucidado, parece ser que en los pacientes con esta patología existe una menor funcionalidad de BSEP y una mayor biosíntesis de ABs consecuente a una disminución de la activación ileal de FXR, lo que provoca la acumulación tóxica de ABs en el hepatocito. Suele manifestarse durante la primera década de vida con la aparición de hipercolanemia, colestasis y prurito moderados, destacando por la fibrosis lobular leve y la ausencia de elevación plasmática de GGT. La aparición de manifestaciones extrahepáticas como diarrea, pancreatitis, trastornos del crecimiento y alteraciones neurosensoriales es un hecho diferencial de otras variantes de PFIC.

La PFIC2 es provocada por mutaciones en el gen codificante para BSEP (*ABCB11*), de tal forma que su menor expresión o actividad impide la expulsión de los ABs hacia los canalículos biliares. Se manifiesta

habitualmente en los primeros años de vida como colestasis grave acompañada de ictericia persistente, marcada hipercolanemia y de un fuerte prurito que puede ser la causa de severas lesiones cutáneas autoinflingidas, pérdida de sueño e irritabilidad. Histológicamente se caracteriza por hepatitis de células gigantes, necrosis hepatocelular y fibrosis portal. La situación eleva la probabilidad de desarrollar carcinoma hepatocelular. En los casos más graves suele requerir el trasplante hepático en la primera década de vida.

La PFIC3 aparece como consecuencia de alteraciones en el transportador de fosfatidilcolina MDR3 (*ABCB4*), y suele manifestarse de forma más tardía con colestasis, hipercolanemia y prurito más moderados, litiasis biliar, un incremento claro de la GGT plasmática, proliferación de los ductulos biliares e infiltración inflamatoria.

Algunas mutaciones en homocigosis de estos mismos genes conllevan consecuencias funcionales más leves y son la causa de colestasis benignas intrahepáticas recurrentes (*Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis, BRIC*) de aparición en la primera década de vida y con consecuencias patológicas menos graves, limitadas normalmente a crisis puntuales.

Cuando estas mutaciones se encuentran en heterocigosis pueden provocar colestasis intrahepáticas del embarazo (*Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy, ICP*) cuyas manifestaciones aparecen a partir de la segunda mitad de la gestación en forma de colestasis transitoria de resolución tras el parto. También puede aparecer ICP asociada a mutaciones en otros genes como FXR. Aunque a veces el prurito materno es muy incapacitante, las alteraciones de la embarazada no comprometen su vida. Sin embargo, pueden aparecer complicaciones fetales que en los peores casos desembocan en parto prematuro, sufrimiento fetal e incluso la muerte.

La deficiencia en el transportador basolateral NTCP se caracteriza por una marcada hipercolanemia. El primer caso detectado fue un niño cuyos valores plasmáticos de ABs superaban el valor de 1.500 μM (valores normales: 1-10 μM) y que presentaba un déficit cognitivo y del desarrollo motor, pero sin alteraciones hepáticas. La secuenciación del gen *SLC10A1* reveló una

mutación en homocigosis que causa la ausencia de proteína NTCP en la membrana plasmática, impidiendo así su funcionamiento. Cabe destacar que los padres del paciente eran consanguíneos, por lo que podrían coexistir otras mutaciones desconocidas que explicaran las alteraciones motoras y cognitivas (164), ya que ninguno de los casos descritos posteriormente presentaba estas características (165,166).

Finalmente, algunas mutaciones en el gen codificante para ASBT se han asociado con la aparición de malabsorción primaria de ABs, en la que el bloqueo de la circulación enterohepática a nivel intestinal causa diarrea esteatorreica, malabsorción de vitaminas liposolubles junto con sus complicaciones derivadas, y reducción de los niveles plasmáticos de colesterol (167). Recientemente se ha descrito la deficiencia en OSTB en dos pacientes que presentaban una sintomatología similar a la de la deficiencia de ASBT, si bien en estos casos se observaron manifestaciones de colestasis a edades tempranas (168).

2.3.5.- Los ABs como agentes farmacológicos

Algunos ABs hidrófilos son utilizados en la terapéutica farmacológica actual debido tanto a su menor toxicidad, determinada por sus propiedades fisicoquímicas, como a otra serie de acciones farmacológicas propias de cada compuesto. El UDCA es un AB de propiedades coleréticas con un amplio abanico de mecanismos de acción, tales como el aumento de la cantidad de transportadores de ABs y de cloruro en la membrana canalicular de los hepatocitos (169,170), la capacidad de inhibición de las vías clásicas de apoptosis (171), la reducción de los niveles de estrés de retículo endoplásmico (172) e incluso la activación del receptor de glucocorticoides mediando así efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores (173).

El UDCA es empleado en el tratamiento de la colangitis biliar primaria (CBP) por su capacidad para mejorar los parámetros hepáticos bioquímicos e histológicos. Además, un estudio reciente ha corroborado su eficacia en pacientes con CBP en términos de incremento del tiempo de supervivencia y de ausencia de necesidad de trasplante hepático. Empleando una cohorte de

casi 4.000 pacientes, se ha comprobado que el grupo tratado con UDCA presentaba mayores ratios de supervivencia y menor riesgo de aparición de morbilidades relacionadas con el hígado, incluso en aquellos pacientes que por criterios bioquímicos se consideraron como no respondedores (174). Otros usos posibles para este fármaco son la ICP, la fibrosis quística, la enfermedad de injerto contra huésped hepática, distintos síndromes de insuficiencia de las vías biliares y NASH, si bien se requieren más estudios para determinar el potencial terapéutico del UDCA en estas patologías, ya que la FDA (*Food and Drug Administration*) todavía no ha aprobado su uso para ninguna de ellas (175).

El ácido obeticólico (OCA) o 6-etil-CDCA es un AB semisintético que ha demostrado su elevada potencia como agonista selectivo de FXR (176). Actualmente se encuentra aprobado por la FDA y la EMA (*European Medical Agency*) para el tratamiento de la CBP en combinación con UDCA. El ensayo clínico de fase III en el que se evaluó la utilidad de la combinación de OCA y UDCA frente a placebo en pacientes no respondedores a UDCA mostró su capacidad para reducir de forma estable los niveles de fosfatasa alcalina (ALP), transaminasas y bilirrubina sérica total a dosis de entre 5 y 10 mg/día en comparación con el grupo control (177). Además, en un ensayo clínico de fase II en el que se probó la capacidad de OCA en monoterapia sobre pacientes con CBP también se observó una disminución de los niveles de ALP (178). No obstante, se requiere de estudios con mayor recorrido temporal que demuestren los beneficios clínicos de esta intervención. En todos los estudios mencionados se observa que el principal efecto secundario es el prurito, que aparece de forma dosis-dependiente y provoca el abandono de la terapia de hasta el 38% de pacientes tratados con una dosis elevada (50 mg/día). Es importante destacar la aparición de alteraciones hepáticas graves con consecuencias fatales, que provocaron la muerte de 19 pacientes con CBP asociada a cirrosis hepática, tratados con OCA entre los años 2016 y 2018. Así, la FDA contraindica su uso en pacientes con CBP asociada a cirrosis hepática descompensada o con una clasificación B o C en el índice Child-Pugh (179).

Ante la ausencia de fármacos aprobados para el tratamiento de NASH, el OCA se ha postulado como posible terapia para evitar la progresión de esta patología hacia fibrosis y cirrosis. El ensayo clínico de fase III REGENERATE ha demostrado que el tratamiento con OCA a dosis de 25 mg/día consigue una mejora en los parámetros de fibrosis en comparación con placebo, junto con una caída en los niveles de transaminasas y de GGT. Si bien no se encuentran diferencias significativas entre el grupo de estudio y el control en la resolución de NASH, los pacientes tratados con 25 mg diarios de OCA mostraron una mejoría en el *ballooning* hepatocitario y la inflamación lobular como reveló su evaluación mediante biopsia hepática. El efecto adverso más frecuente en este estudio fue el prurito, que apareció en el 50% de los tratados con 25 mg/día de OCA, y obligó a la retirada del tratamiento en el 9% de los pacientes (180).

2.4.- EL RATÓN COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE ABs

2.4.1.- Metabolismo de los ABs en ratones. Principales diferencias con la especie humana

De entre todas las especies animales disponibles para llevar a cabo estudios *in vivo*, el ratón se ha alzado como el principal modelo de estudio en lo que al metabolismo de ABs se refiere. Su fácil manejo, su pequeño tamaño, y su corto periodo de gestación y esperanza de vida permiten la rápida generación de gran cantidad de individuos que pueden ser estabulados y controlados de forma sencilla y eficaz. Estas características, sumadas a la similitud entre el genoma de esta especie con el del ser humano y el desarrollo de gran cantidad de herramientas destinadas a la investigación con ratones conduce a un extendido uso de este modelo para el estudio de las enfermedades humanas (181).

No obstante, existe una serie de diferencias clave en la composición del *pool* de ABs entre ambas especies que hay que destacar (Figura I11). En los humanos, las especies mayoritarias de ABs son el CA, el CDCA y el DCA en una proporción aproximada de 40:40:20, mientras que en los ratones el *pool* se compone principalmente de CA y MCAs, con muy baja proporción de CDCA

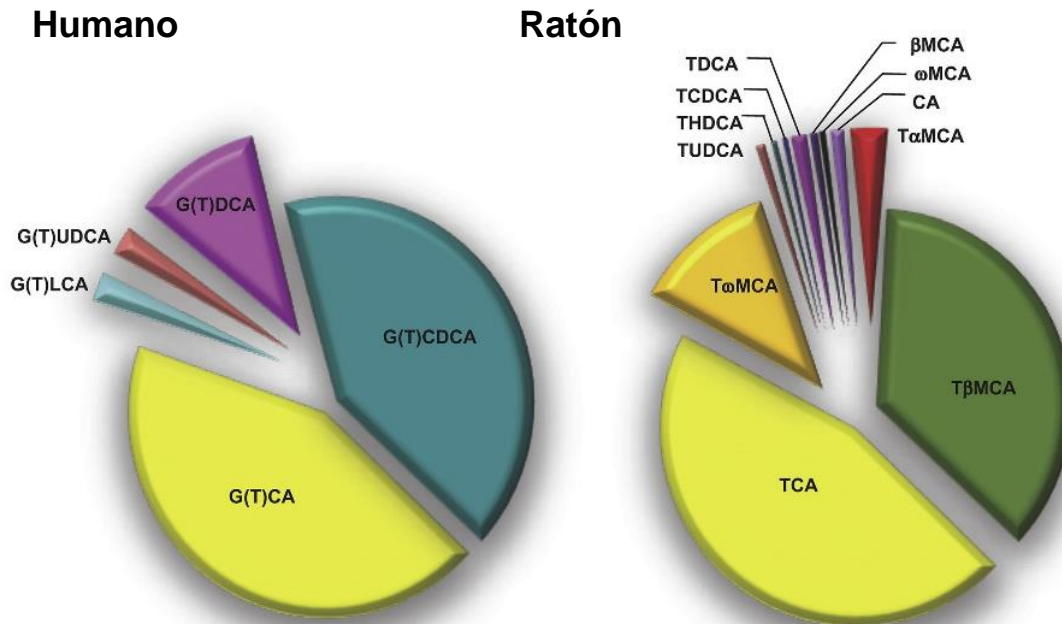


Figura 111.- Composición relativa del *pool* de ácidos biliares en humanos y ratones. Adaptado de Li y Dawson, 2019 (186).

y DCA. Estas diferencias ponen de manifiesto la existencia de peculiaridades propias de cada especie en cuanto a la biosíntesis de ABs.

Así, existe una mayor cantidad de ABs hidrofílicos en el ratón, como consecuencia de la formación de especies 6 β -hidroxiladas, tales como el α -MCA, β -MCA y ω -MCA, que llegan a constituir más de la mitad del total de ABs. Estas moléculas son mucho más solubles, tienen menor poder detergente (182), y su capacidad para interactuar con FXR es muy diferente, hasta el punto de que se consideran antagonistas de dicho receptor nuclear (56). En la especie humana esta clase de ABs sólo aparece en ciertas condiciones patológicas (183,184). También es importante destacar la capacidad murina para sintetizar UDCA como AB primario (56), al contrario que en humanos en cuyo caso se trata de un AB secundario y minoritario.

Recientemente se ha descrito la capacidad de una isoenzima CYP450 específica de ratón, Cyp2c70, para llevar a cabo la 6 β -hidroxilación de CDCA y UDCA para generar α -MCA y β -MCA, respectivamente. La enzima presenta mayor afinidad por CDCA como sustrato (185). Estos resultados sugerirían,

por lo tanto, que la producción de α -MCA es superior a la de β -MCA, lo que contrasta con la composición del *pool* de ABs en ratones *wild type* y *germ free*, donde el β -MCA y su forma tauroconjugada son las principales especies de ABs 6-hidroxilados en hígado y bilis (56). Esta cuestión queda aclarada por el trabajo de Freark de Boer *et al.* (187), en el que se demuestra la capacidad catalítica de Cyp2c70 para facilitar la formación de β -MCA por 6 β -hidroxilación y 7-epimerización del CDCA, obteniendo α -MCA o UDCA como intermediarios en función del orden en el que se lleven a cabo estas dos reacciones, aunque empleando preferentemente el α -MCA como sustrato *in vivo*. Otros autores sugieren la existencia de otra posible ruta, que podría pasar por la biotransformación de CDCA en ácido 7-oxolitocólico por acción de una 7 α -deshidrogenasa de esteroides todavía sin identificar, seguido de una reducción a UDCA mediada por la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 (11 β HSD1) (188,189), que llevaría a la consiguiente formación de β -MCA.

Una parte esencial del metabolismo de ABs en mamíferos es la conjugación de la cadena lateral mediante N-acil amidación con glicina o taurina, un enlace que es resistente a la acción de las peptidasas pancreáticas (190). Generalmente los ABs conjugados con taurina son más solubles y tienen un pKa menor que sus conjugados con glicina correspondientes, lo que permite que se mantengan ionizados durante un mayor rango de pH y restringiendo su movilidad a través de las membranas celulares a mecanismos de transporte activo o facilitado (9). Además estos ABs conjugados con taurina parecen ser menos citotóxicos que sus formas libres o glicoconjugadas (191). En la especie humana la conjugación de ABs suele llevarse a cabo en una proporción 3:1 de glicina respecto a taurina (192). Sin embargo, el ortólogo de BAAT de ratón es especialmente ineficaz en el uso de glicina, lo cual determina que la mayor parte de las especies de ABs de su *pool* sean tauroconjugadas (193).

Respecto a las diferencias en el metabolismo intestinal microbiano sufrido por los ABs, que ya fue tratado en el apartado 2.2.5, cabe destacar nuevamente la reacción de 7 α -deshidroxilación, por la que se genera ácido muridesoxicólico

(MDCA) a partir de α y β -MCA en ratones (46). Además, su microbiota intestinal permite la epimerización entre α -MCA y β -MCA a través de enzimas 7-hidroxiesteroide deshidrogenasas (194). Otros ABs secundarios murinos obtenidos a partir del β -MCA son el ω -MCA, generado por 6 β -epimerización, el ácido hiodesoxicólico (HyoDCA) formado por 6 β -epimerización y 7 β -deshidroxilación, y el ácido hiocólico (HyoCA) obtenido por 6 β y 7 β -epimerización (46).

Otro aspecto que conviene destacar es la capacidad murina para llevar a cabo la 7 α -rehidroxilación de los ABs secundarios DCA y LCA, generando CA y CDCA respectivamente. Estudios recientes han demostrado que la enzima implicada en dicha biotransformación es Cyp2a12, que carece de ortólogo en la especie humana (195). No obstante, es probable que esta reacción carezca de importancia para el LCA, ya que éste es sulfatado con elevada eficiencia (44).

Finalmente, existe una serie de diferencias en la detoxificación de los ABs entre humanos y ratones. La reacción más frecuente en la especie humana es la de sulfatación en la posición C₃, llevada a cabo por la enzima SULT2A1 y siendo de gran importancia en el metabolismo del LCA. Sin embargo, en roedores esta reacción es facilitada por Sult2a8 sobre la posición C₇, y tiene poca importancia en estos animales, cuyas vías de detoxificación principales pasan por un metabolismo de fase I mediado por Cyp2b10 y Cyp3a11 (196).

Una vez enunciadas estas disparidades, salta a la vista la problemática del uso del ratón como modelo *in vivo* para el estudio del metabolismo de ABs. La biosíntesis de especies 6-hidroxiladas, la clara predominancia de la tauroconjugación, la existencia de ABs polihidroxilados, las diferencias en el metabolismo de la microbiota intestinal y de los ABs generados, y su posible 7-rehidroxilación tienen como consecuencia la generación de un *pool* de ABs más hidrofílico y con diferentes propiedades de señalización a través de receptores de ABs, indicando que debemos ser cautos en la extrapolación de los resultados obtenidos a la especie humana.

2.4.2.- Modelos genéticos murinos para el estudio de los defectos en la biosíntesis de ABs

Las diferencias comentadas anteriormente entre la especie murina y humana no quedan patentes únicamente a nivel fisiológico, sino que los diferentes modelos desarrollados en ratón para el estudio de las alteraciones en la homeostasis de los ABs muestran también claras limitaciones.

La primera camada de ratones *knock-out* para *Cyp7a1* desarrollada presentó un fenotipo complejo, caracterizado por una elevada mortalidad postnatal con una disminución del tamaño del *pool* de ABs pero sin alteraciones en los niveles de colesterol y lipoproteínas plasmáticas (197,198), algo que difiere claramente de los pacientes con deficiencia en *CYP7A1*, los cuales presentaban hipercolesterolemia y una biosíntesis de ABs disminuida (135). No obstante, una colonia posterior de ratones con diferente *background* genético generada con embriones criopreservados de la primera colonia resultó en la obtención de individuos hipercolesterolémicos, con un *pool* de ABs reducido y menor mortalidad postnatal en comparación con la colonia original (199). Estas disparidades ponen de manifiesto la importancia del *background* genético de los ratones a la hora de desarrollar un modelo de enfermedad humana.

Por otra parte, los ratones deficientes para *Hsd3b7* presentan malabsorción de colesterol asociada a menores niveles de ABs, al igual que los pacientes afectados por esta patología. Cabe destacar sin embargo la salvedad de que en los ratones se acumulan ABs 3 β -hidroxicolanoicos en vez de 3 β -hidroxicolenoicos (200). El modelo murino *knock-out* para *AKR1D1* ha sido desarrollado recientemente, y si bien todavía no se tienen datos sobre ABs se ha visto que la ausencia de esta proteína se relaciona con la aparición de cirrosis y tumores hepáticos (201). La inactivación de *Cyp7b1* únicamente modifica al alza los niveles de 25- y 26-hidroxicolesterol en comparación con ratones control, si bien el contenido de colesterol tisular no se ve afectado, ni tampoco la composición y el tamaño del *pool* de ABs, probablemente debido a

un incremento compensatorio de la vía neutra. Tampoco aparecen en este caso síntomas de enfermedad hepática ni neurológica (202).

Uno de los casos más llamativos en lo que respecta a las diferencias fenotípicas entre la especie humana y los modelos murinos es el que se refiere a la CTX. Como se ha comentado, en esta patología existe una acumulación de alcoholes biliares junto con deficiencia de ABs primarios, a pesar de la posible activación compensatoria de CYP7A1 y de la vía de la 25-hidroxilasa microsomal, que resultaría ser insuficiente (28). Sin embargo, los ratones *knock-out* para Cyp27a1 presentan un fenotipo más leve de la enfermedad con ligeros incrementos de los niveles de oxiesteroles e intermediarios de ABs, debido probablemente a una vía de 25-hidroxilación mucho más activa y eficiente (203,204).

2.4.3.- Modelos murinos con hígados “humanizados”

Diferentes aproximaciones para el estudio de la capacidad metabólica hepática han permitido el desarrollo de modelos murinos con hígados quiméricos humanizados. Su obtención pasa por la ablación específica de los hepatocitos murinos junto con el implante de hepatocitos humanos sobre ratones con determinadas deficiencias en su sistema inmune, lo cual evita el rechazo hacia las células del donante. De esta forma, se han obtenido modelos que reproducen las características hepáticas del ser humano de forma completa, evitando así la problemática asociada a las diferencias entre especies en este contexto. Asimismo, la posibilidad de utilizar los mismos hepatocitos para los estudios *in vitro* e *in vivo* puede ayudar a reducir la variabilidad entre ambos tipos de ensayos. El uso de hepatocitos provenientes de distintos donantes permite la obtención de roedores con características hepáticas análogas a dichos donantes, facilitando la generación de modelos animales para el estudio de distintas patologías de origen genético. No obstante, su elevado coste de producción, la presencia residual de hepatocitos murinos y el compromiso del sistema inmune de los ratones, entre otras desventajas, limitan el uso de este tipo de modelos (205).

2.4.4.- Otros modelos murinos no genéticos

Las enfermedades colestásicas son una de las causas más importantes de aparición de fibrosis y cirrosis en pacientes con enfermedad hepática crónica. En el estudio de estas patologías el modelo de ligadura del conducto biliar común, que consiste en la ligación en dos puntos y posterior sección de dicha estructura, ha demostrado sobradamente su capacidad para reproducir este tipo de patologías con elevada fiabilidad. Ratones a los que se les ha aplicado este protocolo muestran una ictericia de rápida aparición, junto con hepatoesplenomegalia, hipertransaminasemia sostenida e hiperbilirrubinemia que se manifiestan ya en la primera semana tras la cirugía. Aparecen nódulos fibróticos, edema hepático, y a las seis semanas la cirrosis comienza a ser clara. Histológicamente se puede observar una fibrosis perisinusoidal de aparición temprana, seguida de fibrosis periportal a los 20 días, junto con activación de células estrelladas y miofibroblastos, e infiltración de linfocitos polimorfonucleares y macrófagos en los ductos periportales (206,207).

Los modelos basados en la adición de suplementos de ABs en la dieta de los ratones se emplean para el estudio de la toxicidad de estas moléculas, de sus propiedades terapéuticas y como herramienta para desenmascarar una posible fragilidad hepática en otros modelos. La administración de CA provoca un aumento de las transaminasas y la regulación a la baja de la expresión de enzimas de la ruta de biosíntesis como son Cyp7a1, Cyp8b1 y Cyp27a1. Asimismo, el análisis del tejido hepático revela la aparición de lesiones necróticas y dilatación de los ductos biliares intralobulares (208,209). Para el caso del LCA, acompañando a las alteraciones bioquímicas descritas para el CA, se observan infartos biliares provocados, en parte, por la aparición de cristales en el interior de los ductos biliares interlobulares pequeños. También aparecen otras lesiones como colangitis destructiva y fibrosis periportal como consecuencia de alteración de las *tight junctions* y activación de los miofibroblastos, respectivamente (210). Una dieta suplementada con UDCA mejora la inflamación portal, la proliferación ductular y la fibrosis que

aparece en ratones con colangitis provocada por la ablación de la proteína Mdr2 (211). No obstante, su efecto colerético puede resultar nocivo tal y como se ha visto en modelos murinos de ligadura del conducto biliar, agravando la necrosis hepatocitaria y los infartos de los canalículos biliares (212). El tratamiento con resinas iónicas demuestra la capacidad de estas sustancias para disminuir los niveles hepáticos de ABs, con mayor efecto sobre los MCAs en el caso de los ratones (209).

2.5.- ACOX2

2.5.1.- Estructura y función de ACOX2

El gen ACOX2, que codifica la acil-CoA oxidasa 2 está formado por 32.055 pares de bases y se encuentra localizado en la posición 3p14.3 del genoma. Presenta un total de 15 exones que genera un ARNm de 2.297 nucleótidos de los cuales 2.046 constituyen la secuencia codificante (ORF). Los exones 1 y 2 pertenecen a la región reguladora 5' UTR. La proteína ACOX2 es una enzima peroxisomal que lleva a cabo el acortamiento de la cadena lateral ramificada del THCA-CoA y DHCA-CoA, participando en la biosíntesis de ABs así como en la de otros metabolitos como el ácido pristánico y ácidos grasos de cadena muy larga y ramificados (213). Si bien el mayor nivel de expresión de esta proteína se encuentra en hígado, también aparece en otros tejidos como riñón, corazón, músculo esquelético y páncreas. Algunas variantes de ACOX2 se han relacionado con patologías como la preeclampsia (214), tumores cardiacos (215) y carcinomas mamarios (216).

La proteína ortóloga a ACOX2 en rata presenta una estructura secundaria con un dominio N-terminal, que llega hasta Ile132, formado por siete α -hélices de las cuales cinco son antiparalelas o con sentidos opuestos, se empaquetan juntas y en su conjunto forman una hendidura que acomoda la cadena lateral ramificada del sustrato; las dos α -hélices restantes se colocan sobre el dominio C-terminal para cubrir su superficie. A continuación presenta un dominio β (Tyr133-Leu269) en el que tres láminas antiparalelas se conectan con otras seis láminas para formar un pseudobarril, que participa en la formación del sitio activo y de la unión del cofactor FAD (flavín adenín dinucleótido).

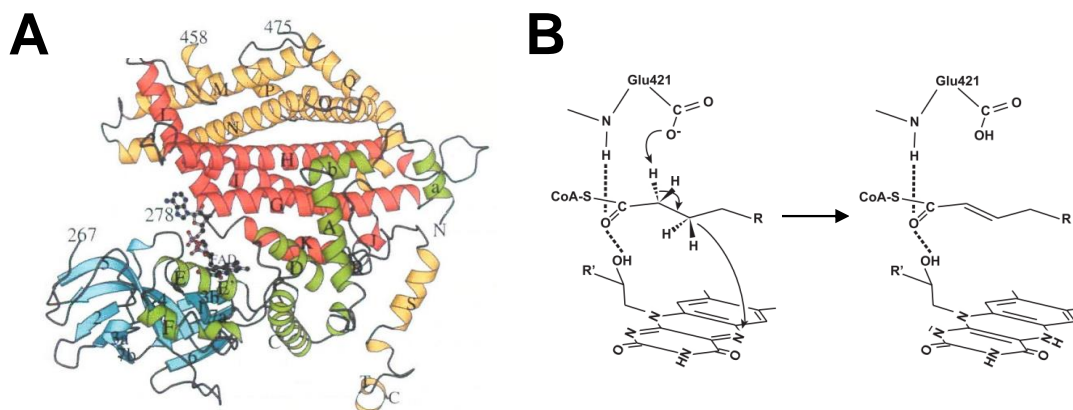


Figura I12.- Estructura tridimensional de un monómero de la proteína Acox2 de rata, en la que se distingue el dominio N-terminal (verde), el dominio en barril β (azul), y los dos conjuntos de α -hélices que conforman el dominio C-terminal (rojo y amarillo). El cofactor FAD está representado usando el modelo de bolas y barras (217) (A). Mecanismo de reacción de deshidrogenación propuesto para la enzima Acox2 de rata (218) (B).

Finalmente, el dominio C-terminal (Ser207) está formado por nueve α -hélices, de las cuales las cuatro primeras participan en la formación del sitio activo, las cuatro últimas contribuyen a la formación de un entorno de reacción adecuado, y la hélice restante funciona de bisagra entre ambas (Figura I12-A). En este último fragmento se encuentra el dominio de señalización peroxisomal SKL, que permite la internalización al peroxisoma de esta enzima a través de proteínas importadoras PEX5 (219).

La formación de dímeros de ACOX2 es esencial para su actividad, debido a la particular interacción del cofactor FAD con la enzima. Dicha unión se produce al fondo de la hendidura formada por el dominio β y el primer conjunto de hélices del dominio C-terminal. El fragmento de adenosina del FAD se une a regiones distintas de estas hélices en ambos monómeros, determinando así la necesidad de mantener esta estructura cuaternaria para la funcionalidad de ACOX2. Por otra parte, el sustrato interactúa en la hendidura conformada por las hélices de los dominios N-terminal y C-terminal (219).

El mecanismo enzimático se basa en una oxidación del sustrato conjugado con coenzima A, junto con la reducción del FAD. Inicialmente, el oxígeno del carboxilo presente en el sustrato interactúa mediante puentes de hidrógeno

con el grupo ribitol-2'-hidroxilo del FAD y el hidrógeno de la amina del esqueleto proteico del aminoácido Glu421. Una vez posicionado el sustrato, la sustracción del protón en α es llevada a cabo por Glu421 que actúa como base catalítica, a la vez que se realiza la transferencia de un hidruro desde la posición β al N₅ del FAD, formándose así el doble enlace en α del carboxilato (Figura I12-B). El cofactor se encuentra en una cavidad que permite el fácil acceso de oxígeno, favoreciendo así la regeneración del FADH₂ a FAD, junto con la formación de H₂O₂ (218).

2.5.2.- Deficiencia de ACOX2

El primer caso de deficiencia de ACOX2 fue descrito a nivel mundial por nuestro grupo de investigación (220). El estudio de este caso se detalla en el trabajo de Tesis Doctoral de la Dra. Marta Alonso Peña (221) y se publicó como un artículo completo en el año 2017 (222). El paciente era un varón de 16 años diagnosticado de hipertransaminasemia persistente no filiada, secundaria a la administración de diclofenaco e ibuprofeno tras una intervención quirúrgica. El hallazgo de la mutación c.673C>T (p.Arg225Trp) en homocigosis en el gen *ACOX2* se asoció con una menor actividad de la enzima homónima, lo cual provocaba una acumulación en suero y orina de los intermediarios THCA y DHCA. La administración de colestiramina a este paciente permitió el control de los niveles de transaminasas.

Tras la aparición de este caso, otros dos estudios han revelado la existencia de mutaciones en este mismo gen, asociadas a una clínica más severa. Vilarinho *et al.* (223) presentaron en 2016 el caso de un niño varón de ocho años de edad con historial de hipertransaminasemia y diversas alteraciones neurológicas como desarrollo tardío del habla, parálisis de la mirada vertical, disimetría leve y ataxia de la marcha. La consanguineidad de sus progenitores sugirió la realización de una secuenciación exómica del probando, la cual reveló la presencia de la mutación ACOX2 p.Tyr69* en homocigosis. El análisis de una biopsia hepática mostró la existencia de septos fibróticos, hepatocitos agrandados y transformación acinar focal. Además, los niveles de intermediarios C₂₇ de los ABs se encontraron elevados en plasma y orina. Por

otro lado, Ferdinandusse *et al.* (213) describieron en 2018 el caso de una paciente con artrogriposis, neuropatía, miopatía, hiperbilirrubinemia y alteraciones de la mecánica ventilatoria incompatibles con la vida, provocando el fallecimiento de la niña a los cinco meses de edad. Sus niveles de ABs tanto C₂₄ como C₂₇ plasmáticos y urinarios eran elevados. El análisis genético reveló la presencia de la mutación ACOX2 p.Thr145fs, que provocaba la aparición de un codón *stop* prematuro y por lo tanto, de una proteína truncada.

Estos hallazgos plantearon la cuestión de si las alteraciones en ACOX2 eran rarezas propias de casos aislados, cuál era el mecanismo patogénico del trastorno y si el tratamiento con UDCA en lugar de colestiramina podría ser beneficioso para estos pacientes. Estas incógnitas fueron la base para el desarrollo de los estudios contenidos en esta Tesis Doctoral.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1.- Muestras humanas

Se utilizaron muestras de sangre y biopsias hepáticas de las que se disponía consentimiento informado firmado por los pacientes para su uso en investigación biomédica. Los protocolos fueron aprobados por los Comités Éticos de Investigación Clínica del área de Salud de los distintos hospitales de procedencia. Los datos de los sujetos participantes en el estudio se trataron con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la Ley 14/2007 de Investigación biomédica (BOE 159/28826-48, 2007) y la Ley Orgánica 3/2018 de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales (BOE 294/119788-857, 2018).

3.1.2.- Animales

Los ratones de la cepa C57BL/6J portadores de la mutación c.673C>T en el gen *Acox2* murino, que produce la variante p.R225W de *Acox2*, así como los ratones *knock-out* para *Acox2*, fueron generados mediante manipulación genética de embriones de ratón a través de la tecnología CRISPR/Cas9. Este trabajo fue realizado en el Servicio de Transgénesis de la Universidad de Salamanca por el equipo que dirige el Dr. Manuel Sánchez Martín.

Los animales tuvieron libre acceso tanto a pienso granulado comercial como a bebida, y se mantuvieron estabulados en habitaciones a temperatura (20-25°C) y humedad relativa (40-70%) controladas, dotadas de un sistema de iluminación regulable que establecía un ciclo de luz/oscuridad (12 h/12 h) constante.

Los animales fueron manipulados siguiendo las especificaciones de la Comunidad Europea (Directiva 63/2010/UE) y la legislación española para la protección y uso de animales de experimentación (RD 53/2013, BOE 34/11370-421, 2013; y Ley 6/2013, BOE 140/44289-92, 2013). Los protocolos experimentales empleados durante la realización de esta Tesis Doctoral fueron aprobados por el Comité de Bioética para el uso de animales de laboratorio de la Universidad de Salamanca.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.3.- Líneas celulares

Se emplearon las siguientes líneas celulares de origen humano:

HepG2 (HB-8065) de hepatoblastoma; HEK-293T (CRL-11268), derivadas de las células HEK-293 embrionarias de riñón; y CHO (CCL-61) de ovario de hámster chino, proporcionadas por la American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Barcelona).

HuH-7, de carcinoma hepatocelular, obtenida del Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (Tokio, Japón) (JCRB JCRB0403).

HepaRG indiferenciadas, obtenidas de la casa comercial Gibco (Thermo Fisher, Madrid).

Las líneas celulares HuH-7 modificadas genéticamente para sobreexpresar la proteína ACOX2 silvestre o la variante p.Arg225Trp así como las líneas celulares CHO con sobreexpresión de NTCP y OATP1B3 fueron obtenidas previamente en nuestro laboratorio. La línea celular CHO con sobreexpresión de OATP1B1 fue proporcionada por los Drs. Meier, Stieger, y Hagenbuch (Universidad de Zúrich, Suiza). Además se utilizó la línea celular hepática IHH, de hepatocitos humanos inmortalizados (224), proporcionada por el Dr. Andreas Geier (Hospital Universitario de Würzburg, Alemania).

3.1.4.- Bacterias

La cepa DH5 α de *Escherichia coli* (ECO112) fue proporcionada por la casa comercial Thermo Fisher.

3.2.- PRODUCTOS

Los productos utilizados en este trabajo se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:

- Abbot Laboratorios (Madrid): pentobarbital sódico (Nembutal N.R.).
- Abcam (Cambridge, Reino Unido): anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (ab6721).

- Addgene (Teddington, Reino Unido): plásmido con la ORF de Cas9 humano optimizado para el codón derivado de *Streptococcus pyogenes* (#60599, pHL-EF1 α -SphcCas9-iP-A).
- Air Liquide (Valladolid): CO₂ y N₂.
- AppliChem-Panreac (Madrid): ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetan sulfónico (HEPES), ácido morfolino propansulfónico (MOPS), acetato sódico anhidro, agar, β -mercaptoetanol, formamida, glicina, leche descremada liofilizada y solución de Eosina al 1%.
- Applied Biosystems (Thermo Fisher): High Capacity Reverse Transcriptase kit, SYBR® Select Master Mix y AmpliTaq Gold DNA Polymerase.
- Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, EE.UU.): ácido trihidroxicolestanoico (THCA) y 7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona (C4).
- BD Biosciences (Madrid): fluido envolvente FACS Flow para citometría de flujo y colágeno tipo I de cola de rata.
- Biomers.net (Donau, Alemania): oligonucleótidos o *primers*.
- Bio-Rad (Madrid): acrilamida, membrana de nitrocelulosa, persulfato de amonio, rojo Ponceau, tampón Tris 0,5 M pH 6,8, tampón Tris 1,5 M pH 8,8, tetrametiletilendiamina (TEMED) y el marcador de pesos moleculares para electroforesis de proteínas Precision Plus Protein Dual Color Standards.
- BioTools (Madrid): ADN Taq polimerasa.
- Cayman (Hamburgo, Alemania): U0126.
- Cell Signaling Technology (Leiden, Países Bajos): anticuerpo anti-CYP3A4 (13384).
- Dako (Agilent, Barcelona): medio de montaje para fluorescencia.
- Fermentas (Thermo Fisher): T4 polinucleótido kinasa.
- Focus Biomolecules (Plymouth Meeting, EE.UU.): BI6015.
- GE Healthcare (Barcelona): algunas enzimas de restricción, illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit, illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit y reactivos de detección ECL (*Enhanced ChemioLuminescence*), que incluyen los

anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa y los reactivos de detección 1 y 2.

- Gibco (Thermo Fisher): Oncostatina M recombinante (227 aa) humana, interleucina 6 recombinante humana, interleucina-1 β recombinante humana, TNF α recombinante humano, medio de cultivo Williams' E sin L-glutamina con bicarbonato y rojo fenol, mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina y penicilina/estreptomicina/amfotericina B) y suero bovino fetal (FBS).
- Histogen (San Diego, California, EE.UU): formaldehído al 4%.
- Invitrogen (Thermo Fisher): anticuerpo anti-ACOX2 (PA5-50297), anticuerpo anti-catalasa (LF-MA0004), anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo marcados con Alexa® 594 o Alexa® 488, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), enzima Accuprime® Pfx ADN polimerasa, lipofectamina LTX y reactivo Plus, estándares de ADN (25, 100, 500 pb y 1 kb plus), proteinasa K, SYBR Green I (SYBR Safe), kit GeneArt Genomic Cleavage Detection y solución RNA later.
- Merck (Barcelona): anticuerpo anti-ACOX2 (HPA064845) y anti-ACOX3 (HPA035840), etanol (grado HPLC), isopropanol, tartrato disódico y Tris HCl.
- Menarini Diagnostics (Barcelona): portaobjetos Optiplus™, tiras reactivas de bioquímica seca.
- Novus Biologicals (Biotechnie, Madrid): anticuerpo anti-BAAT (NBP2-92503).
- Peptidech (Londres, Reino Unido): FGF19 recombinante humano.
- Promega (Madison, EE.UU.): algunas enzimas de restricción, T4 ADN ligasa y plásmido pGEM-T Easy.
- Pronadisa (Laboratorios Conda, Madrid): agarosa de uso habitual, agarosa de alta resolución MS-8, agarosa LM de bajo punto de fusión, extracto de levaduras y triptona.
- Qiagen (Izasa, Barcelona): QIAamp DNA Blood Mini Kit.
- Roche (Barcelona): fosfatasa alcalina.

- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EE.UU.): anticuerpo anti-GAPDH (sc-32233), anticuerpo anti- Na^+/K^+ -ATPasa (sc-28800), anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (sc-516102), agonista de PPAR bezafibrato, agonista de FXR GW4064 y polibreno.
- Sartorius (Goettingen, Alemania): filtros de nitrato de celulosa de 0,2 μm y 0,1 μm de tamaño de poro.
- Selleckchem (Munich, Alemania): Ruxolitinib, rottlerin, fludarabina, STAT5-IN-1 y BIX02189.
- Sigma-Aldrich (Madrid): acetato de amonio, formaldehído 37%, anticuerpo anti- α -Tubulina (T9026), polietilenimina (PEI), sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (AEDT), paracetamol, diclofenaco, albúmina bovina (fracción V, BSA), sal sódica de los ácidos cólico (CA), glicocólico (GCA), taurocólico (TCA), desoxicólico (DCA), glicodesoxicólico (GDCA), taurodesoxicólico (TDCA), quenodesoxicólico (CDCA), glicoquenodesoxicólico (GCDCA), tauroquenodesoxicólico (TCDCa) y litocólico (LCA), ácido ursodesoxicólico (UDCA), ácido fórmico, azul de bromofenol, azul de Tripán, bromuro de metiltiazolildifenil tetrazolio (MTT), ampicilina, mezcla de inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil) bencenosulfonilfluoruro 104 mM, pepstatina A 1,5 mM, E-64 1,64 mM, bestatina 4 mM, leupeptina 2 mM y aprotinina 80 μM), IGEPAL, dexametasona, hidrocortisona 21-hemisuccinato, dietilpirocarbonato (DEPC), dimetil sulfóxido (DMSO), dodecil sulfato sódico (SDS), D-glucosa, diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFDA), ioduro de propidio, puromicina, L-prolina, medios de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Minimum Essential Medium Eagle (MEM), piruvato sódico, solución de insulina humana (I9278) y bovina (I6634), tripsina de páncreas porcino, sulfato de gentamicina y Tris base.
- Takara (Laboratorios Conda, Madrid): algunas enzimas de restricción y solución de carga para electroforesis en gel.
- TargetMol (Boston, Massachusetts, EE.UU.): agonista de LXR GW3965.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Thermo Scientific (Madrid): marcador de pesos moleculares de proteínas PageRuler Plus Prestained Protein Ladder y ARN total de hígado humano sano.
- Toronto Research Chemicals (North York, Canadá): ácido nor-desoxicólico (norDCA).
- Vector (Burlingame, EE.UU.): Solución de hematoxilina (H3401).
- VWR Internacional (Barcelona): ácido acético glacial, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, bicarbonato sódico, carbonato sódico, cloruro potásico, cloruro sódico, dihidrógeno fosfato potásico, etanol (grado analítico), fosfato disódico, glicerol, hidróxido sódico, indicador universal de pH, metanol, reactivo de Folin Ciocalteu y Tween® 20.
- Whatman (GE Healthcare): papel de cromatografía Whatman de 3 mm para la transferencia en Western blot (WB).
- Waters (Milford, Massachusets, EE.UU.): cartuchos Sep-Pak Plus C18.

Los plásmidos lentivirales pWPI, psPAX2 y pMD2.G, provenientes de Addgene (Teddington) fueron cedidos por el Dr. Ángel Hernández de la Universidad de Salamanca.

Todos los reactivos utilizados fueron del grado requerido para cada caso.

3.3.- MEDIOS INSTRUMENTALES

El agua destilada y ultrapura se obtuvieron mediante un equipo de filtración MilliQ Integral 3 (Merck-Millipore, Madrid).

Para la determinación de pH se utilizó un electrodo de marca Crison micro pH 2002 (Crison Instruments, Barcelona).

Las filtraciones a vacío se realizaron con una bomba Millipore modelo XX5522050 (Merck-Millipore). Para la esterilización de sólidos y líquidos se empleó un autoclave modelo Tuttnaver 2340 M (Grupo Taper, Madrid).

Las pesadas se realizaron en balanzas electrónicas digitales Precisa 125 A y Sartorius BL 150S (Grupo Taper).

Las centrifugaciones se realizaron en centrifugas refrigeradas 5417R y 5810R marca Eppendorf (Hucoa-Erlöss, Madrid), Megafugue-1.0 R (Heraeus Spatach, Hanau, Alemania) y L8-M Ultracentrifuge, rotor 70.1 Ti (Beckman, Brea, EE.UU.). También se utilizó una picofuga Stratagene (VWR International, Radnorr, Pensilvania, EE.UU.).

Todo el material de vidrio utilizado procedía de Afora (Madrid). Cuando era utilizado en biología molecular se trataba mediante calor seco, durante un mínimo de 4 h, en una estufa termostaticada a 180°C, modelo S-20 (Selecta, Barcelona).

Para la PCR analítica y para la transcripción reversa (RT) se utilizó un termociclador Mastercycler Pro marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania). Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real se realizaron en un aparato QuantStudio™ 3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher).

La electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizó en un sistema de geles horizontales sumergidos modelo MT-1001 de la casa Ecogen (Madrid), acoplados a una fuente Bio-Rad Power Pac 3000 (Bio-Rad). Para la visualización de las secuencias y diseño de estudios de restricción de los plásmidos se usó el programa Gene Construction kit 2.5.13 para MacOS X (Textco, New Hampshire, EE.UU.).

La secuenciación de los fragmentos de ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, utilizando un secuenciador automático capilar ABI PRISM3100-Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher).

Para el manejo de las bacterias se utilizó una campana de flujo laminar Telstar AV 30/70. Para el crecimiento de bacterias se utilizó una estufa termostaticada a 37°C modelo S-20 (Selecta).

El manejo de células se realizó en una campana de flujo laminar vertical modelo Telstar AV 30/70, mientras que el manejo de vectores lentivirales se realizó en una campana de flujo laminar Telstar Bio-IIA (Telstar Industrial, Barcelona). Las células se mantenían a 37°C en atmósfera del 5% de CO₂ con

humedad relativa del 80%, en un incubador modelo Hepa Class 100 (Thermo Fisher). Para contar las células se utilizaron cámaras Neubauer que se observaban a través de un microscopio Leitz Fluovert FS (Leica Microsystems, Barcelona).

Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño termostatzado LAUDA Ecoline Staredition RE 106 (Hucoa-Erlöss) y en un bloque térmico QBA2 Grant (Thermo Fisher).

Para el cultivo de las líneas celulares se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos (Prosisa, Salamanca), 24 y 6 pocillos, placas circulares de 10 cm de diámetro, así como frascos de cultivo de 25 y 75 cm² de Corning (Thermo-Fisher). La esterilización de las soluciones se hizo mediante filtros Sterivex de 0,1 µm (Merck-Millipore).

Para visualizar las células se utilizó un microscopio de contraste de fases, que además tenía acoplado una lámpara para fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000-S (Nikon, DueroLab, Salamanca).

Para las medidas por citometría de flujo se utilizó un citómetro modelo FACScalibur™ de la casa BD Biosciences. Este equipo permite la detección simultánea de cuatro fluorocromos gracias un sistema de doble láser (488 nm y 635 nm) y consta de 4 canales de emisión de fluorescencia: FL1 530/30 nm, FL2 585/42 nm, FL3 670/LP y FL4 661/16 nm. El citómetro se manejó desde un ordenador Macintosh (FACStation OSX5.2) utilizando el software CELL Quest V 3.1.

Las homogeneizaciones se realizaron en un equipo Bullet Blender Storm de Next Advance (Nueva York, EE.UU.) o un sonicador tipo baño Ultrasonic Cleaner 400 W, 30 kHz (Fungilab S.A., Barcelona).

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en un sistema de electroforesis modelo Mini-Protean II Cell con fuente de alimentación modelo PowerPac 300. La transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa se realizó en un sistema Trans-Blot Cell II, utilizando para ello la misma fuente de alimentación. Todo procedente de la casa comercial Bio-Rad.

Para la visualización de la fluorescencia de los geles de ácidos nucleicos y para la toma de medidas de quimioluminiscencia se utilizó un equipo de análisis de imagen LAS-4000 (FujiFilm, TDI, Madrid). Las imágenes se analizaron con el programa informático MultiGauge v3.0.

Para observar el resultado de las inmunofluorescencias se utilizó un microscopio confocal modelo TCS SP5 (Leica, Barcelona) perteneciente al Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca).

Las muestras de ARN y proteínas se conservaron en un congelador -80°C marca Revco (Thermo Scientific). Los viales de almacenamiento de las distintas líneas celulares se conservaban en un contenedor de N_2 líquido (Thermo Fisher).

También se utilizó un sistema cromatográfico acoplado a un detector de masas, HPLC-MS-MS, de la casa Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU.). Este sistema se compone de un equipo de HPLC serie 1200 formado por: una bomba cuaternaria con degasificador de vacío (modelo G12354A), un inyector de 20 μl de capacidad (modelo G1328B), un detector ultravioleta/visible (modelo G1314B) de longitud de onda variable y programable y una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 mm x 4,6 mm, 5 μm de tamaño de poro, termostaticada a 35°C (Agilent Technologies). El Detector de Masas Triple Cuadrupolo (modelo G6420A) está acoplado a una fuente de ionización a presión atmosférica (API) serie 6000 (modelo G1948B). Todo el sistema se controló desde un ordenador modelo HP Slim 290-p0052ns, utilizando el paquete de software Mass Hunter Workstation LC/MS (Data Acquisition versión B.09.00, Qualitative Analysis versión 10.0, Quantitative Analysis, versión 10.0) (Agilent Technologies) que permite tanto el control del HPLC como del detector de masas.

Para las medidas espectrofotométricas se emplearon los espectrofotómetros Hitachi U-2000 (Grupo Taper), Nanodrop 1000 (Thermo Fisher); y un lector de ELISA modelo Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las determinaciones bioquímicas en muestras de suero se realizaron en un detector automático de química seca Spotchem EZ SP-4430 (Arkray Factory, A. Menarini Diagnostics, Badalona).

Para la realización de estudios histológicos, los tejidos se cortaron con un criostato Leica 1900UV (Leica Biosystems, Barcelona).

Además, se contó con pequeño equipamiento como agitadores magnéticos calefactores Selecta (DueroLab), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, EE.UU.) y micropipetas Wilson (Prosisa).

3.4.- MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.4.1.- PCR analítica de alta fidelidad

La PCR de alta fidelidad se llevó a cabo utilizando el kit AccuPrime Pfx SuperMix (Thermo Fisher), que contiene la enzima ADN polimerasa *Pfx* de alta fidelidad, $MgCl_2$, desoxirribonucleótidos trifosfato, solución tampón y estabilizadores. Se usó una concentración de 200 nM para los *primers*, junto con 5 ng de ADN molde y 45 μ l de la mezcla de reactivos. Una vez preparada la mezcla de reacción, los tubos se incubaron en un termociclador con las siguientes condiciones:

- Un ciclo de activación inicial de 95°C durante 5 min.
- 40 ciclos de amplificación con las siguientes condiciones:
 - Desnaturalización: 95°C, 15 s.
 - Anillamiento: 30 s, usando un gradiente de temperatura (58°C, 60°C, 62°C) para fijar las condiciones de mayor eficacia de la amplificación.
 - Extensión: 68°C durante un tiempo variable (1 min/kb del amplicón).
- Un ciclo final de extensión a 68°C durante 10 min.

3.4.2.- Electroforesis en geles de agarosa no desnaturizante

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR se visualizaron tras electroforesis en gel de agarosa no desnaturizante. El gel se preparó mezclando tampón TAE (Tris base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, AEDT 1 mM, pH 8,0) con agarosa en polvo en un porcentaje variable (0,8%-2,5%), calentando hasta

ebullición para disolver la agarosa y añadiendo SYBR Safe al 0,01% para teñir el ADN. Una vez polimerizado, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis con tampón TAE. Se añadió una solución de carga en relación 1:10 (v/v) a las muestras antes de depositarlas en los pocillos del gel. Se usaron estándares de ADN de 100, 500 pb o 1 kb como patrón de tamaños moleculares. Una vez cargado el gel, se realizó la electroforesis a 120 V durante 1 h aproximadamente. El resultado se visualizó en un equipo de imagen LAS-4000.

3.4.3.- Purificación de ADN contenido en geles de agarosa y reacciones enzimáticas

Para la purificación de ADN procedente de reacciones enzimáticas o de un fragmento de gel de agarosa de bajo punto de fusión se empleó el kit ilustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification, que utiliza columnas con membrana de gel de sílice para la retención del material genético. La elución del ADN se realizó usando agua ultrapura o tampón TE (Tris 10 mM, AEDT 1 mM, pH 8,0), en función de la aplicación en la que se usaba posteriormente.

La purificación desde un gel de agarosa necesitó de un paso previo en el que se recortó el fragmento de interés y se disolvió la agarosa mediante calentamiento a 60°C durante 15 min.

3.4.4.- Transformación de bacterias por choque térmico

Se mezclaron 50 µl de una suspensión de bacterias DH5α con 5-10 ng del plásmido de interés, y se incubaron durante 30 min en hielo. Posteriormente se llevó a cabo un shock térmico a 42°C durante 45 s seguido de un enfriamiento rápido durante 2 min en hielo, con el fin de facilitar la entrada y retención del plásmido en el interior de las bacterias. A continuación se añadieron 250 µl de medio SOC (20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levaduras, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa; pH 7,0) y se incubó en agitación a 37°C durante 1 h. Finalmente, se sembraron 100 µl de la suspensión bacteriana en condiciones de esterilidad con un asa de vidrio sobre una placa con 15 g/l de agar y medio Luria-Bertani (LB; 10 g/l

MATERIALES Y MÉTODOS

triptona, 5 g/l extracto de levaduras y 10 g/l NaCl; pH 7,0) suplementado con ampicilina a 100 µg/ml como antibiótico de selección. Tras la siembra, las placas se incubaron a 37°C durante 16 h en una estufa.

3.4.5.- Selección de colonias bacterianas y crecimiento en medio líquido

Una vez comprobado el crecimiento bacteriano en las placas, se seleccionaron entre 4 y 8 colonias aisladas, bien definidas y sin colonias satélite. Se rasparon con una punta de pipeta estéril, las cuales se inocularon en 6 ml de medio LB suplementado con ampicilina a 100 µg/ml, y se incubaron a 37°C durante 16 h en agitación.

3.4.6.- Purificación de ADN plasmídico de cultivos bacterianos

La extracción y purificación del plásmido amplificado por las bacterias se realizó empleando el kit ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit, que utiliza columnas de gel de sílice que adsorben el ADN. La identidad de los plásmidos purificados se comprobó mediante un estudio de restricción (apartado 3.4.7) seguido de secuenciación (apartado 3.4.9).

3.4.7.- Digestión con enzimas de restricción

Las reacciones de restricción se llevaron a cabo preparando mezclas de reacción con el ADN de interés, la enzima de restricción (5 U/µg de ADN), el tampón adecuado, y agua ultrapura hasta un volumen final de 20-50 µl. Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante 15 min. En algunos casos, la enzima de restricción se inactivó mediante incubación a 65-80°C durante 5-20 min. Posteriormente se llevó a cabo la separación de los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa (apartado 3.4.2); o se realizó una purificación de la mezcla de reacción (apartado 3.4.6).

3.4.8.- Extracción de ADN genómico

La purificación de ADN genómico (ADNg) a partir de muestras de paquete celular sanguíneo de los pacientes de estudio, así como de lisados celulares se consiguió utilizando el kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit. El ADN

se eluyó en agua libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C hasta su uso para amplificar por PCR de alta fidelidad (apartado 3.4.1) y secuenciar (apartado 3.4.9) las regiones de interés.

3.4.9.- Secuenciación de ADN

La secuenciación de material genético se realizó empleando la técnica de terminación de la cadena tipo Sanger en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca. Cada mezcla de reacción incluía 75-500 ng de ADN y 3,3 pmol de un *primer* específico (Tablas MM1 y MM2). Los resultados se visualizaron en el software FinchTV 1.4 (Geospiza, PerkinElmer, Seattle, EE.UU.), mientras que el análisis de secuencias de ADN se realizó con el programa Gene Construction Kit (Textco BioSoftware, Raleigh, EE.UU).

Tabla MM1.- Localización, tamaño y secuencia de los *primers forward* (F) y *reverse* (R) utilizados para el análisis por secuenciación del gen *ACOX2*.

Exón	Amplicón	Secuencia (5' – 3')	Tipo
1	208	GCTTCTGTGTTCCAGCCCCTATGT	F
		GCTGCGGACAGGGTCATCAT	R
2	431	GAGGTGGAGTGGCATTGAGGACTTA	F
		GGAAGCAGAACTGCTAATGAAGGACTCT	R
3-5	1215	GAGAAGATTTCAAGGTGCCAGAAACCTCA	F
		AGTGCTACTCTGCCCTCCAACA	R
6-8	1475	CCAGGAGGCTGGGTTGGTT	F
		GTGGGACCAAGAGGCAGCA	R
9	368	GGCCTCATGTCAGTTCAAGTTTTGCAAT	F
		GCTCCCAGTGAGTGGAAACAATCTTA	R
10	328	GTGCACAGGGTTGGTCCCTA	F
		CTCCACCCAACAGAAGCTTGGT	R
11	324	CTCACAGAGTCTCTGCCCTCTCA	F
		CTGAATCCACGAATGTCCACCCAA	R
12	228	GGAAGCCATCAGTTGTCTTTTCCACT	F
		GTAGCCTGCCTGGGAAGCAA	R
13	262	GCTTCCAGGGTGACTTCTGGAGTA	F
		TGGAGTTGGAAGTGACCTGTGAACAA	R
14	295	TCATGCAACCTCTAATTAGGTATTGTTATTCACCA	F
		GGTGTATTCACTGCCTGTTCTCTGCT	R
15	337	CCTGGCAGAAATGTAAGTGTGTTAATAATGCGT	F
		CTGCCATTGACCAGCTTCAACAA	R

3.5.- TÉCNICAS DE CLONACIÓN Y MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

3.5.1.- Modificación de plásmidos por mutagénesis dirigida

Esta estrategia se empleó con el fin de introducir una mutación de uno o más pares de bases en una secuencia de ADN contenida en un plásmido (225). Para obtener las variantes de interés del gen *ACOX2* se diseñaron cuatro *primers* que permitían la amplificación del plásmido por PCR en dos fragmentos (Figura MM1). Para la amplificación del fragmento AMP1 se utilizaba un *primer* que contenía la mutación deseada, junto con otro que introducía la secuencia de corte para la enzima *ClaI* en la región codificante para el gen de resistencia a la ampicilina (Tabla MM2). Esta secuencia para *ClaI* se introducía de igual manera en la amplificación del fragmento AMP2, de tal forma que la restricción de ambos amplicones y su posterior ligación permitía la reconstrucción del plásmido. La correcta introducción de la mutación se comprobó mediante secuenciación (apartado 3.4.9).

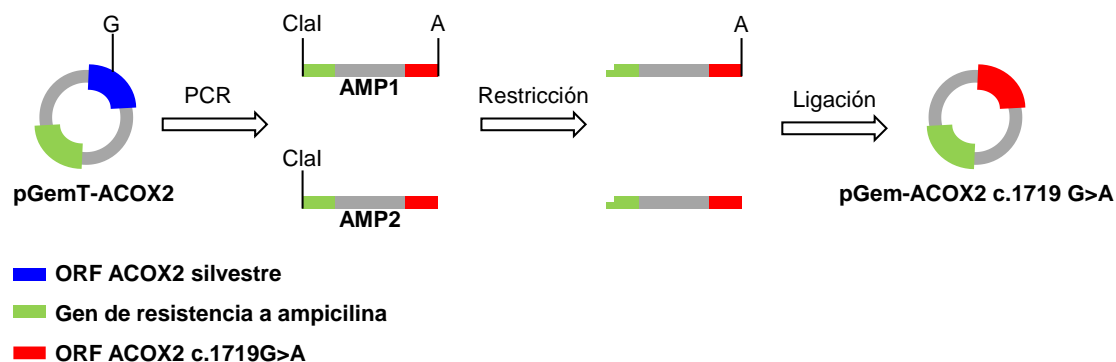


Figura MM1.- Esquema simplificado de la técnica de modificación de plásmidos por mutagénesis dirigida, ejemplificado para el caso de la V15 (c.1719G>A).

3.5.2.- Subclonación en plásmidos lentivirales

Los insertos de interés se amplificaron por PCR analítica (apartado 3.4.1) y purificaron tras electroforesis en gel de agarosa (apartados 3.4.2 y 3.4.3). La subclonación se llevó a cabo en el plásmido pWPI-V5, obtenido previamente en nuestro laboratorio, el cual se linealizó y desfosforiló con una fosfatasa alcalina para impedir la circularización del mismo. El proceso de ligación final se realizó empleando una enzima T4 ligasa.

Tabla MM2.- Secuencias de *primers forward* (F) y *reverse* (R) utilizados en procesos de clonación

Secuencia (5' – 3')	Tipo	Aplicación
ATATGCATGCATCGATGGGAACCGGAGCTGAATGAAG	F	Mutagénesis dirigida (Clal)
ATATGCATGCATCGATCAAGGCGAGTTACATGATCCC	R	
CACCTCTGTGACCTCCATGCCATAC	F	Mutagénesis dirigida V15
CTTGAGCACCTGCTGAATCGCT	R	
CCAAGGTTACGCGTGCCACCATGGGCAGCCCAGTGCA	F	Mutagénesis dirigida V16
CCAAGGTTACTAGTTAGCTTGGATCTCCAACTTTGTA AAAAGTGGT	R	
GCCATGCGCTACTCGGTCAT	F	Secuenciación pGem-ACOX2
ATAACTGATGGCCAGCTGAGGAAAGA	R	
CCCTAGGAATGCTCGTCAAGAAGACA	F	Secuenciación pWPI-V5
GGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGA	F	
TGCTATTATGTCTACTATTCTTTCCCTGCACT	R	
TGCTATTATGTCTACTATTCTTTCCCTGCACT	R	
GTAAAACGACGGCCAG	F	Primer M13 (Universal)
CAGGAAACAGCTATGAC	R	Primer M13 (Universal)
CCAAGGTTACGCGTGCCACCATGGGCAGCCCAGTGCA	F	Amplificación ORF ACOX2
CCAAGGTTACTAGTTAGCTTGGATCTCCAACTTTGTA AAAAGTGGT	R	
CAGCGGTGAGCCGTTCCACGTCAA	-	ARNcr
AAACTTGACGTGGAACGCTCACC	-	

3.5.3.- Clonación de guías para realizar la técnica de CRISPR-Cas9

Con el fin de abolir selectivamente la expresión de ACOX2 mediante la técnica de CRISPR-Cas9, se diseñó, utilizando el software CRISPR-Cas9 RNA designer checker (Integrated DNA Technologies), un ARN CRISPR (ARNcr) dirigido a una secuencia perteneciente al exón 2 de ACOX2 (5'-GGTGAGCCGTTCCACGTCAA-3'). Los oligonucleótidos (Tabla MM2) se hibridaron y se clonaron en un plásmido que contenía un casete formado por el promotor U6, el ARN transactivado (ARNtracr) y un terminador de ARN polimerasa III. La reacción de ligación se llevó a cabo empleando la enzima T4 ligasa.

3.6.- OBTENCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES

3.6.1.- Producción de partículas lentivirales

Se sembraron 1×10^7 células HEK-293T en placas de 10 cm de diámetro pretratadas con colágeno, y tras su adhesión al soporte se transfectaron con una mezcla de polietilenimina (PEI) (1 mg/ml PEI en 25 mM HEPES y 150 mM NaCl; pH 7,5) disuelta en solución salina y los siguientes plásmidos (Figura MM2):

- pWPI-hACOX2: contiene la ORF para las variantes de estudio de *ACOX2*, seguidas de una etiqueta V5 y de la secuencia para el gen reportero EGFP, ambas separadas por una secuencia IRES y controladas por el promotor constitutivo EF1 α . La presencia de V5 permite la inmunodetección de la proteína de estudio con anticuerpos anti-V5, mientras que la fluorescencia proporcionada por EGFP permite el seguimiento de las células transducidas tanto por microscopía de fluorescencia como por citometría de flujo. Con el fin de obtener lentivirus control, se generó una producción de lentivirus “vacíos” usando el plásmido pWPI-V5, que contenía únicamente la secuencia para EGFP controlada por el promotor EF1 α .
- psPAX2: codifica para las proteínas estructurales y de replicación del virus.
- pMD2.G: codifica la glicoproteína G de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular.

La mezcla de plásmidos y PEI se incubó a temperatura ambiente durante 20 min y se añadió cuidadosamente sobre la placa de cultivo. Pasadas 24 h se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco. El medio de cultivo con partículas lentivirales en suspensión se recogió a las 48, 56 y 72 h tras la transfección. Posteriormente todo el volumen de cultivo se filtró con filtros de 0,45 μ m para retirar los restos celulares y se ultracentrifugó a 20.000 rpm y 16°C durante 130 min. Tras este proceso se retiró el medio de cultivo por decantación y se resuspendió el precipitado de partículas lentivirales en 200 μ l de medio DMEM base. Tras incubarla a 4°C durante 4 h, la suspensión de partículas se alicuotó y se congeló a -80°C para su almacenamiento.

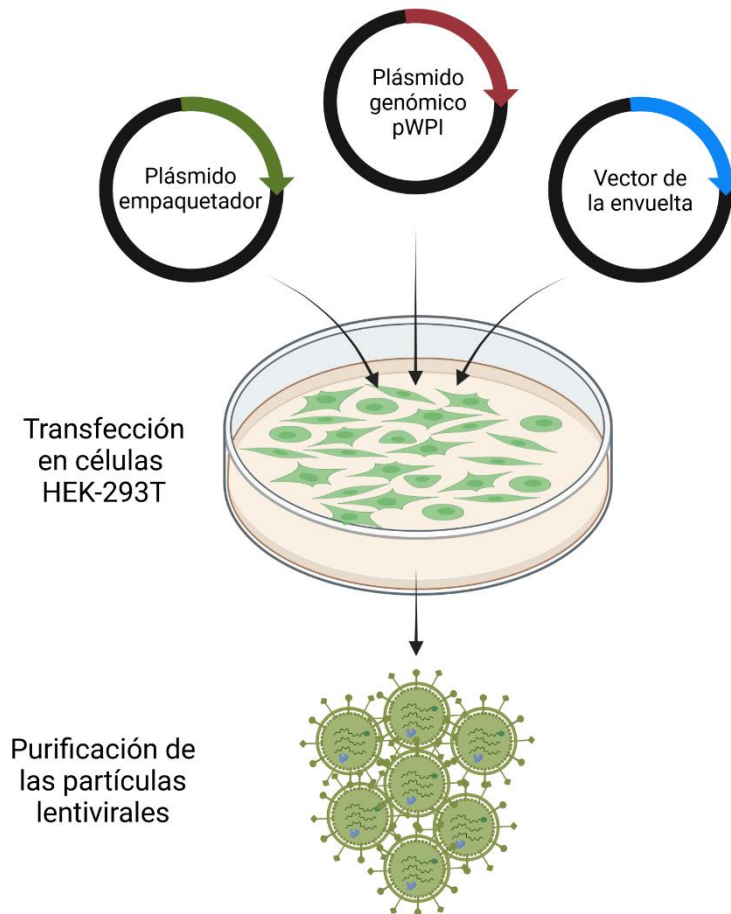


Figura MM2.- Esquema del proceso de producción de lentivirus.

3.6.2.- Determinación del título viral por citometría de flujo

La concentración de virus se determinó mediante transducción de células HEK-293T con diluciones seriadas de la suspensión lentiviral y analizando, mediante citometría de flujo, el porcentaje de células EGFP positivas a los cuatro días de realizar la transducción.

En una placa de 96 pocillos se sembraron 20.000 células/pocillo. Pasadas 24 h se añadieron a la placa diluciones crecientes de la solución viral, en medio de cultivo con hexadimetrina (polibreno) a 8 $\mu\text{g/ml}$. A continuación la placa se centrifugó a 1.800 $\times g$ durante 90 min a 32°C, con el fin de facilitar el proceso de infección. Tras 16 h de incubación, se realizó un cambio del medio de cultivo. Pasados 4 días de la transducción se determinó el porcentaje de células fluorescentes con expresión de EGFP mediante citometría de flujo. El

MATERIALES Y MÉTODOS

valor de la concentración de partículas virales, en unidades transformantes por ml (TU/ml), se obtuvo de aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{Título (TU/ml)} = \frac{ED50 \times 2 \times N}{V}$$

Donde:

- TU: Unidades transformantes (partículas virales infectivas).
- ED50: dilución de la suspensión viral que consiguió el 50% de la transducción.
- N: número de células.
- V: volumen de medio de cultivo (ml).

3.6.3.- Transducción de células diana

Se sembraron 50.000 células HepG2 por pocillo en placas de 24 pocillos, y pasadas 24 h se sustituyó el medio de cultivo por una mezcla de medio con polibreno y partículas lentivirales empleando una MOI (multiplicidad de infección) de 25. La transducción se facilitó mediante *spin*-inoculación centrifugando las células a 1.800 *xg* y 32°C durante 90 min. Posteriormente las células se incubaron en la estufa a 37°C durante 16 h. A continuación se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco. El porcentaje de células EGFP+ se determinó por citometría de flujo a partir del cuarto día tras la transducción.

3.7.- EXPERIMENTOS CON CULTIVOS CELULARES

3.7.1.- Medios de cultivo

Para el cultivo de las líneas celulares se emplearon los siguientes medios estériles:

- MEM suplementado con 1 mM de piruvato sódico, 26,2 mM de bicarbonato sódico, penicilina 100 U/ml, estreptomina 0,1 mg/ml y amfotericina B 0,25 µg/ml para la línea celular HepG2.
- DMEM suplementado con 2 mM de L-glutamina, penicilina 100 U/ml y estreptomina 0,1 mg/ml para las líneas celulares HuH-7, CHO y HEK-

293T. Además, para la línea HuH-7 se añadió gentamicina 50 µg/ml; y para la línea CHO el medio se suplementó con L-prolina 50 mg/l.

- Williams' E suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomina 0,1 mg/ml y 2 mM de L-glutamina para las líneas celulares IHH y HepaRG. Para las células IHH se añadió 50 nM de dexametasona y 20 mU/ml de insulina humana; mientras que para las HepaRG se suplementó con 50 µM de hidrocortisona, 5 µg/ml de insulina, y a partir de la segunda semana en cultivo se añadió un 2% (v/v) de DMSO para inducir la diferenciación.

Todos los medios se completaron con 10% de FBS inactivado a 56°C durante 30 min, excepto el medio para la línea celular IHH, en la que se utilizó un 10% de FBS no inactivado.

Los criotubos que contenían las células se descongelaron suavemente en un baño húmedo termostatzado a 37°C. A continuación, se añadieron sobre el medio de cultivo correspondiente y se centrifugaron a 300 *xg* durante 5 min. El precipitado celular se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en frascos de cultivo celular, los cuales se mantuvieron en una estufa termostatzada a 37°C, con atmósfera de CO₂ del 5% y humedad relativa del 80%. Las células HEK-293T e IHH fueron cultivadas sobre frascos tratados con colágeno de tipo I.

Tras una etapa de adhesión al soporte, los cultivos celulares se mantuvieron en incubación para permitir su crecimiento. Una vez alcanzada la confluencia, las células se retiraron de su soporte utilizando una solución de tripsina 0,25% y 20 mM de AEDT en PBS. La suspensión celular se diluyó en el medio de cultivo correspondiente y se centrifugó a 300 *xg* durante 5 min, y el precipitado celular se resuspendió en medio de cultivo y se contaron las células empleando una cámara de recuento Neubauer. Con el fin de determinar el número de células vivas, una alícuota de la suspensión celular se mezclaba con azul de Tripán (0,4% en PBS) en proporción 1:1. Finalmente las células se sembraron a la confluencia deseada en los soportes necesarios para llevar a cabo los experimentos, o bien se congelaron en una solución de

MATERIALES Y MÉTODOS

FBS con DMSO al 10% para su posterior almacenamiento en nitrógeno líquido.

3.7.2.- Obtención de una línea celular deficiente en ACOX2

A fin de obtener un modelo in vitro con deficiencia peroxisomal en la biosíntesis de ABs de forma selectiva sobre ACOX2, se utilizó la línea celular de hepatoblastoma HepG2, que presenta una elevada biosíntesis basal de ABs C₂₄ (221). Estas células se co-transfectaron con el plásmido descrito en el apartado 3.5.3, junto con otro que contenía la ORF de Cas9 humana optimizado para el codón derivado de *Streptococcus pyogenes* utilizando Lipofectamina LTX. Se utilizó 1 µg/ml de puromicina como agente de selección (Figura MM3). La eficacia de la escisión del ADNg mediada por CRISPR-Cas9 se comprobó utilizando el kit comercial GeneArt Genomic Cleavage Detection.

Para obtener una población monoclonal con ausencia total de proteína ACOX2, se sembraron 2.500 células en una placa de 10 cm de diámetro. Cuando las colonias de células, supuestamente provenientes de una única célula y por lo tanto con características homogéneas, podían observarse a simple vista, se rasparon con una punta de pipeta estéril y se sembraron en placas de 96 pocillos para permitir su crecimiento independiente. Las distintas poblaciones se crecieron y se caracterizaron mediante extracción de ADNg y secuenciación de la región diana de las guías diseñadas para CRISPR-Cas9, localizadas en el exón 2 del gen ACOX2 (apartados 3.4.8 y 3.4.9).

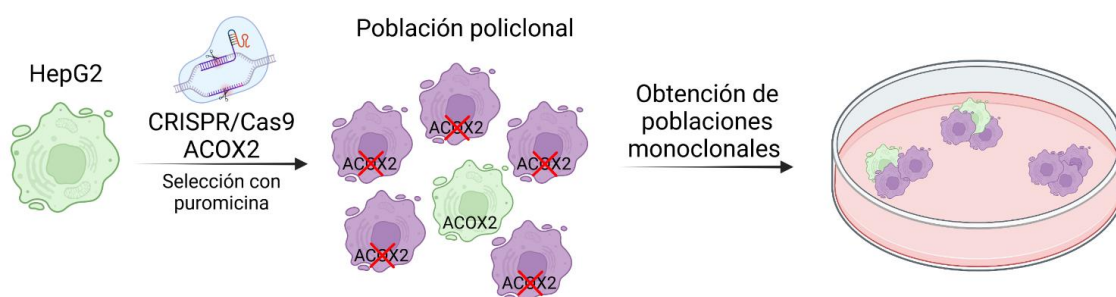


Figura MM3.- Representación esquemática de la obtención de poblaciones monoclonales de células HepG2 deficientes en ACOX2

3.7.3.- Estudios de modulación de la expresión génica

Con el fin de estudiar el papel de distintos compuestos en la regulación de la expresión de varios genes relacionados con el metabolismo de ABs, las células HepG2 o IHH se sembraron en placas de 24 o 6 pocillos a una densidad de 140.000 o 650.000 células/pocillo, respectivamente, y se incubaron durante 16 h en la estufa a 37°C. Para el caso de las HepaRG, se sembraron 350.000 o 980.000 células/pocillo en placas 12 o 6 pocillos, respectivamente, y se mantuvieron en cultivo durante cuatro semanas para conseguir su diferenciación (226). Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se añadió medio de cultivo fresco que contenía las proteínas recombinantes o los compuestos correspondientes y se incubaron durante el tiempo estipulado en la estufa a 37°C. Finalmente, las células se procesaron para la extracción de ARN (apartado 3.9.1) y cuantificación de la expresión génica por RT-qPCR (apartado 3.9.4) o extracción de proteínas e inmunodetección mediante Western Blot (apartado 3.10).

3.7.4.- Determinación de la activación de la apoptosis

Para estudiar el papel del THCA sobre la apoptosis celular y el posible efecto protector del UDCA, se sembraron células HuH-7 a una densidad de 50.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos, y se mantuvieron en incubación durante 24 h a 37°C. A continuación se retiró el medio de cultivo y se añadió medio fresco que contenía los diferentes ABs a una concentración de 250 µM, y se incubaron durante 24 h a 37°C. Finalmente se procesaron para extracción de ARN (apartado 3.9.1). La activación de la apoptosis se valoró mediante la determinación de los niveles de ARNm de *BAX α* y *BCL-2* mediante RT-qPCR (apartado 3.9.4).

3.7.5.- Experimentos de metabolismo de ABs

Con el fin de estudiar la capacidad de biotransformación de los ABs intermediarios C₂₇ o de ABs maduros C₂₄, las células HepG2 y HepaRG se sembraron a una densidad de 650.000 células/pocillo y 980.000 células/pocillo, respectivamente, en 3 ml de medio de cultivo y placas de 6 pocillos. Las células

HepG2 se incubaron durante 16 h en estufa a 37°C, mientras que las células HepaRG se mantuvieron en cultivo durante cuatro semanas para conseguir su diferenciación (226). Finalizado ese tiempo se cambió el medio de cultivo por uno fresco que contuviese el AB sustrato (THCA 10 µM o CA 5 µM) y se incubaron durante 48 o 72 h a 37°C. En aquellos experimentos realizados con compuestos moduladores de expresión génica, éstos fueron añadidos 6 h antes de la adición del AB. Finalizado el tiempo de incubación, el medio de cultivo se recogió determinando su volumen exacto por pesada, cada pocillo se lavó con PBS y se preparó un lisado celular mediante incubación con agua ultrapura durante 4 h a 4°C. Posteriormente se raspó la superficie del pocillo, se recogió el lisado determinando su volumen por pesada y se sonicó en un baño de ultrasonidos durante 1 min a 4°C empleando una potencia de 400 W. Finalmente, se reservaron 50 µl del lisado para valoración del contenido total de proteínas (apartado 3.14.2) y el resto se mezcló con el medio de cultivo para la posterior extracción de ABs y determinación de su concentración mediante HPLC-MS/MS (apartado 3.13.2).

3.7.6.- Estudios de captación de ABs

Con el fin de determinar el mecanismo de transporte del THCA a través de la membrana celular, se sembraron células HuH-7 y células CHO silvestres o con expresión estable de NTCP, OATP1B1 y OATP1B3 a una densidad de 6.000 células/cm² en placas de 12 pocillos, y los experimentos se llevaron a cabo cuatro días tras la siembra. Las células CHO-OATP1B1 y sus respectivos controles fueron tratadas con butirato sódico 5 mM durante las 24 h previas al experimento. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo y las células se preincubaron con medio de captación (96 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 1,1 mM KH₂PO₄, 0,8 mM MgSO₄, 1,8 mM CaCl₂, 11 mM glucosa, y 50 mM HEPES, pH 7,4) a 37°C durante 30 min, y a continuación se incubaron durante 60 min y a 37°C con medio de captación fresco que contenía THCA, GCA o CA 50 µM como sustratos, con o sin TCA 250 µM como inhibidor de los transportadores de ABs. A continuación las células se lisaron durante 3 h en agitación con agua ultrapura que contenía 5 µM de TCDCA, utilizado como estándar

interno. El lisado celular se centrifugó durante 20 min a 16.000 $\times g$ y 4°C, y se determinó la concentración de ABs mediante HPLC-MS/MS (apartado 3.13.2).

3.7.7.- Determinación del estrés oxidativo

Con el fin de determinar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por el THCA y el posible efecto protector del UDCA, las células HuH-7 se sembraron a una densidad de 50.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos, y se mantuvieron en incubación en la estufa durante 24 h a 37°C. A continuación se retiró el medio de cultivo y se añadió medio de cultivo fresco que contenía los diferentes ABs a una concentración de 250 μM , y se incubaron durante 16 h en la estufa a 37°C. Posteriormente se cambió el medio de cultivo y se sustituyó por medio de cultivo sin suplementar que contenía diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFDA) 2 μM , con el que las células se incubaron durante 30 min. Finalmente las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS, se resuspendieron en medio de cultivo sin suplementar y se determinó la intensidad de fluorescencia de la población celular mediante citometría de flujo en el canal FL1.

3.7.8.- Estudios de viabilidad celular

Para evaluar la toxicidad del THCA y el posible papel protector del UDCA, se sembraron células HuH-7 modificadas genéticamente para sobreexpresar la proteína ACOX2 en su forma silvestre o con la mutación p.Arg225Trp a una densidad de 15.000 células/cm² y se incubaron a 37°C durante 16 h. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio con los ABs mencionados a 250 μM , solos o en combinación, y se incubaron a 37°C durante 72 h. Transcurrido ese tiempo se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (apartado 3.14.4).

3.8.- EXPERIMENTOS *IN VIVO*

3.8.1.- Administración de fármacos en ratones

Se utilizaron hembras y machos de ratones silvestres o modificados genéticamente (apartado 3.1.2) de entre 2 y 4 meses de edad. Los animales se

MATERIALES Y MÉTODOS

mantuvieron en ayunas 6 h antes de ser tratados con vehículo (solución salina), paracetamol (100, 200 o 300 mg/kg), o diclofenaco (50 mg/kg) por vía intraperitoneal. Tras 24 o 48 h respectivamente, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg) por vía intraperitoneal y se llevó a cabo la toma de muestras:

- Hígado: el órgano se extrajo mediante disección y se determinó su masa mediante pesada. Se tomaron fragmentos del órgano los cuales se conservaron en RNA Later® para la posterior extracción de ARN; o se congelaron rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido para la realización de estudios histológicos, medida de ABs y determinación de proteínas por WB. En ambos casos estas muestras se conservaron a -80°C.
- Bilis: se obtuvo por punción de la vesícula biliar y se determinó el volumen exacto por pesada. Se conservó a -20°C hasta realizar la determinación de ABs.
- Sangre: mediante punción en la vena cava inferior. Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 18.000 $\times g$ para la obtención de suero, el cual se conservó a -20°C para la determinación de la bioquímica hepática y el análisis de ABs y de C4.

3.9.- ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNm POR RT-qPCR

3.9.1.- Extracción del ARN total

El ARN de los homogenados de células o de tejidos se obtuvo empleando el kit comercial ilustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit, basado en la purificación del ARN adsorbido a membranas de sílice. Se procesaron un máximo de 5 millones de células o 30 mg de tejido por columna.

3.9.2.- Transcripción reversa

La reacción de retro-transcripción (RT) que permitía la obtención del ADNc empleado como molde para la PCR se realizó utilizando el kit High Capacity Reverse Transcriptase kit. Se preparó una mezcla de reactivos y 0,5-2 μg de ARN siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y la reacción se programó en un termociclador con las siguientes condiciones: 25°C durante

10 min, 37°C durante 120 min; 65°C durante 5 min. El producto final se diluyó con agua ultrapura hasta obtener una concentración del ARN de partida de 20 µg/µl, y se conservó a -20°C hasta su uso.

3.9.3.- Diseño de *primers*

Para realizar las medidas por qPCR se diseñaron *primers* (Tabla MM3) utilizando como molde la secuencia de ARNm publicada en la base de datos GenBank (227). Al menos uno de los dos *primers* de cada pareja se dispuso en la región de empalme de dos exones codificantes, con el fin de evitar la amplificación de ADNg o ARN inmaduro. Como herramientas informáticas se utilizaron el software OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Coralville, EE.UU.), y el programa BLAST para asegurar la especificidad de las secuencias diseñadas (227,228).

Tabla MM3.- Secuencias de *primers forward* (F) y *reverse* (R) empleados para la cuantificación de los niveles de expresión de los genes de interés.

ARNm	Proteína	N° de acceso	Secuencia (5' – 3')	Tipo
<i>Homo sapiens</i>				
ABCB11	BSEP	NM_003742	GTGAAGGAATGGTGACCGTGGA	F
			TCCTTGGCAGCTTGGACTATGTCT	R
ABCC2	MRP2	NM_000392	TGAAGAGGAAGCCACAGTCCATGA	F
			TTCAGATGCCTGCCATTGGACCTA	R
ABCD3	PMP70	NM_002858.4	CGGCCTGCACGGTAAGAAAAGT	F
			CTTGTCCACCACAGCTCGCT	R
ACOX1	ACOX1	NM_004035.7	CCTGGTGGGCTTGAAAGACTT	F
			GTCACCAACGGTAATTCCTGGCA	R
ACOX2	ACOX2	NM_003500.4	CACCCCACTGCCAGGAATCAT	F
			GCAAGACCTGTGCAAAGCGACT	R
ACOX3	ACOX3	NM_003501.3	CCAAGTACCTCCTCCATAGCTTGGT	F
			CGTGGCTTAATTCGGTCAGAGCAAA	R
ALB	ALB	NM_000477.5	GTGTGTTTCGTCGAGATGCACACAA	F
			AAAGGCAATCAACACCAAGGCTTTGAA	R
AMACR	AMACR	NM_001701	GGGCAGGTTCTCTTGCTAGGTTTT	F
			CTGGCTCATCAACAAGTGCACTCA	R
BAAT	BAAT	NM_001701	GGGCAGGTTCTCTTGCTAGGTTTT	F
			CTGGCTCATCAACAAGTGCACTCA	R
BAX	BAX	NM_138761	ATGGAGCTGCAGAGGATGATTGC	F
			GTTCTGATCAGTTCCGGCACCTT	R

MATERIALES Y MÉTODOS

<i>BCL2</i>	BCL2	NM_000633	GGAGGCTGGGATGCCTTTGT AGGCATGTTGACTTCACTTGTGGC	F R
<i>CYP7A1</i>	CYP7A1	NM_000780.2	CCATAAGGTGTTGTGCCACGGAAA GCCCAAATGCCTTCGCAGAAG	F R
<i>NR1H4</i>	FXR	NM_005123	GCAATTGTTATCCTGTCTCCAGATAGACAAT ACATA GAGCTAGACCCCTCCCCTGTAA	F R
<i>HPRT1</i>	HPRT1	NM_000194	ATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT TGAGCACACAGAGGGCTACAATGT	F R
<i>HSD17B4</i>	DBP	NM_001292027.1	TGTTTCAATGAATGATTTGGGAGGGGACT TCTTCCACTGAATCATAGTTGGCCACT	F R
<i>NR0B2</i>	SHP	<i>NM_021969</i>	<i>GGCTTCAATGCTGTCTGGAGT</i> <i>CTGGCACATCGGGGTTGAAGA</i>	<i>F</i> <i>R</i>
<i>SCP2</i>	SCPx	NM_002979.5	GGGTTGGCATGACCAAGTTTGTGA GCTAAAGCCTTCTTGCCCTGCTTCTT	F R
<i>SLC10A1</i>	NTCP	NM_003049	AATGGACGGTGCAGACGCA GGTGAAAGGCCACATTGAGGA	F R
<i>SLC01B1</i>	OATP1B1	NM_006446	GCATCACCTGAGATAGTGGGAAAAGGTT GGAGTCTCCCCTATTCCACGAAGCATAT	F R
<i>Mus musculus</i>				
<i>Acox1</i>	Acox1	NM_015729.3	CAGACAGAGATGGGTCATGGAECTCA GTCACAGTTGGGCTGTTGAGAATGAA	F R
<i>Acox2</i>	Acox2	NM_001161667.1	CCACTTGATGGAAGTCATTGTAGGGCT TACGACCAAATCCGTTGACTCC	F R
<i>Acox3</i>	Acox3	NM_030721.3	CAAATGCGTCTCCACATGTTGGTT GCAAAACAGCCAAAAATCTCCAGGCTA	F R
<i>Akr1d1</i>	Akr1d1	NM_145364.2	TACTCAGATCCTAGACCGGTCCCT TCTCTGATGGCCTCACCGACT	F R
<i>Cyp3a11</i>	Cyp3a11	NM_007818.3	GTGCTCCTCTACCGATATGGGACT ACTCCATGTGCAATTTCCATAAACCTTGTA	F R
<i>Cyp7a1</i>	Cyp7a1	NM_007824.3	CTGCGAAGGCATTTGGACACAGA AGAGCATCTCCCTGGAGGGTT	F R
<i>Cyp8b1</i>	Cyp8b1	NM_010012.3	TGGGATGCCTGTGTCTGTCTT TCTCCGGAAAGCCATGGAGTGA	F R
<i>Cyp27a1</i>	Cyp27a1	NM_024264	CTATGGGATCTTCATCGCACAAAGGAGA ACCTCGTTTAAGGCATCCGTGTAGA	F R
<i>Hprt1</i>	Hprt1	NM_013556.2	CCCAGCGTCGTGATTAGCGAT CGAGCAAGTCTTTCAGTCCTGTCCATA	F R

3.9.4.- PCR cuantitativa (qPCR)

La cuantificación de los niveles de expresión génica se realizó mediante PCR cuantitativa (qPCR) a tiempo real. En esta Tesis Doctoral se empleó el reactivo SYBR® Select Master Mix, que contiene el fluorocromo SYBR Green I.

Las condiciones de tiempo y temperatura para la PCR fueron:

- Un ciclo de 2 min a 50°C.
- Un ciclo de 10 min a 95°C.
- 40 ciclos de 15 s a 95 °C y de 1 min a 60 °C.

En algunos casos fue necesario añadir un ciclo de disociación (15 s a 95°C y 1 min a 60°C) con el fin de comprobar la especificidad de los *primers* empleados.

Los datos obtenidos se analizaron empleando el software QuantStudio™ Design & Analysis Software (Thermo Fisher).

La cuantificación se realizó de forma relativa utilizando el ciclo umbral (Ct) de cada gen. De esta forma, se compara el Ct del gen diana con el de un control interno empleado como elemento normalizador. Así, la expresión del gen diana normalizada frente al control interno se calcula como:

$$\Delta Ct = Ct \text{ diana} - Ct \text{ control interno}$$

También se empleó un calibrador, una muestra a la cual se asigna valor 1 de expresión y que se utiliza como patrón externo para la comparación de resultados. De esta forma, la expresión del gen diana, normalizada y relativa al calibrador/muestra control, viene dada por:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra problema} - \Delta Ct \text{ del calibrador}$.

Todas las determinaciones se realizaron siempre por duplicado. La abundancia del ADN problema se corrigió por la del normalizador *HPRT1* o *Hprt1*, determinado paralelamente en cada muestra.

3.10.- DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT (WB)

3.10.1.- Obtención de homogenados de cultivos celulares o tejido

Los lisados proteicos a partir de cultivos celulares se obtuvieron por tripsinización o bien raspando la superficie de las placas con una espátula. Las células se lavaron posteriormente con tampón fosfato salino (PBS; NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 0,5 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,4) y se resuspendieron en buffer RIPA (PBS, IGEPAL 1%, desoxicolato sódico 0,5%, SDS 0,1%) en presencia de inhibidores de proteínas (IP) al 1% (v/v).

Los homogenados proteicos a partir de tejido se obtuvieron pesando 50 mg de muestra, que se homogeneizó en esta mezcla de RIPA + 1% IP utilizando un Bullet Blender Storm siguiendo las condiciones de tiempo especificadas por la casa comercial.

Para ambos tipos de muestra, los homogenados se mantuvieron durante 20 min sobre hielo, con agitación en vórtex cada 5 min. Posteriormente se centrifugaron a 20.000 *xg* a 4°C durante 20 min, y tras ello, el sobrenadante se retiró y se congeló a -80°C hasta su uso.

3.10.2.- Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida

Se prepararon geles separadores de poliacrilamida (SDS-PAGE) del 7,5% (p/v) en tampón Tris-HCl usando un sistema de soporte Mini-Protean II Cell, dejando polimerizar a temperatura ambiente. A continuación, encima de los mismos se depositaron geles concentradores de poliacrilamida al 4% en Tris-HCl junto con un peine para dar forma a los pocillos, polimerizando nuevamente a temperatura ambiente.

Se tomaron alícuotas de 50-200 µg de homogenado de proteínas, que se mezclaron con la solución de carga Laemmli 4x (0,250 M Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 40% glicerol, 0,008% azul de bromofenol) y 5% β-mercaptoetanol para obtener condiciones reductoras. Las muestras se desnaturalizaron mediante calentamiento a 100°C durante 5 min, según las instrucciones de uso de algunos anticuerpos para la detección de las proteínas de interés. Las muestras así preparadas se cargaron en los pocillos del gel junto con un marcador de pesos moleculares (Precision Plus Protein Dual Color Standards

o PageRuler Plus Prestained Protein Ladder) y se desencadenó la electroforesis vertical en una cubeta con solución de migración (25 mM Tris, 192 mM L-glicina y 1% SDS) a un potencial constante de 200 V, durante el tiempo suficiente para la correcta resolución de la proteína de interés.

3.10.3.- Transferencia

Finalizado el proceso de electroforesis, se recuperaron los geles y se procedió a realizar una transferencia húmeda de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa, colocando ambos componentes entre papel *whatman* y esponjas impregnadas con tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM L-glicina y 20% metanol). Este *casette* se introdujo en una cubeta llena de tampón de transferencia frío y en agitación, que se conectó a una fuente de alimentación con una corriente constante de 250 mA durante 2 h.

3.10.4.- Inmunodetección

Se recuperó la membrana y se realizó un bloqueo de los lugares de unión inespecíficos para los anticuerpos empleando albúmina sérica bovina (BSA) o leche desnatada al 5% (p/v) diluida en tampón Tris salino-Tween (TBS-T; 2,42 g/l Tris base, 8 g/l NaCl, pH 7,6; suplementado con Tween20 al 0,1% v/v) durante una hora a temperatura ambiente.

A continuación se retiró la solución de bloqueo y se añadieron los anticuerpos primarios, convenientemente diluidos en leche al 0-5% (p/v) en TBS-T según las indicaciones de la casa comercial (Tabla MM4), manteniendo en agitación a 4°C durante aproximadamente 16 h.

Finalmente se realizaron tres lavados de la membrana con TBS-T durante 15 min, y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes convenientemente diluidos en leche al 5% (p/v) en TBS-T. Los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa se escogieron en función de la especie en la que se había producido el anticuerpo primario. Después de realizar tres lavados más con TBS-T

durante 15 min para eliminar el exceso de anticuerpo, se procedió al revelado de la membrana.

Tabla MM4.- Anticuerpos primarios y condiciones utilizadas para la detección de proteínas mediante *Western blot*.

Antígeno	Especie de origen	Dilución	Proteína de bloqueo
ACOX2	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:300	Sin bloqueo
BAAT	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:1000	Leche 5%
CYP3A4	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:1000	Leche 5%
GAPDH	<i>Mus musculus</i>	1:1000	Leche 5%
TUB1A	<i>Mus musculus</i>	1:1000	Leche 5%

3.10.5.- Revelado

El revelado de la inmunodetección se realizó con un método quimioluminiscente, incubando las membranas en oscuridad con los reactivos ECL (*Enhanced ChemioLuminescence*) y observando la quimioluminiscencia generada por la peroxidasa que marca los anticuerpos secundarios mediante el equipo de análisis de imagen LAS-4000. Los tiempos de exposición se modificaron para cada anticuerpo en función de la intensidad de señal obtenida.

3.11.-DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

Las células se sembraron en placa de 24 pocillos sobre cubreobjetos circulares. Una vez alcanzado el 60-90% de confluencia, se llevó a cabo la fijación con paraformaldehído al 4% (p/v) a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente se incubó con Triton X-100 al 0,5% (v/v) a temperatura ambiente durante 4 min para permeabilizar las membranas plasmática y peroxisomal y permitir el acceso de los anticuerpos a este orgánulo. Tras cada paso se realizaron 3 lavados con PBS.

Para realizar el marcaje de las proteínas de interés, los cubreobjetos se incubaron con FBS al 5% disuelto en PBS a temperatura ambiente durante 30 min, con el fin de bloquear los sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos. Posteriormente los cubreobjetos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h con los anticuerpos primarios deseados preparados en

PBS (Tabla MM5). A continuación se realizaron tres lavados de 10 min con PBS para retirar el exceso de anticuerpo primario, y se llevó a cabo la incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes (anti-IgG de ratón o conejo conjugado con Alexa Fluor-488® o Alexa Fluor-594®; dilución 1:1000), así como con DAPI (dilución 1:5000) para teñir los núcleos, durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron nuevamente tres lavados de 10 min con PBS, y se colocaron los cubres sobre portaobjetos de cristal con medio de montaje, de tal forma que la superficie con las células fijadas quede en contacto con el portaobjetos y el medio de montaje. Se sellaron las uniones con esmalte de uñas, que se dejó secar durante 1 h en oscuridad, y los portaobjetos se conservaron a 4°C hasta que se realizaron las fotografías de fluorescencia en un microscopio confocal.

Tabla MM5.- Anticuerpos primarios y condiciones utilizadas para la detección de proteínas mediante inmunofluorescencia.

Antígeno	Especie de origen	Dilución
ACOX2	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:50
Catalasa	<i>Mus musculus</i>	1:500
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	<i>Mus musculus</i>	1:100
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:100

3.12.- DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunotinción de ACOX2 y ACOX3 en secciones de 4 µm de biopsias de hígado embebidas en parafina (apartado 3.14.5) se realizó en un dispositivo automático Dako Omnis empleando el kit EnVision™ FLEX, High pH del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander). La recuperación inicial del epítipo en las muestras se logró mediante incubación a pH 9 durante 30 min a 97°C. A continuación las preparaciones se incubaron durante 30 min con el anticuerpo primario (Tabla MM6), y se bloqueó la actividad peroxidasa endógena de forma previa a la incubación durante 20 min con anticuerpo secundario marcado con peroxidasa. Finalmente, se realizó una contratinción con hematoxilina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla MM6.- Anticuerpos primarios empleados para la detección de proteínas por inmunohistoquímica.

Antígeno	Especie de origen	Dilución
ACOX2	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:100
ACOX3	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:75

3.13.- DETERMINACIONES POR HPLC-MS/MS

3.13.1.- Procesado de las muestras

A todas las muestras se les añadió, previamente a su procesamiento, una cantidad conocida de ácido nor-desoxicólico (norDCA) en solución metanólica, que se utilizó como estándar interno para calcular la eficacia del procedimiento de extracción. Una vez obtenidos, los extractos en fase orgánica se llevaron a sequedad bajo corriente de aire y se resuspendieron en metanol para su inyección en el HPLC-MS/MS.

3.13.1.1.- Tejido hepático

Se pesaron 20-50 mg de hígado, que se homogeneizaron en agua ultrapura mediante un *Bullet Blender Storm*. Este homogenado se mezcló (1:3, v:v) con etanol absoluto y se incubó a 65°C durante 2 h, tras las cuales se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 min a 4°C, se decantó el sobrenadante, y se repitió el proceso con el precipitado. Ambos sobrenadantes se mezclaron y se evaporaron bajo corriente de aire hasta obtener un volumen de 1 ml, se añadió NaOH 0,1 N (1:4, v:v) y se purificó mediante cartuchos Sep-Pak con relleno de octadecilsilano (C18), extrayendo finalmente los ABs con metanol y llevando a sequedad.

3.13.1.2.- Bilis

Debido a su alto contenido en ABs y bajo en proteínas, la bilis no precisa un procesamiento de extracción previo al análisis. Las muestras se diluyeron 100 veces en metanol y se inyectaron en el HPLC-MS/MS.

3.13.1.3.- Suero

El procesado del suero puede realizarse siguiendo dos protocolos:

- Empleando cartuchos C18: se mezclaron 2 ml de suero con NH_4HCO_3 0,4 M (1:4, v:v) y se calentaron a 65°C durante 2 h. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 3.500 rpm durante 10 min, y el sobrenadante se purificó mediante cartuchos Sep-Pak C18, eluyendo finalmente los ABs con metanol.
- Empleando acetonitrilo: un volumen determinado de suero (200 μl para roedores, 400 μl para humanos) se mezcló con acetonitrilo (1:3, v:v), se agitó vigorosamente en vórtex durante 1 min y se centrifugó a 13.000 $\times g$ durante 15 min a 4°C. Tras decantar el sobrenadante, se repitió este proceso con el precipitado. Finalmente ambos sobrenadantes se mezclaron y se evaporaron hasta sequedad.

3.13.1.4.- Medios de cultivo

El medio de cultivo celular se mezcló (1:1, v:v con NH_4HCO_3 0,4 M y se calentó a 65°C para separar los ABs de su unión a proteínas, y se procesaron con cartuchos Sep-Pak C18, extrayendo finalmente con metanol.

3.13.2.- Determinación de ABs

La separación cromatográfica de los ABs se llevó a cabo en una columna de fase reversa de 15 cm de longitud, empleando como fase móvil una mezcla de agua con acetato de amonio 5 mM y ácido fórmico 0,01%; y metanol con acetato de amonio 5 mM y ácido fórmico 0,01%, a un flujo de 0,5 ml/min. Se trabajó utilizando un método de elución en gradiente, de tal forma que la proporción inicial era 73:27 de metanol:agua, incrementando la concentración de metanol de forma lineal durante 10 min hasta alcanzar el 93% de metanol, para retornar a las condiciones iniciales en 1 min y mantenerlas durante los 5 min finales.

La determinación de los ABs en el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo se llevó a cabo utilizando ionización negativa, con el fin de obtener los aniones moleculares de cada uno de los analitos. Las condiciones de

trabajo para la fuente iónica fueron: temperatura del gas (N_2) $350^\circ C$, flujo del gas 11 ml/min, presión del nebulizador 45 psi, voltaje 2.500 V. Se empleó el método de trabajo MRM, el cual utiliza el modo SIM, por el que se selecciona una relación m/z específica en ambos cuadrupolos y se sigue la transición de cada ion precursor (ion molecular - H^+) a los respectivos iones producto. Debido a que se dispone de patrones comerciales de los ABs conocidos, este método permite la identificación y cuantificación de los mismos, ya que se conoce su tiempo de retención en el HPLC en las condiciones descritas, así como las relaciones m/z que presenta y sus transiciones. En el caso de los ABs glicoconjugados se monitorizó el ion producto 74 m/z, correspondiente a la glicina, mientras que para los tauroconjugados se siguió el ion producto 80,2 m/z, correspondiente al grupo SO_3^- de la taurina. Para los ABs libres, los cuales no presentan fragmentación del ion molecular, se sigue la transición de ion molecular a ion molecular, por ejemplo, de 407,1 m/z a 407,1 m/z en el caso del CA. La cuantificación de estas especies se llevó a cabo construyendo rectas patrón de cada analito usando un patrón comercial, en soluciones metanólicas con concentraciones entre $0,1 \mu M$ y $25 \mu M$ (229).

3.13.3.- Determinación de 7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona (C4)

Las muestras de suero para la determinación del intermediario de biosíntesis de ABs 7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona (C4) se procesaron utilizando una precipitación con acetonitrilo como se describe en el apartado 3.13.1.3.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en la misma columna en fase reversa y con las mismas fases móviles y flujo de trabajo empleados para la separación de ABs (apartado 3.13.2). Se utilizó un método de elución en gradiente con proporción inicial 80:20 de metanol:agua incrementando la proporción de forma lineal durante 4 min hasta alcanzar el 97% de metanol, que se mantenía hasta los 10 min. Posteriormente se incrementaba de nuevo la proporción de metanol hasta el 100% hasta el minuto 12, a partir del cual se vuelve a las condiciones iniciales para mantenerlas los 5 min finales.

La determinación del C4 en el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo se llevó a cabo utilizando ionización positiva. Las condiciones de trabajo para

la fuente iónica fueron: temperatura del gas (N_2) $350^\circ C$, flujo del gas 11 ml/min, presión del nebulizador 45 psi, voltaje 2.500 V. Se empleó el método de trabajo MRM, siguiendo las transiciones del ion molecular 401,3 m/z a los iones producto 383,4 m/z, 177 m/z y 97,1 m/z. La cuantificación se llevó a cabo construyendo una recta patrón con concentraciones entre 4 y 80 mg/ml (230).

3.14.- OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS

3.14.1.- Valoración de ácidos nucleicos

La concentración de ácidos nucleicos se valoró espectrofotométricamente determinando la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en un NanoDrop 1000. El coeficiente de extinción se modificó en función del tipo de muestra. Para evaluar la posible contaminación con proteínas, solventes orgánicos, AEDT y otros compuestos, se determinó la relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm (260/280), y 260 y 230 nm (260/230), respectivamente.

3.14.2.- Valoración de proteínas totales

La concentración total de proteínas en las diversas muestras se determinó empleando una modificación del método de Lowry realizada por Markwell (231), basado en la reducción de las proteínas con cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolibdico fosfotúngstico, generando un producto de reacción que puede seguirse por espectrofotometría. Como patrón se utilizó BSA.

3.14.3.- Determinación de marcadores bioquímicos hepáticos

La determinación de parámetros bioquímicos hepáticos en las muestras de suero murino se realizó mediante un analizador automático de química seca Spotchem EZ SP-4430.

3.14.4.- Determinación de la viabilidad celular

Se utilizó el test de formazán. Esta técnica se fundamenta en la generación de formazán, un compuesto cuantificable por espectrofotometría, a partir de una sal de tetrazolio por acción de las deshidrogenasas mitocondriales. La

cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células vivas en un cultivo.

Así, en una placa de 96 pocillos se añadieron 110 μ l de MTT a 0,5 mg/ml en medio de cultivo y se incubó la placa a 37°C durante 4 h. Posteriormente se añadieron 100 μ l de SDS al 10% en HCl 0,01 M y se mantuvo en incubación a 37°C durante 16 h. Finalmente se llevó a cabo la determinación de la absorbancia del formazán a 595 nm por espectrofotometría en un lector de ELISA.

3.14.5.- Estudios histológicos

Las biopsias hepáticas de pacientes se procesaron de forma rutinaria (232) en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Se fijaron con formalina neutra al 10% y se incrustaron en parafina. Se tiñeron secciones seriadas (4 μ m) o secciones en espejo con hematoxilina y eosina o tricrómico de Masson. Los hallazgos histopatológicos y el estadio de la fibrosis fueron calificados por un patólogo experto utilizando los índices de Knodell y Scheuer.

Los cortes de hígado de ratón (5 μ m) se realizaron en un criostato, se fijaron a un cubreobjetos mediante presión y se conservaron a -80°C hasta su uso. Se llevó a cabo una fijación con paraformaldehído al 4% previa a la tinción con hematoxilina-eosina. Seguidamente se deshidrataron por incubación en soluciones de alcohol-xilol de porcentaje creciente, y se montaron con entellán para su estudio mediante microscopio óptico.

3.15.- ESTUDIOS *IN SILICO*

Estos estudios se realizaron en el contexto de una colaboración con el Dr. Matías Ávila. Los datos transcriptómicos de alto rendimiento se descargaron de las siguientes bases de datos: GSE105127, GSE115193, GSE126848 (233) y GSE130970 (234) en formato fastq utilizando el software SRAToolkit versión 2.11.0 (235). Las secuencias se filtraron utilizando TrimGalore versión 0.6.0 con Cutadapt versión 1.18 (236). El mapeo se llevó a cabo utilizando el software STAR versión 020201 (237) sobre la versión

GRCh38.p14 del genoma humano (238). El recuento de lecturas se realizó con HTseq versión 0.11.0 (239) y se normalizó con EdgeR versión 3.28.1 (240) en R versión 3.6.3 (241). Como método de normalización se seleccionó la media recortada de los valores M (*Trimmed mean of M-values*, TMM), junto con el filtrado de genes de baja expresión para el análisis de la expresión génica diferencial.

3.16.- ESTUDIO DE VALIDACIÓN

Mediante una colaboración con los Drs. Josepmaría Argemí y Ramón Bataller, se llevó a cabo un estudio de validación de los resultados obtenidos en el estudio *in silico* empleando los datos de una cohorte de pacientes analizada recientemente por ellos (242). Se incluyeron muestras de hígado humano de los siguientes grupos de pacientes: individuos no enfermos control (n=10); pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) (n=9); pacientes con infección por virus de hepatitis C (VHC) no cirrótica (n=10); pacientes con cirrosis compensada asociada a infección por VHC (n=9); pacientes con esteatohepatitis alcohólica (ASH) temprana, que no eran obesos y presentaban una elevada ingesta de alcohol, leve elevación de las transaminasas y criterios histológicos de esteatohepatitis (n=12); pacientes con hepatitis alcohólica (AH) confirmada histológicamente que padecían un estado leve (n=11) o severo (n=18), a los que se les realizó una biopsia previa a cualquier tratamiento; pacientes con AH que se sometieron a un trasplante precoz, de los que se recogieron muestras de los explantes hepáticos (n=11). Los pacientes con enfermedades malignas se excluyeron de este estudio.

La extracción de ARN total de tejido hepático congelado se llevó a cabo mediante la separación por fenol/cloroformo. La pureza y la calidad del ARN se evaluaron mediante electroforesis automatizada (Bioanalyzer, Agilent). La secuenciación fue de extremo emparejado (2 Å~ 100 pb) y multiplexada, y se realizó utilizando la plataforma Illumina HiSeq2000. Las bibliotecas de datos se construyeron utilizando TruSeq Stranded Total RNA Ribo-Zero GOLD (Illumina). Noventa y cuatro muestras secuenciadas por pares obtuvieron una media de 36,9 millones de lecturas totales, con 32,5 millones (88%) mapeadas

MATERIALES Y MÉTODOS

en base a la referencia GRCh37/hg19 (243). La alineación de las lecturas cortas se realizó mediante el algoritmo de alineación STAR utilizando los parámetros por defecto (237). Para cuantificar la expresión a partir de los mapeos del transcriptoma se empleó el software RSEM (244).

CAPÍTULO I:

**REGULACIÓN DE LAS
ENZIMAS PEROXISOMALES
IMPLICADAS EN LA
BIOSÍNTESIS DE LOS ABS.
IMPACTO DE LAS
ENFERMEDADES
HEPÁTICAS INFLAMATORIAS**

4.1.- RESULTADOS

4.2.- DISCUSIÓN

CAPÍTULO II:
PREVALENCIA Y
TRATAMIENTO DE HADA.
DESARROLLO DE MODELOS
IN VITRO

5.1.- RESULTADOS

La hipertransaminasemia es una condición frecuente en muchas patologías hepáticas. No obstante, en un 15% de los casos no se llega a diagnosticar su causa (273). Además, la identificación de la etiología en pacientes pediátricos con niveles elevados de transaminasas es especialmente difícil debido a la habitual falta de otras manifestaciones clínicas frecuentes. Dado que en nuestro grupo de investigación habíamos descrito la presencia de la mutación p.Arg225Trp en ACOX2 como la causa de hipertransaminasemia idiopática persistente en un adolescente, nos planteamos que las alteraciones en esta enzima peroxisomal podían estar implicadas en la aparición de otros casos de hipertransaminasemia no filiada. Así, establecimos colaboraciones con investigadores clínicos de distintos hospitales nacionales e internacionales con el fin de llevar a cabo una búsqueda activa de posibles candidatos a padecer HADA.

5.1.1.- Identificación de nuevos casos de HADA

En este estudio reclutamos un total de 33 pacientes con hipertransaminasemia persistente de origen desconocido (Figura R31), tras descartar las causas más frecuentes de hipertransaminasemia (hepatitis viral o alcohólica, daño metabólico hepático, hepatitis autoinmune, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, déficit de α 1-antitripsina y colestasis obstructiva). Catorce de estos sujetos presentaban hipercolanemia (ABs totales $\geq 10 \mu\text{M}$), lo que sugiere la existencia de un cierto grado de colestasis. Entre el resto de individuos normocolanémicos, encontramos una relación $\text{ABs } C_{27}/\text{ABs } C_{24} > 1$ en cuatro sujetos, los cuales consideramos como posibles casos de HADA (Tabla R1; Figura R32). Posteriormente analizamos el perfil de ABs en trece familiares de estos pacientes. Entre ellos encontramos otros tres individuos con elevados niveles de ABs C_{27} junto con alteraciones genéticas asociadas a defectos funcionales en ACOX2 (Tabla R1; Figura R32). No observamos alteraciones en los niveles séricos de C_4 , un marcador sérico de la tasa de biosíntesis de ABs a través de la vía clásica o neutra, en aquellos casos en los que se pudo determinar este valor (Tabla R1).

Tabla R1.- Especies moleculares de ácidos biliares en el suero de pacientes con deficiencia de ACOX2. Las muestras control fueron tomadas de 18 individuos sanos.

	Controles		Paciente 1		Tío caso 1		Paciente 2		Paciente 3		Paciente 4					
	No	5	No	0,75	6	No	0,75	3	6	41	47	No	0,75	5	11	
Tratamiento con UDCA (meses)																
C4 (7α-hidroxi-4-colesten-3-ona) (nM)	17 \pm 3	16	12	11	38	9	16	6	11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ácidos biliares C₂₄ endógenos (nM)	2290 \pm 500	980	610	1137	1895	620	13545	295	1336	960	600	703	1454	656	649	649
Ácidos biliares C₂₇ endógenos (nM)	20 \pm 3	1304	1334	2201	6122	791	5581	153	5014	2315	795	3245	2092	307	512	512
Ácidos biliares C₂₇ (%)	0,9 \pm 0,1	57,1	68,6	65,9	76,4	56,1	29,2	34,1	79,0	70,7	57,0	82,2	59,00	31,9	44,1	44,1
Especies moleculares de ácidos biliares C₂₄ (nM)																
Glicocólico	117 \pm 40	43	66	152	615	18	607	13	227	163	30	102	134	27	15	15
Glicohenodesoxicólico	421 \pm 90	256	201	662	1018	40	2289	84	676	461	129	284	664	460	67	67
Glicodesoxicólico	180 \pm 44	27	2	74	31	11	450	19	144	5	8	101	71	2	33	33
Glicolitocólico	9 \pm 2	4	<1	46	7	2	4	22	14	1	5	1	6	1	18	18
Glicoursodesoxicólico	51 \pm 17	5287*	6	7998*	4232*	16	13065*	1667*	6264*	9949*	2524*	107	9281*	3305*	1477*	1477*
Taurocólico	18 \pm 7	1	5	11	57	<1	24	<1	21	1	5	14	11	1	4	4
Tauroquenodesoxicólico	53 \pm 11	14	22	50	88	4	60	2	75	44	12	57	83	29	7	7
Taurodesoxicólico	23 \pm 6	3	1	9	7	1	6	1	13	2	1	26	8	1	2	2
Taurolitocólico	1 \pm 1	<1	<1	3	2	<1	<1	<1	2	<1	<1	<1	1	<1	1	1
Tauroursodesoxicólico	2 \pm 1	97*	<1	117*	201*	<1	189*	15*	230*	235*	63*	7	263*	64*	33*	33*
Taurosulfolitocólico	103 \pm 15	3	4	78	3	8	18	10	72	31	205	14	11	1	189	189
Cólico	403 \pm 92	122	276	5	47	504	6546	63	27	93	56	6	33	18	153	153
Quenodesoxicólico	330 \pm 180	445	14	20	11	6	2755	32	19	140	119	41	311	110	46	46
Desoxicólico	417 \pm 124	59	4	13	5	7	781	34	29	8	16	45	114	4	67	67
Litocólico	93 \pm 27	1	1	14	4	1	5	17	16	1	13	9	10	1	48	48
Ursodesoxicólico	65 \pm 21	6737*	2	7645*	96*	3	105873*	1276*	223*	3197*	2725*	23	2812*	2555*	1296*	1296*
Especies moleculares de ácidos biliares C₂₇ (nM)																
Glicotrihidroxicolestanoico	<1	118	156	189	763	38	1133	24	521	290	59	153	167	27	54	54
Glicodihidroxicolestanoico	<1	15	39	127	117	19	79	8	61	30	7	18	33	<1	3	3
Taurotrihidroxicolestanoico	16 \pm 3	706	902	1348	4492	553	3199	71	3443	1575	597	2125	1432	194	291	291
Taurodihidroxicolestanoico	<1	87	204	472	708	164	364	14	959	333	77	936	438	69	118	118
Trihidroxicolestanoico	4 \pm 1	379	32	63	42	17	806	36	30	87	55	14	21	16	46	46

UDCA, ácido ursodesoxicólico. Las especies moleculares de la familia del UDCA se marcan con un asterisco cuando el paciente estaba siendo tratado con UDCA (12 o 15 mg/kg/día). ND, no determinado.

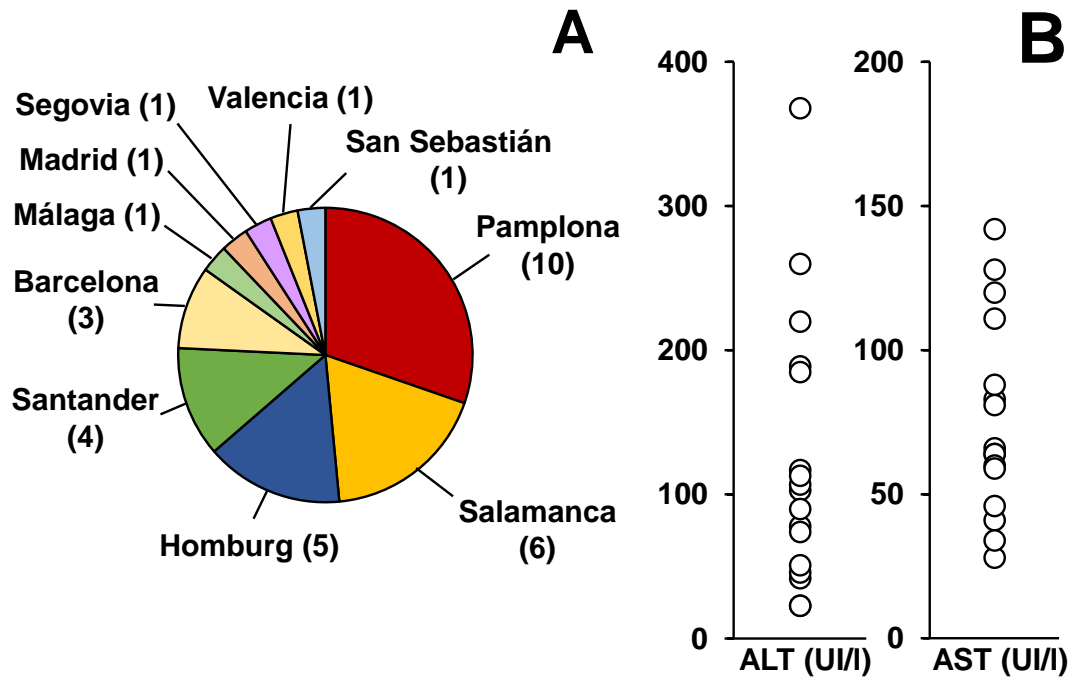


Figura R31.- Origen geográfico de las muestras de pacientes con hipertransaminasemia idiopática (A). Valores de transaminasas de los pacientes incluidos en el estudio (B). ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa.

5.1.1.1.- Caso 1

Se trataba de un varón de 17 años que fue atendido en la Unidad de Hepatología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander) en 2010 aquejado de astenia moderada y persistente de causa desconocida, con un historial de hipertransaminasemia inexplicable (Tabla Anexo 1). La exploración mediante ecografía abdominal mostró una morfología y tamaño del hígado y el árbol biliar normales. En la biopsia hepática se observó la presencia de un engrosamiento fibroso portal con fibrosis focal en puentes porto-portales y un mínimo componente inflamatorio portal, por lo que el paciente fue diagnosticado de hepatitis autoinmune seronegativa. Se le prescribió terapia inmunosupresora que se continuó durante 10 años, a lo largo de los cuales el tratamiento fue modificado en varias ocasiones. Sin embargo, la hipertransaminasemia no desapareció durante este periodo, poniendo de manifiesto la necesidad de una nueva evaluación clínica, que se llevó a cabo en 2019.

Se volvieron a descartar todas las causas comunes de daño hepático y alteraciones biliares, y se realizó una nueva biopsia hepática que no aportó información adicional (Figura R33-A, B). El análisis de la historia clínica mostró que la aparición de la hipertransaminasemia había sido posterior y cercana en el tiempo al tratamiento de una torsión testicular con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), lo cual guardaba cierta similitud con el primer caso descrito de deficiencia de ACOX2 (220), por lo que el clínico especialista que llevaba el caso sospechó de una posible alteración en la biosíntesis de los ABs e inició una terapia con UDCA, que ha mostrado su utilidad en patologías hepatobiliares (156). Tras tres semanas de tratamiento, los niveles de transaminasas volvieron a rangos normales y la astenia mejoró.

Tras este hallazgo, realizamos un análisis de especies moleculares de ABs en el suero del paciente que mostró una elevada proporción de ABs C₂₇ (Tabla R1). Mediante el análisis genético de la ORF completa de ACOX2 encontramos la presencia en homocigosis de la variante c.673C>T (p.Arg225Trp) previamente descrita (222). Posteriormente estudiamos la familia del paciente, y determinamos que tanto su hermano como su madre y uno de sus tíos maternos presentaban acumulación de ABs C₂₇ en suero y eran portadores homocigotos de la misma variante de ACOX2 (Tabla R1, Figura R32, Tabla Anexo 2). Cabe destacar que a estos tres pacientes se les había extirpado la vesícula biliar en el pasado debido a la aparición de colelitiasis complicadas. Los análisis séricos de bioquímica hepática del tío mostraron una marcada hipertransaminasemia (ALT: 131 UI/l; AST: 68 UI/l), por lo que se le prescribió el tratamiento con UDCA. Esta intervención devolvió las transaminasas a niveles normales pasadas tres semanas (ALT: 27 UI/l; AST: 19 UI/l), valores que se mantenían a los 6 meses de tratamiento (ALT: 17 UI/l; AST: 20 UI/l) a pesar de que la proporción de ABs C₂₇ respecto de los ABs endógenos totales seguía elevada (Tabla R1, Figura R32). Por el contrario, el padre del paciente resultó ser portador heterocigoto de la mutación de ACOX2, y su tía no portaba ninguna variante para esta enzima. En ninguno de estos dos individuos encontramos acumulación de intermediarios C₂₇ en suero (Figura R32, Tabla Anexo 2).

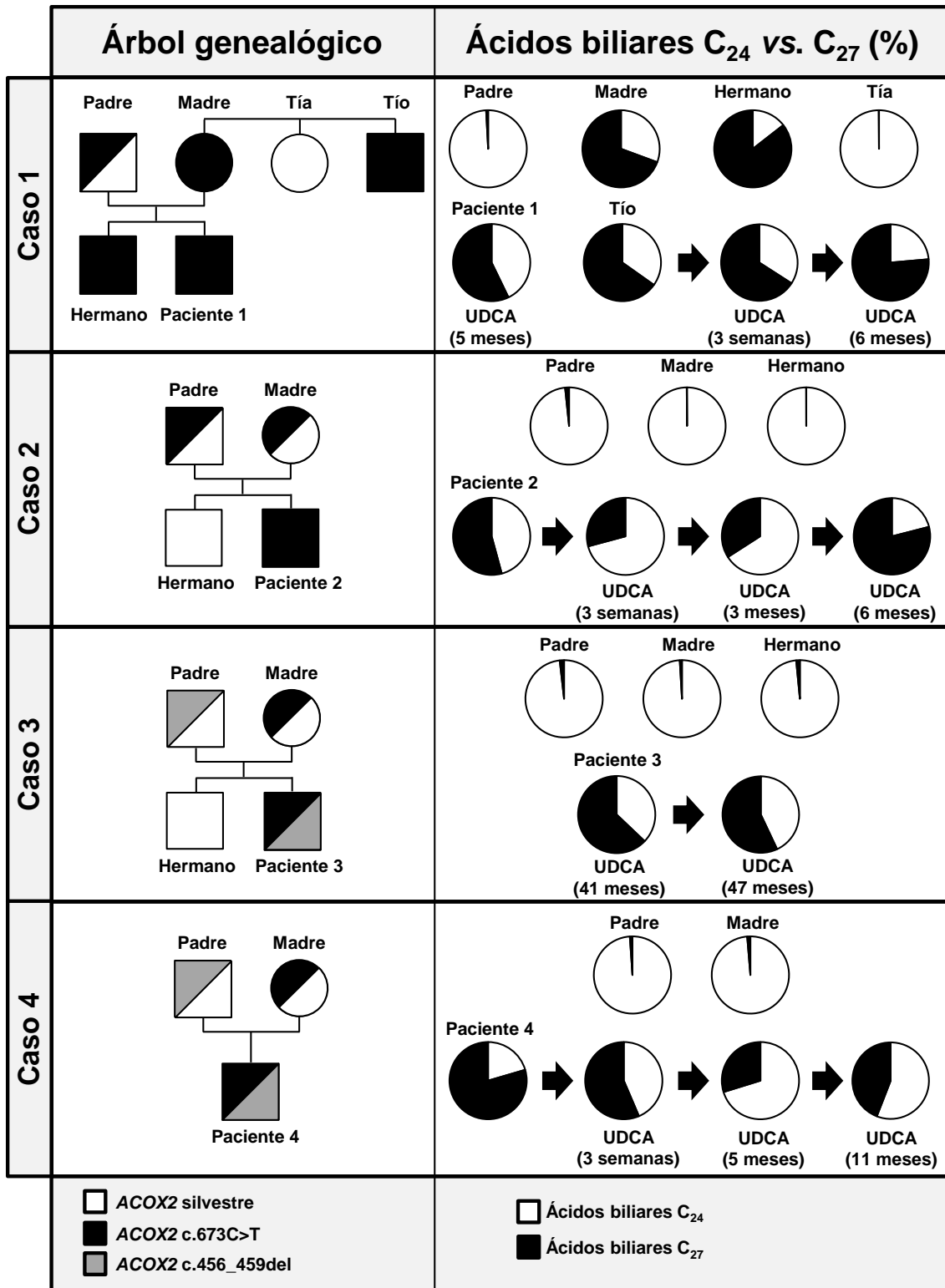


Figura R32.- Árbol genealógico de los pacientes con hipertransaminasemia asociada a deficiencia de ACOX2 (HADA) (columna izquierda) y proporción de las concentraciones plasmáticas de ácidos biliares maduros (ABs C₂₄) e inmaduros (ABs C₂₇) (columna derecha). En los pacientes tratados con ácido ursodesoxicólico (UDCA, 12 o 15 mg/kg/día), esta especie molecular y sus conjugados no se consideraron en el cálculo de las concentraciones.

5.1.1.2.- Caso 2

Se trataba de un varón de 17 años con historial clínico de hipertransaminasemia desde el primer año de vida (Tabla Anexo 3). Había sido diagnosticado de déficit de hormona del crecimiento y tratado con somatotropina, y su seguimiento fue realizado por su pediatra hasta que fue derivado en 2020 a la Unidad de Hepatología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Tras descartar otras causas frecuentes de hipertransaminasemia, y otras condiciones más raras como la deficiencia de lipasa lisosomal ácida, se realizó una ecografía abdominal junto con una colangiopancreatografía por resonancia magnética nuclear, las cuales no mostraron hallazgos relevantes. El estudio de la arquitectura hepática en la biopsia únicamente reveló una ligera dilatación sinusoidal y una mínima fibrosis venosa central (Figura R33-C, D).

El análisis del perfil sérico de ABs del paciente reveló una proporción elevada de ABs C₂₇ (Tabla R1, Figura R32). Además, este individuo resultó ser homocigoto para la variante c.673C>T (p.Arg225Trp) de ACOX2 (Figura R32).

Dada la efectividad del UDCA observada en el caso 1, este paciente comenzó a recibir el mismo tratamiento, consiguiendo que las transaminasas alcanzaran niveles normales a las tres semanas (Tabla Anexo 3) junto con una menor proporción de ABs C₂₇ respecto del total de ABs endógenos (Figura R32). No obstante, a pesar de que los niveles de transaminasas se mantenían dentro del rango normal a los seis meses desde el inicio del tratamiento, los niveles de intermediarios C₂₇ se mantuvieron elevados, incluso mayores que antes de iniciar el mismo.

Los perfiles séricos de ABs de los familiares de este paciente eran normales. Los niveles plasmáticos de ABs C₂₄ de la madre y el hermano se encontraban también dentro de los rangos normales. Sin embargo, el padre presentaba hipercolanemia (22 µM), con un incremento en los niveles de todas las especies moleculares de ABs pero sin una proporción elevada de intermediarios C₂₇ respecto de ABs C₂₄ maduros (Figura R32, Tabla Anexo 4).

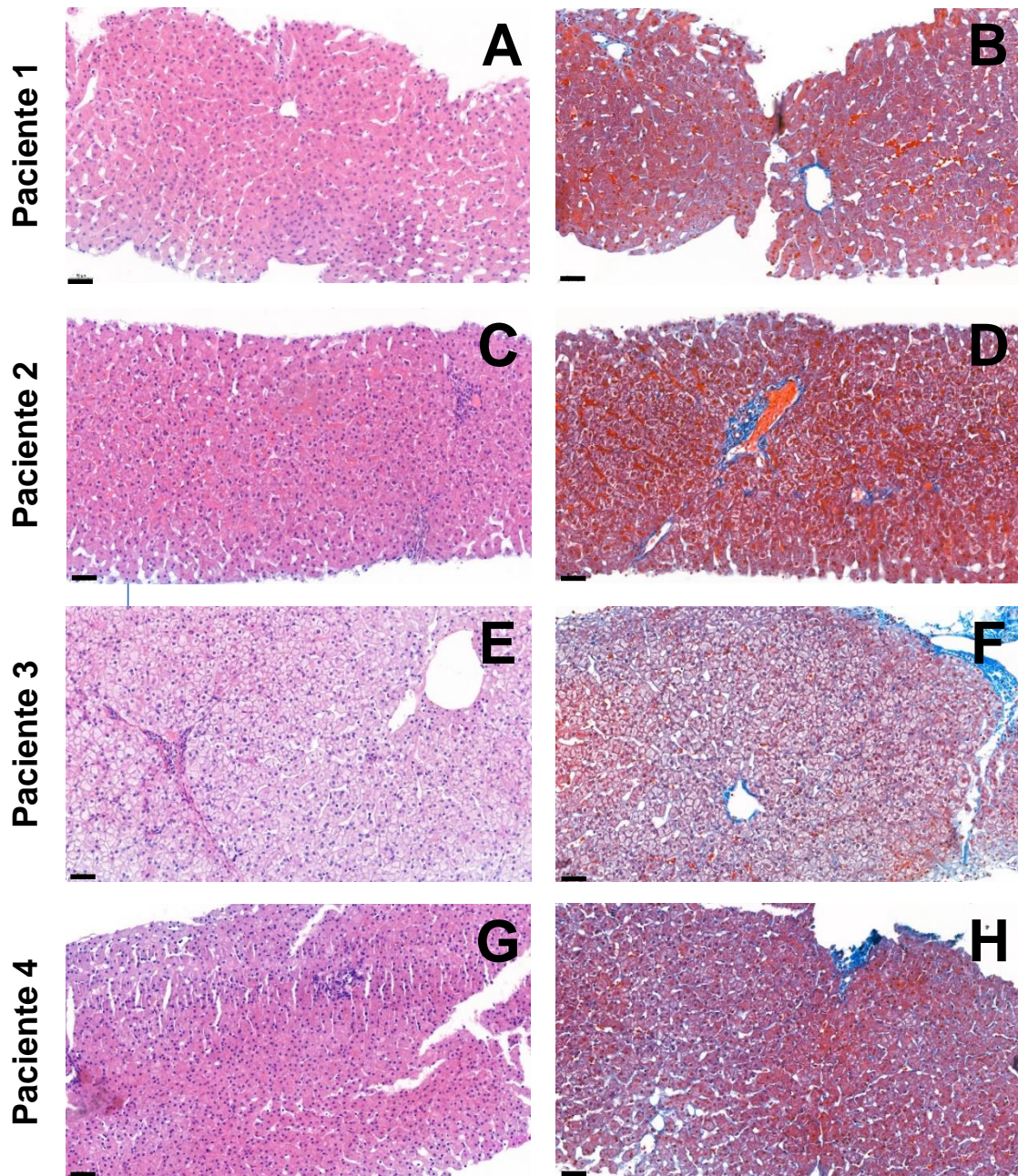


Figura R33.- Tinción con hematoxilina-eosina (A, C, E, G) y tricrómico de Mason (B, D, F, H) en biopsias hepáticas de los pacientes 1 (A, B), 2 (C, D), 3 (E, F) y 4 (G, H). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía óptica con un objetivo de 20X. La barra de escala indica 50 μ m.

5.1.1.3.- Caso 3

Este varón de 15 años había sido mantenido en seguimiento por el Hospital Santa Creu i Sant Pau (Barcelona) por hipertransaminasemia asociada a distensión abdominal y esteatorrea (Tabla Anexo 5). En 2017 fue derivado a la Unidad de Hepatología Pediátrica y Trasplante Hepático del Hospital Vall

d'Hebron (Barcelona). Inicialmente se descartaron todas las causas frecuentes de hipertransaminasemia, así como las alteraciones en el metabolismo de ABs con mayor prevalencia. La exploración abdominal mediante ecografía mostró una discreta hiperecogenicidad hepática, y en el análisis de la biopsia hepática se observó una fibrosis leve (Figura R33-E, F). Por decisión de su médico, el paciente comenzó un tratamiento empírico con UDCA antes de que se diagnosticara HADA, el cual provocó la normalización de los niveles de transaminasas séricas junto con la desaparición de los síntomas (Tabla Anexo 5).

El primer análisis del perfil de especies moleculares de ABs en suero, realizado 41 meses después de iniciado el tratamiento con UDCA, reveló una proporción elevada de ABs C₂₇ respecto del total (Figura R32). Además, en el análisis genético de la ORF de *ACOX2* se encontraron dos variantes en heterocigosis, cada una presumiblemente en un alelo diferente ya que no se detectó ningún alelo normal: la variante c.673C>T y la delección de 4 nucleótidos c.456_459del (Figura R32), que genera el mismo cambio a nivel proteico (p.Thr154fs) que la variante de *ACOX2* c.461_464del, descrita previamente por Ferdinandusse *et al.* (213). En los estudios de funcionalidad hepática y de perfil de ABs realizados seis meses más tarde observamos que se mantenían los niveles normales de transaminasas mientras que el perfil de ABs permanecía alterado (Tabla R1, Figura R32 y Tabla Anexo 5).

El estudio genético de la familia del paciente mostró que el hermano presentaba la secuencia silvestre de *ACOX2* en homocigosis, mientras que el padre era portador heterocigoto de c.456_459del (p.Thr154fs) y la madre portaba la variante c.673C>T (p.Arg225Trp) en heterocigosis (Figura R32). Su perfil plasmático de ABs era normal (Figura R32, Tabla Anexo 6), con valores de ABs maduros e intermediarios C₂₇ dentro de los rangos habituales.

5.1.1.4.- Caso 4

Se trataba de un varón de 7 años de edad con estenosis mitral moderada e insuficiencia aórtica moderada-severa, junto con un leve retraso del desarrollo e hipetransaminasemia intermitente (Tabla Anexo 7). Su

seguimiento fue realizado en la Unidad de Hepatología Pediátrica y Trasplante Hepático del Hospital Vall d'Hebron, donde se descartaron otras posibles causas de enfermedad hepática. La ecografía mostró una leve hiperecogenicidad hepática, mientras que en la biopsia de tejido hepático se observó una morfología hepatocitaria levemente poligonal, sin otras alteraciones destacables (Figura R33-G, H). Debido a la afectación multiorgánica, se realizó un estudio de secuenciación del exoma completo, el cual mostró la presencia en heterocigosis de las dos variantes de *ACOX2* descritas en el caso 3, a saber c.673C>T (p.Arg225Trp) y c.456_459del (p.Thr154fs) (Figura R32). El análisis del perfil de ABs en suero confirmó la alteración en *ACOX2* por la acumulación elevada de ABs C₂₇. Tras el diagnóstico de HADA, el paciente comenzó un tratamiento con UDCA que condujo a la normalización de los niveles de transaminasas (Tabla Anexo 7) y una reducción parcial de la proporción de los niveles de ABs C₂₇ plasmáticos (Figura R32).

El estudio genético de los familiares directos del paciente mostró que su padre era portador de la variante c.456_459del (p.Thr154fs) en heterocigosis, mientras que la madre era heterocigota para c.673C>T (p.Arg225Trp). Además, mediante el análisis del perfil sérico de ABs mostró que los niveles de ABs C₂₄ y C₂₇ se encontraban en ambos dentro de los rangos normales (Tabla Anexo 8).

5.1.1.5.- Caso 5

Esta paciente era una adolescente de 14 años cuyo caso fue seguido en el Hospital de los Valles (Quito, Ecuador). Presentaba historial clínico de 6 años de evolución de vasculitis en las extremidades, comunicación auricular y esplenomegalia con un volumen de 80 cm³. Además, se observó una hipertransaminasemia fluctuante que alcanzó valores de 500 UI/l para ALT y 2000 UI/l para AST, con valores de 2,3 mg/dl de bilirrubina total y 1,6 mg/dl de bilirrubina directa. En su historial no figuran sospechas de otras posibles causas de hepatopatías como hepatitis vírica. Mediante análisis exómico completo se determinó la ausencia de cualquier modificación genómica

destacable, salvo por la presencia de una variante poco frecuente y en homocigosis de *ACOX2*, c.1719G>A (p.Arg574Hys), que es muy similar a otra variante de *ACOX2* para la que se habría predicho una posible repercusión funcional (221). Los padres negaron consanguineidad, y los datos obtenidos en el exoma parecen corroborarlo. En los meses posteriores a la realización del análisis del exoma, la paciente desarrolló pancitopenia severa con fallo renal agudo con desenlace fatal. Una biopsia *post mortem* de brazo reveló un posible diagnóstico de poliarteritis nodosa. Debido a la imposibilidad de recibir en nuestro laboratorio una muestra de suero, no se pudo confirmar si la paciente presentaba niveles séricos elevados de ABs C₂₇. Aunque la presencia de la mutación p.Arg574Hys en *ACOX2* sugiere un posible diagnóstico de HADA, la presentación clínica tan agresiva apunta hacia la existencia de otras patologías concomitantes no diagnosticadas.

5.1.1.6.- Estudios de inmunohistoquímica

El acceso a biopsias de alguno de estos pacientes permitió evaluar la expresión de la proteína *ACOX2* en su tejido hepático. Mediante análisis por inmunohistoquímica pudimos comprobar que, a diferencia de las muestras de tejido obtenidas de pacientes con otras hepatopatías, como enfermedad de hígado graso metabólica (MAFLD) y cirrosis alcohólica, donde se observaba una expresión de *ACOX2* abundante en los hepatocitos y localizada principalmente en estructuras vesiculares (Figura R34-A, B), el hígado de los pacientes con HADA presentaba ausencia total de tinción para *ACOX2* (Figura R34-C a F). Como control positivo analizamos la expresión de *ACOX3*, otra acil-CoA oxidasa de la misma familia que también se expresa en los peroxisomas. En todos los pacientes diagnosticados de HADA detectamos la presencia de esta acil-CoA oxidasa (Figura R35) que sin embargo carece de capacidad para metabolizar ABs C₂₇ (213).

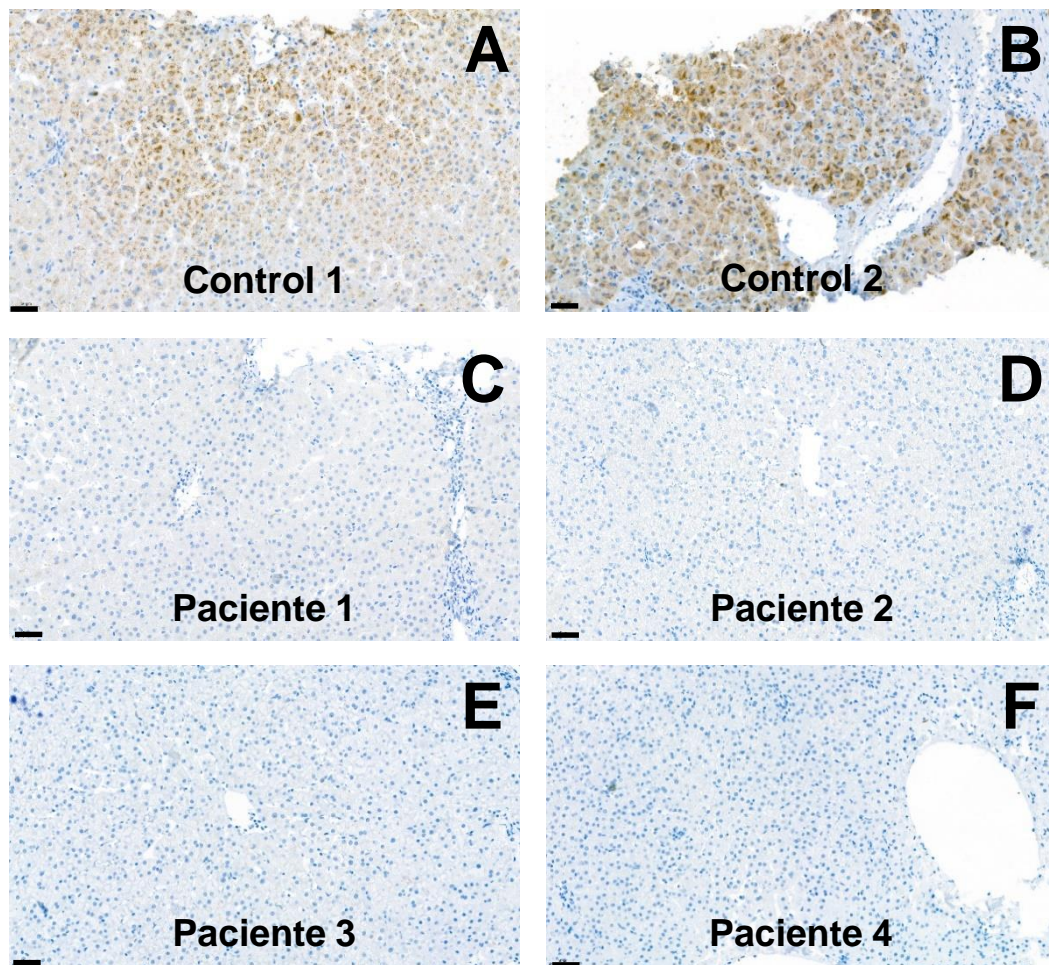


Figura R34.- Expresión de ACOX2 mediante análisis por inmunohistoquímica de biopsias hepáticas de pacientes con MAFLD F1 (A) y cirrosis alcohólica (B) utilizadas como control; y en biopsias hepáticas del paciente 1 (C), paciente 2 (D), paciente 3 (E) y paciente 4 (F) diagnosticados de hipertransaminasemia asociada a deficiencia de ACOX2 (HADA). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía óptica con un objetivo de 20x. La barra de escala indica 50 μm .

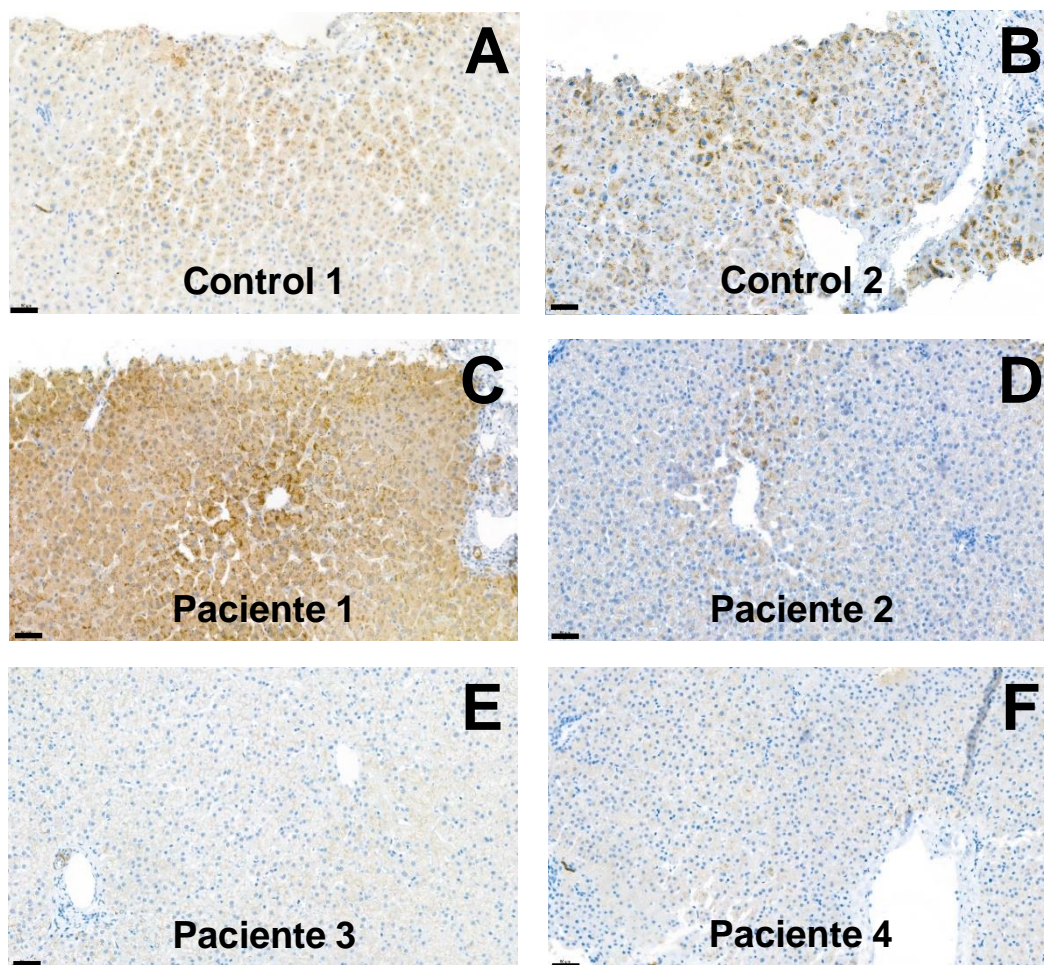


Figura R35.- Expresión de ACOX3 mediante análisis por inmunohistoquímica de biopsias hepáticas de pacientes con MAFLD F1 (A) y cirrosis alcohólica (B) utilizadas como control; y en biopsias hepáticas del paciente 1 (C), paciente 2 (D), paciente 3 (E) y paciente 4 (F) diagnosticados de hipertransaminasemia asociada a deficiencia de ACOX2 (HADA). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía óptica con un objetivo de 20x. La barra de escala indica 50 μ m.

5.1.2.- Papel del UDCA sobre la toxicidad mediada por el THCA

Dado que el UDCA ha resultado ser un tratamiento eficaz para la disminución de los niveles de transaminasas de los pacientes diagnosticados de HADA, nos planteamos estudiar su mecanismo de acción farmacológica frente al daño hepático inducido por la acumulación de ABs C₂₇ en esta patología.

Antes de abordar el estudio *in vitro* del efecto del UDCA sobre la toxicidad inducida por ABs C₂₇, decidimos investigar el mecanismo por el que uno de estos ABs, el THCA, penetra en las células hepáticas. Para ello, estudiamos la captación de THCA y otros ABs por células hepáticas HuH-7 en ausencia o presencia de TCA, un sustrato típico de distintos transportadores de

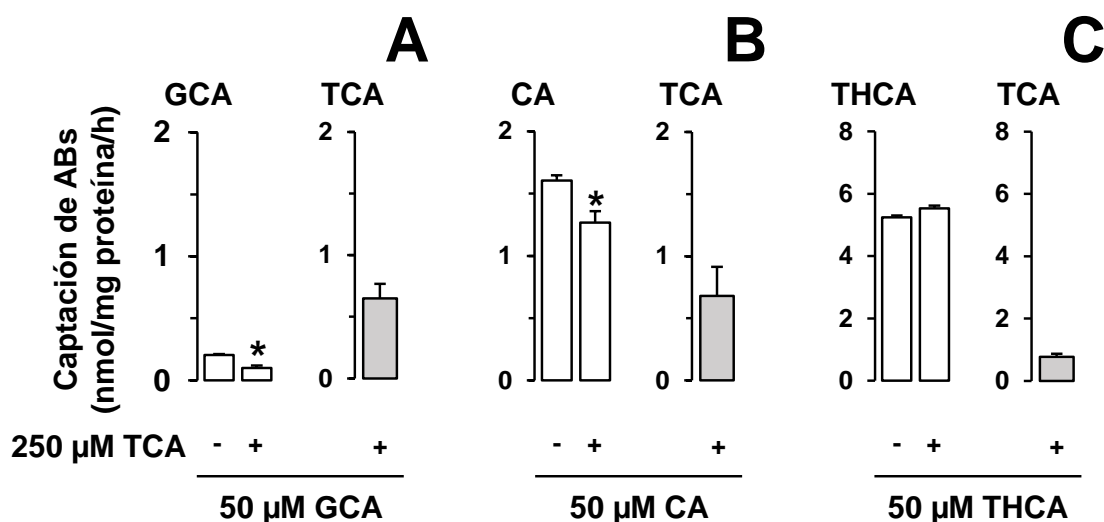


Figura R36.- Captación de ácido glicocólico (GCA) (A), cólico (CA) (B), trihidroxicolestanoico (THCA) (C) y taurocólico (TCA) por células HuH-7 silvestres. Las células se incubaron con GCA, CA o THCA 50 μ M, en presencia o ausencia de TCA 250 μ M durante 1 hora. La concentración de ácidos biliares (ABs) en los lisados celulares se determinó por HPLC-MS/MS. Los valores representan la media \pm SD de 8 determinaciones realizadas en cuatro cultivos diferentes. *, $p < 0,05$ comparando la captación en presencia y ausencia de TCA mediante el test de t de Student para valores apareados.

ABs (274,275). Como muestra la Figura R36, las células fueron capaces de captar tanto los ABs C_{24} GCA y CA como el THCA. Sin embargo, mientras que el transporte de GCA y CA era inhibido por el TCA, que también se captaba por las células HuH-7, la captación de THCA, que era mayor en comparación con la de los otros ABs, no se vio afectada por la presencia de TCA (Figura R36-C), lo que sugería que ésta no estaba mediada por los transportadores habituales de entrada de ABs en las células hepáticas. Para confirmar esta hipótesis, realizamos ensayos de captación análogos a los anteriores empleando sublíneas celulares derivadas de células CHO pero con expresión estable de los transportadores humanos NTCP, OATP1B1 y OATP1B3. La captación de CA, GCA y TCA se vio significativamente potenciada por la expresión de NTCP (Figura R37-A), mientras que en el caso de las células CHO-OATP1B1 (Figura R37-B) y CHO-OATP1B3 (Figura R37-C) el aumento en la captación de estos ABs fue muy moderado. En todas las líneas celulares empleadas se observó una captación sustancial de THCA, que sólo se incrementó ligeramente en las células con expresión de NTCP, aunque la presencia de TCA no consiguió inhibir la entrada de THCA en estas células.

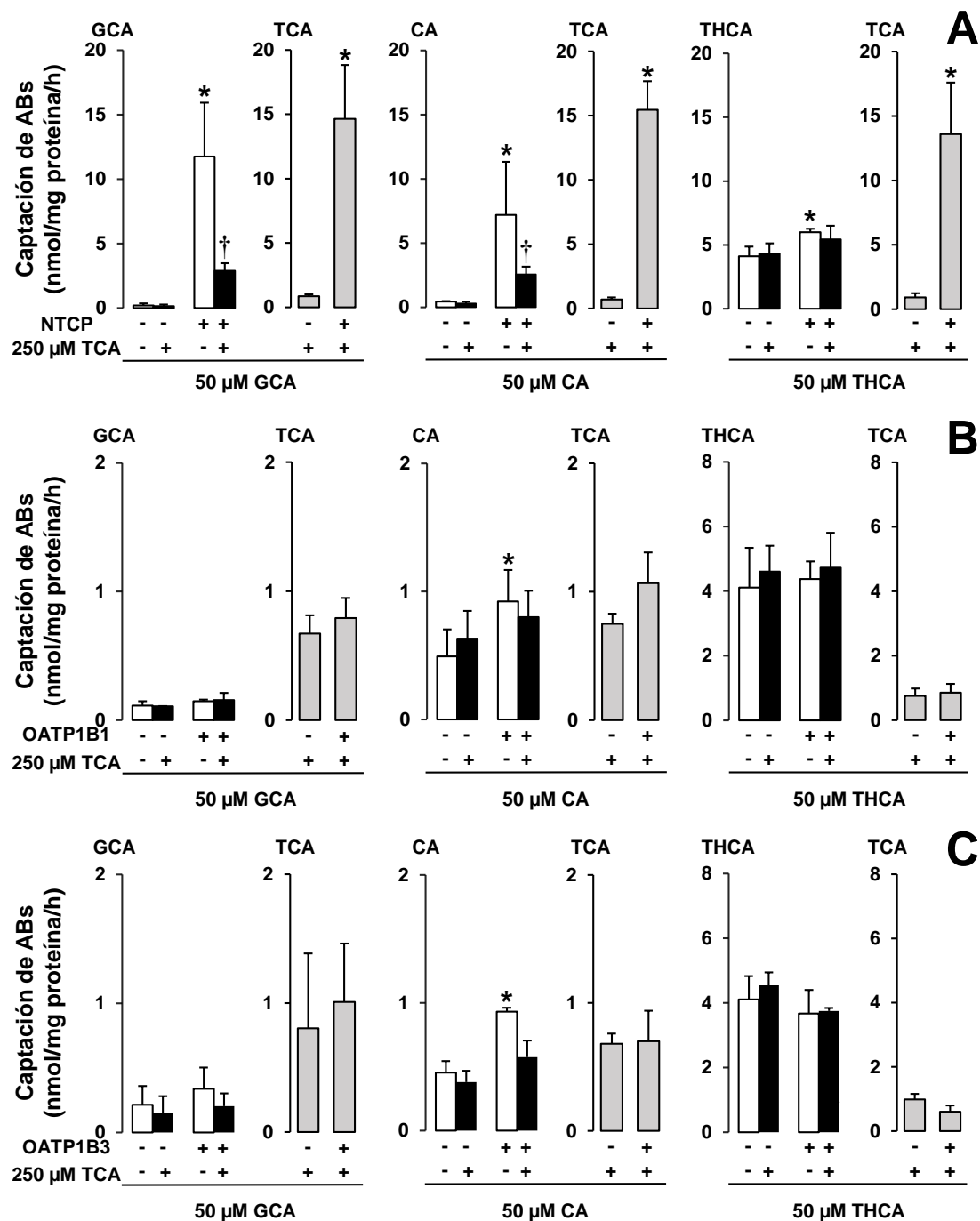


Figura R37.- Captación de ácido glicocólico (GCA), taurocólico (TCA), cólico (CA) y trihidroxicolestanoico (THCA) por células de ovario de hámster chino (CHO) silvestres o con expresión estable de NTCP (A), OATP1B1 (B) o OATP1B3 (C). Las células se incubaron con GCA, CA o THCA 50 μ M, en presencia o ausencia de TCA 250 μ M durante 1 hora. La concentración de ácidos biliares (ABs) en los lisados celulares se determinó por HPLC-MS/MS. Los valores representan la media \pm SD de 8 determinaciones realizadas en cuatro cultivos diferentes. *, $p < 0,05$ comparando las células con o sin expresión de transportadores mediante el test de t de Student para valores apareados; †, $p < 0,05$ comparando la captación en presencia y ausencia de TCA mediante el test de t de Student para valores apareados.

La generación de estrés oxidativo es uno de los mecanismos de toxicidad descritos para los intermediarios C_{27} de la biosíntesis de ABs (276). Puesto que el UDCA es un conocido antioxidante (277) decidimos estudiar su efecto sobre la producción de ROS mediada por THCA en la línea celular HuH-7, sensible a este compuesto (221). Los niveles de estrés oxidativo se incrementaron en estas células en presencia de THCA, un efecto que no disminuyó por la presencia en el medio de cultivo de UDCA (Figura R38). Asimismo, estudiamos el posible efecto protector del UDCA sobre la apoptosis inducida por THCA (276) en las células HuH-7 mediante el análisis de la expresión de ARNm de los marcadores de activación de la apoptosis *BAX α* y *BCL2*. El tratamiento con THCA provocó un aumento significativo de los niveles de ARNm de *BAX α* , el cual no se redujo en presencia de UDCA (Figura R39-A). Por otro lado, *BCL2* apenas se expresaba en estas células, por lo que los efectos del tratamiento sobre este factor apenas fueron perceptibles (Figura R39-B).

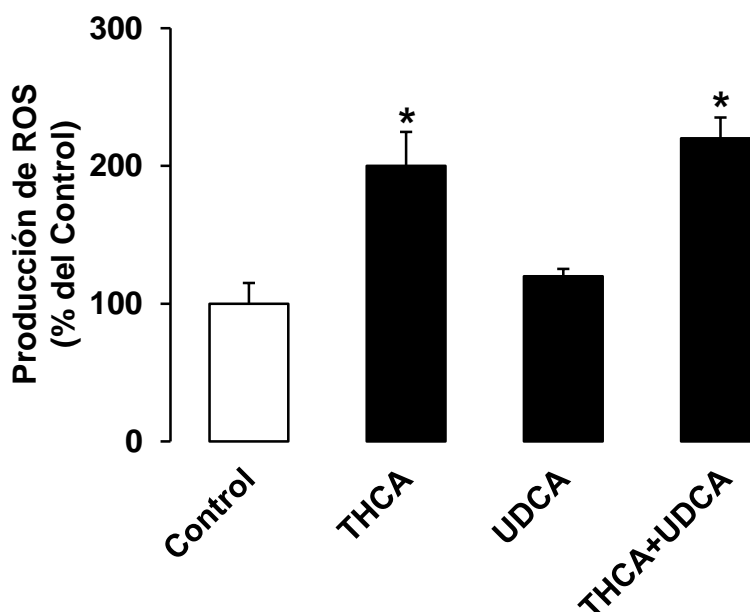


Figura R38.- Efecto del ácido ursodesoxicólico (UDCA) sobre el incremento del estrés oxidativo provocado por el ácido trihidroxicolestanoico (THCA) en células HuH-7. Las células se incubaron durante 16 h con 250 μ M de los distintos ABs. El incremento de la fluorescencia celular se determinó por citometría de flujo tras incubar las células con diclorodihidrofluoresceína diacetato. Los valores representan la media \pm SD de 6 determinaciones realizadas en tres cultivos diferentes. *, $p < 0,05$, comparado con el Control mediante el test de t de Student para valores apareados.

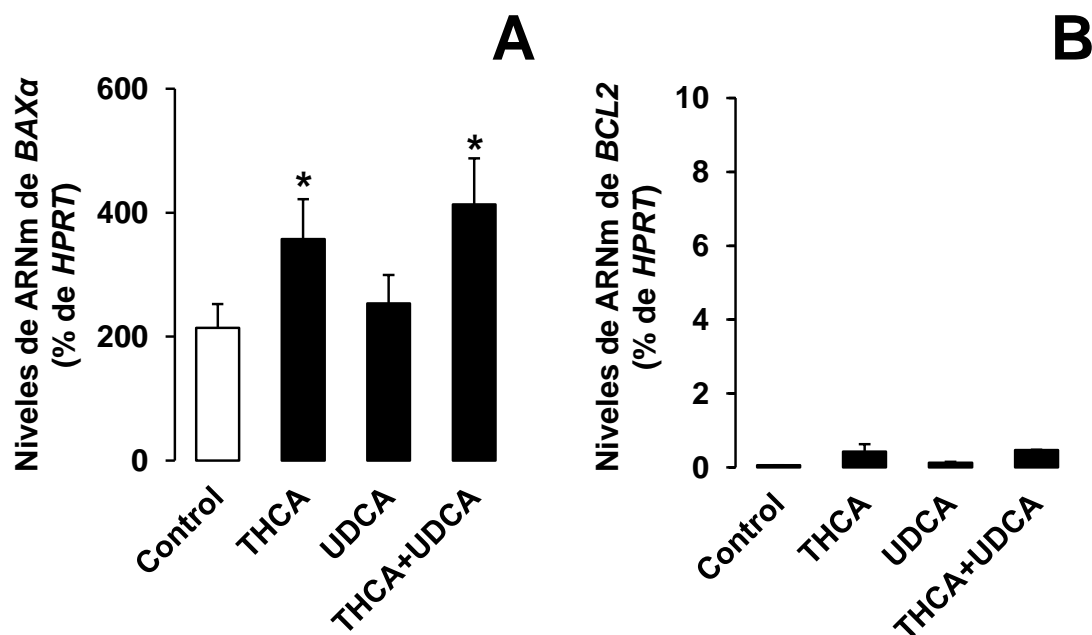


Figura R39.- Efecto del ácido ursodesoxicólico (UDCA) sobre el incremento de los niveles de ARNm de *BAXα* (A) y *BCL2* (B) provocado por el ácido trihidroxicolestanoico (THCA) en células HuH-7. Las células se incubaron durante 24 h con 250 μ M de los distintos ABs. Los valores representan la media \pm SD de 4 determinaciones realizadas en dos cultivos diferentes. *, $p < 0,05$, comparado con el Control mediante el test de t de Student para valores apareados.

Finalmente, decidimos evaluar si el UDCA tenía efecto sobre la disminución de la viabilidad celular provocada por el THCA. Para ello, empleamos poblaciones monoclonales de células HuH-7 con sobreexpresión de la variante silvestre (WT) o la variante p.Arg225Trp (V1) de ACOX2 generadas en estudios previos de nuestro grupo de investigación (221). La exposición de estas líneas celulares al THCA mostró que la sobreexpresión de ACOX2-WT protegía de la citotoxicidad provocada por este AB C₂₇, el cuál en las células con ACOX2-V1 provocaba una caída de la viabilidad similar a la que inducía en las células control (Mock). Nuevamente, la incubación con UDCA no tuvo efecto sobre la muerte celular inducida por el THCA (Figura R40).

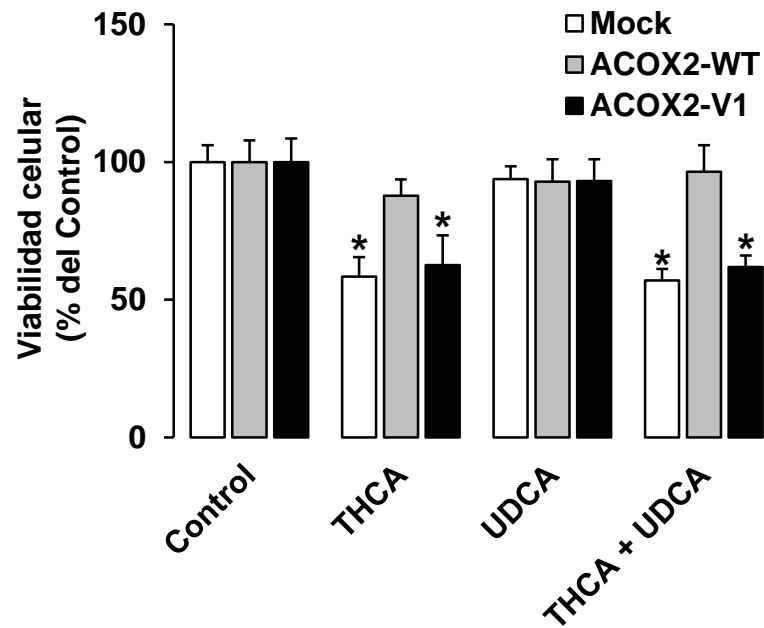


Figura R40.- Efecto del ácido ursodesoxicólico (UDCA) sobre la disminución de la viabilidad celular provocada por el ácido trihidroxicolestanoico (THCA) en células HuH-7 con sobreexpresión de ACOX2 silvestre (ACOX2-WT), la variante p.Arg225Trp de ACOX2 (ACOX2-V1) o transducidas con lentivirus control (Mock). Las células se incubaron con 250 μ M de los distintos ABs, y la viabilidad celular tras 72 h se determinó por el test MTT-formazán. Los valores representan la media \pm SD de 9 determinaciones realizadas en tres cultivos diferentes. *, $p < 0,05$, comparado con las células Mock sin tratar (Control Mock) mediante el test de t de Student para valores apareados.

5.2.- DISCUSIÓN

5.3.- ANEXO

Tabla Anexo 1.- Valores de bioquímica hepática del Paciente 1.

	Feb 2010	May 2010	Oct 2010	Abr 2011	Jun 2011	Abr 2012	Ene 2013	May 2013	Mar 2014	Jul 2015	Feb 2016	Jun 2016	Abr 2017	Sep 2017	Jul 2018	Ene 2019	Ago 2019	Ene 2020	May 2020	Ago 2020	Dic 2020
Incidencias	(a)	(b)	(b)	(b)	(b)	(b)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(c)	(d)	(b)	(b)	(b)	(e)	(e)	(e)
ALT (U/l)	234	553	125	2281	88	57	153	407	34	26	112	220	81	191	73	102	38	231	78	20	19
AST (U/l)	83	183	62	395	57	33	146	326	33	25	49	145	39	62	36	55	35	51	48	27	26
ALP (U/l)	146	162	133	166	73	78	79	78	111	85	92	84	73	83	87	58	64	72	69	56	99
GGT (U/l)	22	34	16	131	15	12	20	72	12	18	15	17	22	25	19	21	34	59	31	12	11
TBIL (mg/dl)	1,5	1,1	1,8	2,0	2,6	1,9	1,4	3,4	1,7	2,2	1,4	1,2	1,9	2,7	1,6	2,4	2,4	2,8	3,9	3,2	2,0
DBIL (mg/dl)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,8	0,8	1,2	0,9	0,7

(a), Torsión testicular y administración de antiinflamatorios no esteroideos.

(b), Tratamiento con prednisona y azatioprina.

(c), Tratamiento con budesonida y micofenolato de mofetilo.

(d), Tratamiento con budesonida y azatioprina.

(e), Tratamiento con ácido ursodesoxicólico (500 mg/12h; aprox.15 mg/kg/día).

Valores normales: alanina aminotransferasa (ALT) 2-40 U/l; Aspartato aminotransferasa (AST) 1-35 U/l; fosfatasa alcalina (ALP) 46-116 U/l; gamma glutamil transpeptidasa (GGT) 11-50 U/l; bilirrubina total (TBIL) 0.1-1.2 mg/dl; bilirrubina directa (DBIL) 0-0.3 mg/dl; ND, no determinado.

Tabla Anexo 2.- Especies moleculares de ácidos biliares en suero del Caso 1. Las muestras control fueron tomadas de 18 individuos sanos.

	Controles	Paciente 1 ^(a)	Padre	Madre	Hermano	Tía	Tío
Ácidos biliares C₂₄ endógenos (nM)	2290 ± 500	980	770	790	390	1030	610
Ácidos biliares C₂₇ endógenos (nM)	20 ± 3	1304	7	1860	2446	1	1334
Ácidos biliares C₂₇ (%)	0,87 ± 0,13	57,1	0,9	70,2	86,2	0,1	68,6
Especies moleculares de ácidos biliares C₂₄ (nM)							
Glicocólico	117 ± 40	43	31	39	56	188	66
Glicohenodesoxicólico	421 ± 90	256	119	171	139	171	201
Glicodesoxicólico	180 ± 44	27	58	69	35	96	2
Glicolitocólico	9 ± 2	4	5	3	4	1	<1
Glicoursodesoxicólico	51 ± 17	5287*	14	109	41	30	6
Taurocólico	18 ± 7	1	9	10	6	18	5
Tauroquenodesoxicólico	53 ± 11	14	22	45	24	21	22
Taurodesoxicólico	23 ± 6	3	9	18	7	13	1
Taurolitocólico	1 ± 1	<1	1	1	<1	<1	<1
Tauroursodesoxicólico	2 ± 1	97*	<1	11	2	<1	<1
Taurosulfolitocólico	103 ± 15	3	17	25	20	17	4
Cólico	403 ± 92	122	144	14	11	422	276
Quenodesoxicólico	330 ± 180	445	88	98	15	10	14
Desoxicólico	417 ± 124	59	231	98	20	37	4
Litocólico	93 ± 27	1	18	4	2	1	1
Ursodesoxicólico	65 ± 21	6737*	12	71	11	4	2
Especies moleculares de ácidos biliares C₂₇ (nM)							
Glicotrihidroxicolestanoico	<1	118	<1	61	91	<1	156
Glicodihidroxicolestanoico	<1	15	<1	20	26	<1	39
Taurotrihidroxicolestanoico	16 ± 3	706	6	1238	1841	<1	902
Taurodihidroxicolestanoico	<1	87	<1	328	289	<1	204
Trihidroxicolestanoico	4 ± 1	379	1	214	199	1	32

(a), Tras 5 meses de tratamiento con ácido ursodesoxicólico (UDCA).

Las especies moleculares de la familia del UDCA se marcan con un asterisco cuando el paciente estaba siendo tratado con UDCA (15 mg/kg/ día)

Tabla Anexo 3.- Valores de bioquímica hepática del Paciente 2.

	Nov 2004	Abr 2005	Jul 2007	Jul 2009	Jun 2010	Ago 2011	Abr 2012	Dic 2013	Feb 2015	Feb 2016	Feb 2017	Feb 2019	Ago 2020	Mar 2021	Ago 2021	Sep 2021	Ene 2022
Incidencias														(a)	(a)	(a)	(a)
ALT (U/l)	451	205	382	136	330	91	121	131	159	153	162	146	346	220	9	9	27
AST (U/l)	262	114	167	81	208	61	80	72	55	71	60	48	74	59	12	13	21
ALP (U/l)	311	282	278	253	291	ND	257	416	358	381	333	261	ND	146	124	124	115
GGT (U/l)	9	7	10	10	10	8	8	10	14	10	17	13	23	17	13	11	12
TBIL (mg/dl)	0,4	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4	ND	ND	0,5	ND	0,6	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4
DBIL (mg/dl)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,2	0,1	0,1	0,1

(a), Tratamiento con ácido ursodesoxicólico (500 mg/12h; aprox.15 mg/kg/día).

Valores normales: alanina aminotransferasa (ALT) 2-40 U/l; Aspartato aminotransferasa (AST) 1-35 U/l; fosfatasa alcalina (ALP) 46-116 U/l; gamma glutamil transpeptidasa (GGT) 11-50 U/l; bilirrubina total (TBIL) 0.1-1.2 mg/dl; bilirrubina directa (DBIL) 0-0.3 mg/dl; ND, no determinado.

Tabla Anexo 4.- Especies moleculares de ácidos biliares en suero del Caso 2. Las muestras control fueron tomadas de 18 individuos sanos.

	Controles	Paciente 2	Padre	Madre	Hermano
Ácidos biliares C₂₄ endógenos (nM)	2290 ± 500	620	22880	2400	4900
Ácidos biliares C₂₇ endógenos (nM)	20 ± 3	791	383	2	1
Ácidos biliares C₂₇ (%)	0,87 ± 0,13	56,06	1,65	0,08	0,02
Especies moleculares de ácidos biliares C₂₄ (nM)					
Glicocólico	117 ± 40	18	6600	185	989
Glicohenodesoxicólico	421 ± 90	40	5358	164	1930
Glicodesoxicólico	180 ± 44	11	5017	89	209
Glicolitocólico	9 ± 2	2	40	2	3
Glicoursodesoxicólico	51 ± 17	16	247	27	176
Taurocólico	18 ± 7	<1	1226	75	158
Tauroquenodesoxicólico	53 ± 11	4	865	60	337
Taurodesoxicólico	23 ± 6	1	942	27	28
Taurolitocólico	1 ± 1	<1	6	<1	1
Tauroursodesoxicólico	2 ± 1	<1	18	<1	5
Taurosulfolitocólico	103 ± 15	8	65	99	19
Cólico	403 ± 92	504	355	1158	565
Quenodesoxicólico	330 ± 180	6	327	153	158
Desoxicólico	417 ± 124	7	1659	363	231
Litocólico	93 ± 27	1	15	10	3
Ursodesoxicólico	65 ± 21	3	136	<1	83
Especies moleculares de ácidos biliares C₂₇ (nM)					
Glicotrihidroxicolestanoico	<1	38	34	<1	<1
Glicodihidroxicolestanoico	<1	19	4	<1	<1
Taurotrihidroxicolestanoico	16 ± 3	553	332	<1	<1
Taurodihidroxicolestanoico	<1	164	7	<1	<1
Trihidroxicolestanoico	4 ± 1	17	5	2	1

Tabla Anexo 5.- Valores de bioquímica hepática del Paciente 3.

	2017	2018	2018	2018	2019	2020	2021	2021
	2017	2018	2018	2018	2019	2020	2021	2021
	2017	2018	2018	2018	2019	2020	2021	2021
Incidencias			(a)	(a)	(a)	(a)	(b)	(b)
ALT (U/l)	196	592	16	23	23	23	15	12
AST (U/l)	108	338	32	35	35	41	28	25
ALP (U/l)	382	411	390	540	540	348	339	203
GGT (U/l)	13	19	12	12	12	12	15	13
TBIL (mg/dl)	0,47	0,54	0,41	0,46	0,46	0,96	0,76	0,60
DBIL (mg/dl)	0,22	0,24	0,21	0,20	0,20	0,18	0,15	0,14

(a), Tratamiento con ácido ursodesoxicólico (75 mg/12h; aprox. 3 mg/kg/día).

(b), Tratamiento con ácido ursodesoxicólico (300 mg/12h; aprox. 12 mg/kg/día).

Valores normales: alanina aminotransferasa (ALT) 2-40 U/l; Aspartato aminotransferasa (AST) 1-35 U/l; fosfatasa alcalina (ALP) 46-116 U/l; gamma glutamil transpeptidasa (GGT) 11-50 U/l; bilirrubina total (TBIL) 0,1-1,2 mg/dl; bilirrubina directa (DBIL) 0-0,3 mg/dl; ND, no determinado.

Tabla Anexo 6.- Especies moleculares de ácidos biliares en suero del Caso 3. Las muestras control fueron tomadas de 18 individuos sanos.

	Controles	Paciente 3 ^(a)	Padre	Madre	Hermano
Ácidos biliares C₂₄ endógenos (nM)	2290 ± 500	960	1690	2060	1980
Ácidos biliares C₂₇ endógenos (nM)	20 ± 3	2315	31	19	31
Ácidos biliares C₂₇ (%)	0,87 ± 0,13	70,69	1,80	0,91	1,54
Especies moleculares de ácidos biliares C₂₄ (nM)					
Glicocólico	117 ± 40	163	167	141	129
Glicouenodesoxicólico	421 ± 90	461	607	432	377
Glicodesoxicólico	180 ± 44	5	75	236	192
Glicolitocólico	9 ± 2	1	3	8	6
Glicoursodesoxicólico	51 ± 17	9949*	44	32	27
Taurocólico	18 ± 7	1	43	14	11
Tauroquenodesoxicólico	53 ± 11	44	161	29	29
Taurodesoxicólico	23 ± 6	2	21	19	17
Taurolitocólico	1 ± 1	<1	1	1	2
Tauroursodesoxicólico	2 ± 1	235*	2	1	1
Taurosulfolitocólico	103 ± 15	31	68	125	112
Cólico	403 ± 92	93	319	429	332
Quenodesoxicólico	330 ± 180	140	105	96	280
Desoxicólico	417 ± 124	8	56	459	437
Litocólico	93 ± 27	1	8	26	23
Ursodesoxicólico	65 ± 21	3197*	6	9	6
Especies moleculares de ácidos biliares C₂₇ (nM)					
Glicotrihidroxicolestanoico	<1	290	<1	<1	<1
Glicodihidroxicolestanoico	<1	30	<1	<1	<1
Taurotrihidroxicolestanoico	16 ± 3	1575	29	16	14
Taurodihidroxicolestanoico	<1	333	<1	2	16
Trihidroxicolestanoico	4 ± 1	87	2	1	1

(a), El paciente fue tratado con ácido ursodesoxicólico (UDCA), 3 mg/kg/día, durante 3 años; y posteriormente 5 meses con 12 mg/kg/día. Las especies moleculares de la familia del UDCA se marcan con un asterisco cuando el paciente estaba siendo tratado con UDCA (12 mg/kg/ día)

Tabla Anexo 7.- Valores de bioquímica hepática del Paciente 4.

	Mar 2017	Oct 2017	May 2018	Nov 2018	Ene 2019	May 2019	Sep 2019	Nov 2019	Jul 2020	Feb 2021	May 2021	Nov 2021
Incidencias										(a)	(a)	(a)
ALT (U/l)	109	233	107	81	48	244	51	102	46	14	22	15
AST (U/l)	72	191	57	77	ND	211	39	43	46	37	58	ND
ALP (U/l)	236	239	216	222	222	263	228	ND	211	260	249	ND
GGT (U/l)	15	12	13	11	13	12	13	ND	10	13	11	10
TBIL (mg/dl)	0,39	0,39	0,28	0,39	ND	0,24	0,42	ND	0,42	0,39	0,63	0,38
DBIL (mg/dl)	0,19	0,2	0,17	0,2	ND	0,18	0,2	ND	0,07	0,08	0,11	ND

(a), Tratamiento con ácido ursodesoxicólico (150 mg/12h; aprox.12 mg/kg/día).

Valores normales: alanina aminotransferasa (ALT) 2-40 U/l; Aspartato aminotransferasa (AST) 1-35 U/l; fosfatasa alcalina (ALP) 46-116 U/l; gamma glutamil transpeptidasa (GGT) 11-50 U/l; bilirrubina total (TBIL) 0.1-1.2 mg/dl; bilirrubina directa (DBIL) 0-0.3 mg/dl; ND, no determinado.

Tabla Anexo 8.- Especies moleculares de ácidos biliares en suero del Caso 4. Las muestras control fueron tomadas de 18 individuos sanos.

	Controles	Paciente 4	Padre	Madre
Ácidos biliares C₂₄ endógenos (nM)	2290 ± 500	703	1950	2330
Ácidos biliares C₂₇ endógenos (nM)	20 ± 3	3245	21	31
Ácidos biliares C₂₇ (%)	0,87 ± 0,13	82,19	1,06	1,31
Especies moleculares de ácidos biliares C₂₄ (nM)				
Glicocólico	117 ± 40	102	220	226
Glicochenodesoxicólico	421 ± 90	284	453	588
Glicodesoxicólico	180 ± 44	101	109	611
Glicolitocólico	9 ± 2	1	2	7
Glicoursodesoxicólico	51 ± 17	107	53	80
Taurocólico	18 ± 7	14	8	27
Tauroquenodesoxicólico	53 ± 11	57	41	84
Taurodesoxicólico	23 ± 6	26	8	100
Taurolitocólico	1 ± 1	<1	<1	1
Tauroursodesoxicólico	2 ± 1	7	2	4
Taurosulfolitocólico	103 ± 15	14	12	39
Cólico	403 ± 92	6	564	90
Quenodesoxicólico	330 ± 180	41	309	46
Desoxicólico	417 ± 124	45	123	386
Litocólico	93 ± 27	9	6	17
Ursodesoxicólico	65 ± 21	23	39	25
Especies moleculares de ácidos biliares C₂₇ (nM)				
Glicotrihidroxicolestanoico	<1	153	<1	<1
Glicodihidroxicolestanoico	<1	18	<1	<1
Taurotrihidroxicolestanoico	16 ± 3	2125	20	27
Taurodihidroxicolestanoico	<1	936	<1	2
Trihidroxicolestanoico	4 ± 1	14	2	2

CAPÍTULO III:

DESARROLLO DE MODELOS

***IN VIVO* DE HADA Y**

ESTUDIOS DE TOXICIDAD

INDUCIDA POR FÁRMACOS

6.1.- RESULTADOS

6.2.- DISCUSIÓN

7.- CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA:

En un estudio multicéntrico, llevado a cabo en 12 hospitales, en los que se han reclutado 33 pacientes con elevación idiopática de transaminasas y 13 de sus familiares directos, hemos detectado 7 nuevos casos del cuadro que denominamos HADA (hipertransaminasemia asociada a deficiencia de ACOX2). Los pacientes con HADA presentan acumulación plasmática de intermediarios C₂₇ de la biosíntesis de los ABs, que predominan sobre las especies moleculares de ABs maduros C₂₄. La clínica de esta condición patológica es muy heterogénea, habiéndose encontrado desde pacientes asintomáticos hasta alteraciones gastrointestinales, cardíacas y posible daño hepático inducido por fármacos.

CONCLUSIÓN SEGUNDA:

En los pacientes con HADA, la presencia de la variante p.Arg225Trp de ACOX2 en homocigosis, o en heterocigosis combinada con la variante p.Thr154fs, se asocia con una marcada disminución de la expresión de ACOX2 en tejido hepático. Sin embargo, la mutación p.Arg574Hys no altera la capacidad metabólica de ACOX2, por lo que es probable que su presencia no cause HADA.

CONCLUSIÓN TERCERA:

El tratamiento con UDCA de los pacientes con HADA consigue normalizar sus niveles plasmáticos de transaminasas. El efecto beneficioso del UDCA no se debe a una acción antioxidante ni antiapoptótica directa sobre los hepatocitos, ni a la inhibición de la biosíntesis endógena de intermediarios C₂₇ por parte de las células hepáticas.

CONCLUSIÓN CUARTA:

En varias hepatopatías frecuentes de tipo inflamatorio existe una correlación inversa entre los niveles hepáticos de ARNm de *OSM* y de los genes codificantes para las enzimas *ACOX2* y *BAAT*, pero no de *CYP7A1*. Las variaciones en la expresión de *ACOX2* o *BAAT* no se relacionan con los cambios en la expresión de *CYP7A1*, lo que sugiere la existencia de una

CONCLUSIONES

regulación diferencial *in vivo* entre estas enzimas implicadas en la biosíntesis de ABs.

CONCLUSIÓN QUINTA:

Los estudios realizados *in vitro* revelan la existencia de interconexiones en la regulación de la expresión de estas enzimas. Así, en células hepáticas en cultivo, la OSM reprime la expresión de *ACOX2* y *BAAT*. Además, el factor de transcripción hepático HNF4 α , que promueve la actividad transcripcional del promotor de *CYP7A1*, también parece estar implicado en la regulación de la expresión de *ACOX2* y *BAAT*. Mientras que el mediador FGF19, que juega un papel clave en la regulación de la tasa de síntesis de los ABs a través de su acción represora de *CYP7A1*, también inhibe la expresión y actividad de *ACOX2*, pero no la de *BAAT*.

CONCLUSIÓN SEXTA:

Mediante tecnología CRISPR/Cas9 se han desarrollado modelos animales de déficit de *Acox2*. Los ratones homocigotos para la mutación p.Arg225Trp *Acox2* y los *knock-out* para *Acox2* carecen de expresión de *Acox2* en hígado y acumulan ABs C₂₇ en plasma, hígado y bilis aunque, a diferencia de lo que ocurre en los pacientes con HADA, los ABs C₂₄ siguen predominando sobre los precursores C₂₇, lo que indica que la función de acortamiento de la cadena lateral en los peroxisomas a través de *ACOX2* es cuantitativamente más relevante en humanos que en ratones.

CONCLUSIÓN SÉPTIMA:

Los ratones con déficit de *Acox2* no presentan alteraciones en la bioquímica ni en la histología hepáticas en condiciones basales, ni tampoco un mayor daño hepático inducido por fármacos, en comparación con los animales silvestres, lo que puede deberse a que los niveles de intermediarios C₂₇ no son lo suficientemente elevados en este modelo como para causar un aumento de la vulnerabilidad hepática frente a diferentes noxas. Además, el *pool* de ABs C₂₄ se encuentra a niveles elevados, próximos a los normales, y en el ratón contiene especies muy hidrofílicas que podrían ejercer una acción hepatoprotectora.

8.- BIBLIOGRAFÍA

1. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and Development of the Liver. Vol. 18, *Developmental Cell*. 2010. p. 175–89.
2. Roa I, Meruane M. Desarrollo del aparato digestivo. *Int J Morphol*. 2012;30(4):1285–94.
3. Lauth WW, Greenway C V. Conceptual review of the hepatic vascular bed. *Hepatology*. 1987;7(5):952–63.
4. Meier PJ. Transport Polarity of Hepatocytes. *Semin Liver Dis*. 1988;8(4).
5. Banales JM, Prieto J, Medina JF. Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion. *World J Gastroenterol*. 2006;12(22):3496–511.
6. Alvaro D, Mancino MG, Glaser S, Gaudio E, Marzioni M, Francis H, et al. Proliferating Cholangiocytes : A Neuroendocrine Compartment in the Diseased Liver. *Gastroenterology*. 2007;132:415–31.
7. Juza RM, Pauli EM. Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians. *Clin Anat*. 2014;27:764–9.
8. Hall JE. Guyton y Hall. *Tratado de Fisiología Médica*. 12ª edic. Saunders E, editor. 2016.
9. Hofmann AF, Hagey LR. Bile acids: Chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(16):2461–83.
10. Sharma V, Hiller M. Loss of enzymes in the bile acid synthesis pathway explains differences in bile composition among mammals. *Genome Biol Evol*. 2018;10(12):3211–7.
11. Monte MJ, Marin JJG, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*. 2009;15(7):804–16.
12. Dawson PA. Bile Formation and the Enterohepatic Circulation. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 6ª edic. Elsevier Inc.; 2018. p. 931–56.
13. Hofmann AF, Roda A. Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *J Lipid Res*. 1984;25:1477–89.
14. Erlinger S, Dhumeaux D, Berthelot P, Dumont M. Effect of inhibitors of sodium transport on bile formation in the rabbit. *Am J Physiol*. 1970;219(2):416–22.
15. Hernell O, Staggers JE, Carey MC. Physical-Chemical Behavior of Dietary and Biliary Lipids during Intestinal Digestion and Absorption. 2. Phase Analysis and

- Aggregation States of Luminal Lipids during Duodenal Fat Digestion in Healthy Adult Human Beings. *Biochemistry*. 1990;29(8):2041–56.
16. Setchell KDR, Heubi JE, Shah S, Lavine JE, Suskind D, Al-Edreesi M, et al. Genetic defects in bile acid conjugation cause fat-soluble vitamin deficiency. *Gastroenterology*. 2013;144(5):945–55.
 17. Del Castillo-Olivares A, Campos JA, Pandak WM, Gil G. The role of α 1-fetoprotein transcription factor/LRH-1 in bile acid biosynthesis: A known nuclear receptor activator that can act as a suppressor of bile acid biosynthesis. *J Biol Chem*. 2004;279(16):16813–21.
 18. Marin JJG, Barbero ER, Herrera MC, Tabernero A, Monte MJ. Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver. *Hepatology*. 1993;18(5):1182–92.
 19. Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, et al. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest*. 1999;103(1):137–45.
 20. Fakheri RJ, Javitt NB. 27-Hydroxycholesterol, does it exist? On the nomenclature and stereochemistry of 26-hydroxylated sterols. *Steroids*. 2012;77(6):575–7.
 21. Perreault M, Bialek A, Trottier J, Verreault M, Caron P, Milkiewicz P, et al. Role of glucuronidation for hepatic detoxification and urinary elimination of toxic bile acids during biliary obstruction. *PLoS One*. 2013;8(11):1–9.
 22. Alnouti Y. Bile acid sulfation: A pathway of bile acid elimination and detoxification. *Toxicol Sci*. 2009;108(2):225–46.
 23. Ren S, Hylemoq PB, Marques D, Gurley E, Bodhan P, Hall E, et al. Overexpression of Cholesterol Transporter StAR in the Rat and Mouse. *Liver Biol Pathobiol*. 2004;40:910-.
 24. Pandak WM, Kakiyama G. The acidic pathway of bile acid synthesis: Not just an alternative pathway. *Liver Res*. 2019;3(2):88–98.
 25. Nakagawa M, Setchell KDR. Bile acid metabolism in early life: studies of amniotic fluid. *J Lipid Res*. 1990;31:1089–98.
 26. Furster C, Wikvall K. Identification of CYP3A4 as the major enzyme responsible for 25-hydroxylation of 5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α -triol in human liver microsomes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 1999;1437(1):46–52.
 27. Cheng FW, Shefer S, Dayal B, Tint

- GS, Setoguchi T, Salen G, et al. Cholic acid biosynthesis: conversion of 5 β cholestane 3 α ,7 α ,12 α ,25 tetrol into 5 β cholestane 3 α ,7 α ,12 α ,24 β ,25 pentol by human and rat liver microsomes. *J Lipid Res.* 1977;18(1):6–13.
28. Shefer S, Cheng FW, Dayal B, Hauser S, Tint GS, Salen G, et al. A 25-Hydroxylation Pathway of Cholic Acid Biosynthesis in Man and Rat. *J Clin Invest.* 1976;57(April):897–903.
29. Salen G, Shefer S, Cheng FW, Dayal B, Batta AK, Tint GS. Cholic acid biosynthesis. The enzymatic defect in cererotendinous xanthomatosis. *J Clin Invest.* 1979;63(1):38–44.
30. Hofmann AF. The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. *Front Biosci.* 2009;14:2584–98.
31. Stieger B, Meier Y, Meier PJ. The bile salt export pump. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2007;453(5):611–20.
32. Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H, et al. Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2001;1511(1):7–16.
33. García Blazquez AM. Papel de los transportadores de las familias OATP y ABC en la vía de excreción de aniones orgánicos colefílicos fetales constituida por el binomio placenta-hígado materno. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca; 2009.
34. Gurantz D, Schteingart CD, Hagey LR, Steinbach J, Grotmol T, Hofmann A. Hypercholerisis induced by unconjugated bile acid infusion correlates with recovery in bile of unconjugated bile acids. *Hepatology.* 1991;13(3):540–50.
35. Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, Lesage G. Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J Gastroenterol.* 2006;12(22):3553–63.
36. Hofmann AF. Pharmacology of ursodeoxycholic acid, an enterohepatic drug. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1994;29(204):1–15.
37. Hofmann AF, Zakko SF, Lira M, Clerici C, Hagey LR, Lambert KK, et al. Novel biotransformation and physiological properties of norursodeoxycholic acid in humans. *Hepatology.* 2005;42(6):1391–8.
38. Aldini R, Montagnani M, Roda A, Hrelia S, Biagi PL, Roda E. Intestinal absorption of bile acids in the rabbit: Different transport

- rates in jejunum and ileum. *Gastroenterology*. 1996;110(2):459–68.
39. Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, et al. Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium- dependent bile acid transporter. *Am J Physiol*. 1998;274(1):157–69.
40. Nakahara M, Furuya N, Takagaki K, Sugaya T, Hirota K, Fukamizu A, et al. Ileal bile acid-binding protein, functionally associated with the farnesoid X receptor or the ileal bile acid transporter, regulates bile acid activity in the small intestine. *J Biol Chem*. 2005;280(51):42283–9.
41. Dawson PA, Hubbert M, Haywood J, Craddock AL, Zerangue N, Christian W V., et al. The heteromeric organic solute transporter α - β , Ost α -Ost β , is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem*. 2005;280(8):6960–8.
42. Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann AF, et al. Vectorial transport of unconjugated and conjugated bile salts by monolayers of LLC-PK1 cells doubly transfected with human NTCP and BSEP or with rat Ntcp and Bsep. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(3):550–6.
43. Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: Phylogenetic classification as OATP/SLCO super-family, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2004;447(5):653–65.
44. Hofmann AF. Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile acid: relevance to drug hepatotoxicity. *Drug Metab Rev*. 2004;36:703–22.
45. Luo L, Aubrecht J, Li D, Warner RL, Johnson KJ, Kenny J, et al. Assessment of serum bile acid profiles as biomarkers of liver injury and liver disease in humans. *PLoS One*. 2018;13(3):e1-17.
46. Wahlström A, Sayin SI, Marschall HU, Bäckhed F. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metab*. 2016;24(1):41–50.
47. Hylemon PB, Harder J. Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*. 1999;22:475–88.
48. Ridlon JM, Bajaj JS. The human gut sterolbiome: Bile acid-microbiome endocrine aspects and therapeutics. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(2):99–105.

49. Beuers U, Fischer S, Spengler U, Paumgartner G. Formation of iso-ursodeoxycholic acid during administration of ursodeoxycholic acid in man. *J Hepatol.* 1991;13(1):97–103.
50. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS. Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol.* 2015;30(3):332–8.
51. Weikum ER, Liu X, Ortlund EA. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci.* 2018;27(11):1876–92.
52. Zhang Y, Kast-Woelbern HR, Edwards PA. Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J Biol Chem.* 2003;278(1):104–10.
53. Vaquero J, Monte MJ, Dominguez M, Muntané J, Marin JGG. Differential activation of the human farnesoid X receptor depends on the pattern of expressed isoforms and the bile acid pool composition. *Biochem Pharmacol.* 2013;86(7):926–39.
54. Claudel T, Sturm E, Duez H, Torra IP, Sirvent A, Kosykh V, et al. Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest.* 2002;109(7):961–71.
55. Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell.* 1999;3(5):543–53.
56. Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall HU, Bamberg K, et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* 2013;17:225–35.
57. Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, et al. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(6):3369–74.
58. Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, et al. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science (80-).* 2002;296(5571):1313–6.
59. Beilke LD, Aleksunes LM, Holland RD, Besselsen DG, Beger RD, Klaassen CD, et al. Constitutive Androstane Receptor-Mediated Changes in Bile Acid Composition Contributes to Hepatoprotection from Lithocholic Acid-Induced Liver Injury in Mice. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(5):1035–45.
60. Stroup D, Crestani M, Chiang JYL. Orphan receptors chicken ovalbumin upstream promoter

- transcription Factor II (COUP-TFII) and retinoid X receptor (RXR) activate and bind the rat cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A). *J Biol Chem.* 1997;272(15):9833–9.
61. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 1997;272(6):3137–40.
 62. Chiang JYL, Kimmel R, Stroup D. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR α). *Gene.* 2001;262(1–2):257–65.
 63. Crestani M, Sadeghpour A, Stroup D, Galli G, Chiang JYL. Transcriptional activation of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A) by nuclear hormone receptors. *J Lipid Res.* 1998;39(11):2192–200.
 64. Nitta M, Ku S, Brown C, Okamoto AY, Shan B. CPF: An orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(12):6660–5.
 65. Shin DJ, Campos JA, Gil G, Osborne TF. PGC-1 α Activates CYP7A1 and Bile Acid Biosynthesis. *J Biol Chem* [Internet]. 2003;278(50):50047–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M309736200>
 66. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell.* 2000;6(3):507–15.
 67. Zhang M, Chiang JYL. Transcriptional regulation of the human sterol 12 α -hydroxylase gene (CYP8B1): Roles of hepatocyte nuclear factor 4 α in mediating bile acid repression. *J Biol Chem.* 2001;276(45):41690–9.
 68. Song KH, Li T, Owsley E, Strom S, Chiang JYL. Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression. *Hepatology.* 2009;49(1):297–305.
 69. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* 2005;2(4):217–25.
 70. de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Ahn H, Hagey LR, Romanoski E, Lee RG, et al. MAFG is a transcriptional repressor of bile acid synthesis and metabolism.

- Cell Metab. 2015;21(2):298–310.
71. Jung D, Mangelsdorf DJ, Meyer UA. Pregnane X Receptor Is a Target of Farnesoid X Receptor. *J Biol Chem.* 2006;281(28):19081–91.
 72. Li T, Chiang JYL. Mechanism of rifampicin and pregnane X receptor inhibition of human cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288(1 51-1):74–84.
 73. Han S, Chiang JYL. Mechanism of vitamin D receptor inhibition of cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(3):469–78.
 74. Han S, Li T, Ellis E, Strom S, Chiang JYL. A novel bile acid-activated vitamin D receptor signaling in human hepatocytes. *Mol Endocrinol.* 2010;24(6):1151–64.
 75. Wistuba W, Gnewuch C, Liebisch G, Schmitz G, Langmann T, Wistuba W, et al. Lithocholic acid induction of the FGF19 promoter in intestinal cells is mediated by PXR. *World J Gastroenterol.* 2007;13(31):4230–5.
 76. Schmidt DR, Holmstrom SR, Tacer KF, Bookout AL, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. Regulation of Bile Acid Synthesis by Fat-soluble Vitamins A and D. *J Biol Chem.* 2010;285(19):14486–94.
 77. Chow ECY, Magomedova L, Quach HP, Patel R, Durk MR, Fan J, et al. Vitamin D receptor activation down-regulates the small heterodimer partner and increases CYP7A1 to lower cholesterol. *Gastroenterology.* 2014;146(4):1048-1059.e7.
 78. Miao J, Fang S, Bae Y, Kemper JK. Functional Inhibitory Cross-talk between Constitutive Androstane Receptor and Hepatic Nuclear Factor-4 in Hepatic Lipid / Glucose Metabolism Is Mediated by Competition for Binding to the DR1 Motif and to the Common Coactivators , GRIP-1 and PGC-1 α . *J Biol Chem.* 2006;281(21):14537–46.
 79. Pandak WM, Li YC, Chiang JYL, Studer EJ, Gurley EC, Heuman DM, et al. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA and transcriptional activity by taurocholate and cholesterol in the chronic biliary diverted rat. *J Biol Chem.* 1991;266(6):3416–21.
 80. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JMA, Hammer RE, et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Cell.* 1998;93(5):693–704.
 81. Goodwin B, Watson MA, Kim H, Miao J, Kemper JK, Kliewer SA. Differential regulation of rat and

- human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor- α . *Mol Endocrinol.* 2003;17(3):386–94.
82. Patel DD, Knight BL, Soutar AK, Gibbons GF, Wade DP. The effect of peroxisome-proliferator-activated receptor- α on the activity of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Biochem J.* 2000;351(3):747–53.
83. Cheema SK, Agellon LB. The murine and human cholesterol 7 α -hydroxylase gene promoters are differentially responsive to regulation by fatty acids mediated via peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Biol Chem.* 2000;275(17):12530–6.
84. Gbaguidi GF, Agellon LB. The inhibition of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) promoter by fibrates in cultured cells is mediated via the liver x receptor α and peroxisome proliferator-activated receptor α heterodimer. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(3):1113–21.
85. Gbaguidi GF, Agellon LB. The atypical interaction of peroxisome proliferator-activated receptor α with liver X receptor α antagonizes the stimulatory effect of their respective ligands on the murine cholesterol 7 α -hydroxylase gene promoter. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2002;1583(2):229–36.
86. Post SM, Duez H, Gervois PP, Staels B, Kuipers F, Princen HMG. Fibrates suppress bile acid synthesis via peroxisome proliferator-activated receptor- α -mediated downregulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(11):1840–5.
87. Szanto A, Benko S, Szatmari I, Balint BL, Furtos I, Ruhl R, et al. Transcriptional Regulation of Human CYP27 Integrates Retinoid, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, and Liver X Receptor Signaling in Macrophages. *Mol Cell Biol.* 2004;24(18):8154–66.
88. Pircher PC, Kitto JL, Petrowski ML, Tangirala RK, Bischoff ED, Schulman IG, et al. Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J Biol Chem.* 2003;278(30):27703–11.
89. Chen J, Zhao K, Chen C. The role of CYP3A4 in the biotransformation of bile acids and therapeutic implication for cholestasis. *Ann Transl Med.* 2014;2(1):1–9.
90. Song CS, Echchgadda I, Baek B, Ahn SC, Oh T, Roy AK, et al. Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase Gene Induction by Bile Acid Activated Farnesoid X Receptor *. *J Biol Chem.* 2001;276(45):42549–56.

91. Sonoda J, Xie W, Rosenfeld JM, Barwick JL, Guzelian PS, Evans RM. Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(21):13801–6.
92. Echchgadda I, Song CS, Roy AK, Chatterjee B. Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase Is a Target for Transcriptional Induction by the Vitamin D Receptor. *Mol Pharmacol*. 2004;65(3):720–9.
93. Saini SPS, Sonoda J, Xu L, Toma D, Uppal H, Mu Y, et al. A Novel Constitutive Androstane Receptor-Mediated and CYP3A-Independent Pathway of Bile Acid Detoxification. *Mol Pharmacol*. 2004;65(2):292–300.
94. Sugatani J, Nishitani S, Yamakawa K, Yoshinari K, Sueyoshi T, Negishi M, et al. Transcriptional regulation of human UGT1A1 gene expression: Activated glucocorticoid receptor enhances constitutive androstane receptor/ pregnane X receptor-mediated UDP-glucuronosyltransferase 1A1 regulation with glucocorticoid receptor-interacting prote. *Mol Pharmacol*. 2005;67(3):845–55.
95. Barbier O, Torra IP, Sirvent A, Claudel T, Blanquart C, Sandoval DD, et al. FXR Induces the UGT2B4 Enzyme in Hepatocytes: A Potential Mechanism of Negative Feedback Control of FXR Activity. *Gastroenterolog*. 2003;124(7):1926–40.
96. Lu Y, Heydel JM, Li X, Bratton S, Lindblom T, Radominska-Pandya A. Lithocholic acid decreases expression of UGT2B7 in CACO-2 cells: a potential role for a negative Farnesoid X Receptor Response Element. *Drug Metab Dispos*. 2009;33(7):937–46.
97. Plass JRM, Mol O, Heegsma J, Geuken M, Faber KN, Jansen PLM, et al. Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology*. 2002;35(3):589–96.
98. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, et al. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem*. 2002;277(4):2908–15.
99. Neimark E, Chen F, Li X, Shneider BL. Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology*. 2004;40(1):149–56.
100. Sinha J, Chen F, Miloh T, Burns

- RC, Yu Z, Shneider BL. β -Klotho and FGF-15/19 inhibit the apical sodium-dependent bile acid transporter in enterocytes and cholangiocytes. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295(5):996–1003.
101. Grober J, Zaghini I, Fujii H, Jones SA, Kliewer SA, Willson TM, et al. Identification of a Bile Acid-responsive Element in the Human Ileal Bile Acid-binding Protein Gene. *J Biol Chem.* 1999;274(42):29749–54.
102. Lee H, Zhang Y, Lee FY, Nelson SF, Gonzalez FJ, Edwards PA. FXR regulates organic solute transporters α and β in the adrenal gland, kidney, and intestine. *J Lipid Res.* 2006;47(1):201–14.
103. Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ, et al. The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology.* 2001;121(1):140–7.
104. Jung D, Kullak-Ublick GA. Hepatocyte nuclear factor 1 α : A key mediator of the effect of bile acids on gene expression. *Hepatology.* 2003;37(3):622–31.
105. Jung D, Podvinec M, Meyer URSA, Mangelsdorf DJ, Fried M, Meier PJ, et al. Human Organic Anion Transporting Polypeptide 8 Promoter Is Transactivated by the Farnesoid X Receptor/Bile Acid Receptor. *Gastroenterology.* 2002;122:1954–66.
106. Teng S, Jekerle V, Piquette-Miller M. Induction of ABCC3 (MRP3) by Pregnane X Receptor activators. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(11):1296–9.
107. Boyer JL, Trauner M, Mennone A, Soroka CJ, Cai SY, Moustafa T, et al. Upregulation of a basolateral FXR-dependent bile acid efflux transporter OST α -OST β in cholestasis in humans and rodents. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290(6):1124–30.
108. Zhang J, Huang W, Qatanani M, Evans RM, Moore DD. The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. *J Biol Chem.* 2004;279(47):49517–22.
109. Li T, Kong X, Owsley E, Ellis E, Strom S, Chiang JYL. Insulin regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase expression in human hepatocytes: Roles of forkhead box O1 and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem.* 2006;281(39):28745–54.
110. Li T, Francl JM, Boehme S, Ochoa A, Zhang Y, Klaassen CD, et al. Glucose and Insulin Induction of

- Bile Acid Synthesis. Mechanisms and implication in diabetes and obesity. *J Biol Chem.* 2012;287(3):1861–73.
111. Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, et al. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest.* 2004;113(10).
 112. Hirokane H, Nakahara M, Tachibana S, Shimizu M, Sato R. Bile Acid Reduces the Secretion of Very Low Density Lipoprotein by Repressing Microsomal Triglyceride Transfer Protein Gene Expression Mediated by Hepatocyte Nuclear Factor-4. *J Biol Chem.* 2004;279(44):45685–92.
 113. Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, et al. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;298(5):714–9.
 114. Keitel V, Donner M, Winandy S, Kubitz R, Häussinger D. Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;372(1):78–84.
 115. Nagahashi M, Takabe K, Liu R, Peng K, Wang X, Wang Y, et al. Conjugated bile acid-activated S1P receptor 2 is a key regulator of sphingosine kinase 2 and hepatic gene expression. *Hepatology.* 2015;61(4):1216–26.
 116. Li T, Jahan A, Chiang JYL. Bile acids and cytokines inhibit the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene via the JNK/c-Jun pathway in human liver cells. *Hepatology.* 2006;43(6):1202–10.
 117. Li T, Chiang JYL. A Novel Role of Transforming Growth Factor β 1 in Transcriptional Repression of Human Cholesterol 7 α -Hydroxylase Gene. *Gastroenterology.* 2007;133(5):1660–9.
 118. Song KH, Ellis E, Strom S, Chiang JYL. Hepatocyte growth factor signaling pathway inhibits cholesterol 7 α -hydroxylase and bile acid synthesis in human hepatocytes. *Hepatology.* 2007;46(6):1993–2002.
 119. Yokoda RT, Rodriguez EA. Review: Pathogenesis of cholestatic liver diseases. Vol. 12, *World Journal of Hepatology.* 2020. p. 423–35.
 120. Tan M, Tang C, Zhang Y, Cheng Y, Cai L, Chen X, et al. SIRT1/PGC-1 α signaling protects hepatocytes against mitochondrial oxidative stress induced by bile acids. *Free Radic Res.* 2015;49(8):935–45.
 121. Perez MJ, Britz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol.* 2009;15(14):1677–89.

122. Brunt EM, Wong VWS, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1(December):1–22.
123. Puri P, Daita K, Joyce A, Mirshahi F, PK S, Cazanave S, et al. The presence and severity of non alcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology.* 2017;67(2):534–48.
124. Nimer N, Choucair I, Wang Z, Nemet I, Li L, Gukasyan J, et al. Bile acids profile, histopathological indices and genetic variants for non-alcoholic fatty liver disease progression. *Metabolism.* 2021;116:154457.
125. Aguilar-Olivos NE, Carrillo-Córdova D, Oria-Hernández J, Sánchez-Valle V, Ponciano-Rodríguez G, Ramírez-Jaramillo M, et al. The nuclear receptor FXR, but not LXR, up-regulates bile acid transporter expression in non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol.* 2015;14(4):487–93.
126. Jiao N, Baker SS, Chapa-Rodriguez A, Liu W, Nugent CA, Tsompana M, et al. Suppressed hepatic bile acid signalling despite elevated production of primary and secondary bile acids in NAFLD. *Gut.* 2018;67(10):1–11.
127. Legry V, Francque S, Haas JT, Verrijken A, Caron S, Chávez-Talavera O, et al. Bile acid alterations are associated with insulin resistance, but not with NASH, in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(10):3783–94.
128. Sandhu N, Navarro V. Drug-Induced Liver Injury in GI Practice. *Hepatol Commun.* 2020;4(5):631–45.
129. Garcia-Cortes M, Robles-Diaz M, Stephens C, Ortega-Alonso A, Lucena MI, Andrade RJ. Drug induced liver injury: an update. *Arch Toxicol.* 2020;94(10):3381–407.
130. Andrade RJ, Aithal GP, Björnsson ES, Kaplowitz N, Kullak-Ublick GA, Larrey D, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Drug-induced liver injury. *J Hepatol.* 2019;70(6):1222–61.
131. Andrade RJ, Chalasani N, Björnsson ES, Suzuki A, Kullak-Ublick GA, Watkins PB, et al. Drug-induced liver injury. *Nat Rev Dis Prim.* 2019;5(1).
132. Ceba S, Potter D, Wong L, Schutt L, Tarrant J, Pang J, et al. Individual serum bile acid profiling in rats aids in human risk assessment of drug-induced liver injury due to BSEP inhibition. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018;338:204–13.

133. Slopianka M, Herrman A, PAVkovic M, Ellinger-Ziegelbauer H, Ernst R, Mally A, et al. Quantitative targeted bile acid profiling as new markers for DILI in a model of methapyrilene-induced liver injury in rats. *Toxicology*. 2017;386(2017):1–10.
134. Woolbright BL, McGill MR, Staggs VS, Winefield RD, Gholami P, Olyae M, et al. Glycodeoxycholic Acid Levels as Prognostic Biomarker in Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure Patients. 2014;142(2):436–44.
135. Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson SK, et al. Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest*. 2002;110(1):109–17.
136. Cheng JB, Jacquemin E, Gerhardt M, Nazer H, Cresteil D, Heubi JE, et al. Molecular genetics of 3 β -hydroxy- Δ 5-C27-steroid oxidoreductase deficiency in 16 patients with loss of bile acid synthesis and liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(4):1833–41.
137. Clayton PT, Leonard J V., Lawson AM, Setchell KD, Andersson S, Egestad B, et al. Familial giant cell hepatitis associated with synthesis of 3 β ,7 α -dihydroxy- and 3 β ,7 α ,12 α -trihydroxy-5-cholenoic acid. *J Clin Invest*. 1987;79(4):1031–8.
138. Bossi G, Giordano G, Rispoli GA, Maggiore G, Naturale M, Marchetti D, et al. Atypical clinical presentation and successful treatment with oral cholic acid of a child with defective bile acid synthesis due to a novel mutation in the HSD3B7 gene. *Pediatr Rep*. 2017;9(3):36–9.
139. Subramaniam P, Clayton PT, Portmann BC, Mieli-Vergani G, Hadzić N. Variable clinical spectrum of the most common inborn error of bile acid metabolism-3 β -hydroxy- Δ 5-C27-steroid dehydrogenase deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;50(1):61–6.
140. Setchell KDR, Suchy FJ, Welsh MB, Zimmer-Nechemias L, Heubi J, Balistreri WF. Δ 4-3-oxosteroid 5 β -reductase deficiency described in identical twins with neonatal hepatitis. A new inborn error in bile acid synthesis. *J Clin Invest*. 1988;82(6):2148–57.
141. Wang H, Wen F, Dai D, Wang J, Zhao J, Setchel K, et al. Infant cholestasis patient with a novel missense mutation in the AKR1D1 gene successfully treated by early adequate supplementation with chenodeoxycholic acid: A case report and review of the literature. *World J Gastroenterol*. 2018;24(35):4086–92.

142. Ueki I, Kimura A, Chen HL, Yorifuji T, Mori J, Itoh S, et al. SRD5B1 gene analysis needed for the accurate diagnosis of primary 3-oxo- Δ^4 -steroid 5 β -reductase deficiency. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(5):776–85.
143. Setchell KDR, Schwarz M, O'Connell NC, Lund EG, Davis DL, Lathe R, et al. Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: Mutation of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. *J Clin Invest.* 1998;102(9):1690–703.
144. Mizuochi T, Kimura A, Suzuki M, Ueki I, Takei H, Nittono H, et al. Successful Heterozygous Living Donor Liver Transplantation for an Oxysterol 7 α -Hydroxylase Deficiency in a Japanese Patient. *Liver Transplant.* 2011;17:1059–65.
145. Dai D, Mills PB, Footitt E, Gissen P, McClean P, Stahlschmidt J, et al. Liver disease in infancy caused by oxysterol 7 α -hydroxylase deficiency: successful treatment with chenodeoxycholic acid. *J Inherit Metab Dis.* 2014;37(5):851–61.
146. Kimura A, Nittono H, Mizuochi T, Ueki I, Kurosawa T, Muto A, et al. Neonatal cholestasis with increased 3 β -monohydroxy- δ^5 bile acids in serum and urine: Not necessarily primary oxysterol 7 α hydroxylase deficiency. *Clin Chim Acta.* 2012;413(19–20):1700–4.
147. Chen JY, Wu JF, Kimura A, Nittono H, Liou BY, Lee CS, et al. AKR1D1 and CYP7B1 mutations in patients with inborn errors of bile acid metabolism: Possibly underdiagnosed diseases. *Pediatr Neonatol.* 2020;61(1):75–83.
148. Verrips A, Hoefsloot LH, Steenbergen GCH, Theelen JP, Wevers RA, Gabreëls FJM, et al. Clinical and molecular genetic characteristics of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *Brain.* 2000;123(5):908–19.
149. Batta AK, Salen G, Shefer S, Tint GS, Batta M. Increased plasma bile alcohol glucuronides in patients with cerebrotendinous xanthomatosis: Effect of chenodeoxycholic acid. *J Lipid Res.* 1987;28(8):1006–12.
150. Chong CPK, Mills PB, McClean P, Gissen P, Bruce C, Stahlschmidt J, et al. Bile acid-CoA ligase deficiency-a new inborn error of bile acid metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2012;35(3):521–30.
151. Waterham HR, Ferdinandusse S, Wanders RJA. Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016;1863(5):922–33.
152. Van Eldere JR, Parmentier GG,

- Eyssen HJ, Wanders RJ, Schutgens RB, Vamecq J, et al. Bile acids in peroxisomal disorders. *Eur J Clin Invest.* 1987;17:386–90.
153. Parmentier GG, Busson RH, Janssen GA, Mannaerts GP, Eyssen HJ. Synthesis and 29-C16-labeling of acid. A bile acid occurring in peroxisomal diseases. *Steroids.* 1993;58:351–6.
154. Ferdinandusse S, Jimenez-Sanchez G, Koster J, Denis S, Van Roermund CW, Silva-Zolezzi I, et al. A novel bile acid biosynthesis defect due to a deficiency of peroxisomal ABCD3. *Hum Mol Genet.* 2015;24(2):361–70.
155. Platek T, Orso E, Zapala B, Polus A, Kiec-Wilk B, Piwowar M, et al. Case report of dysregulation of primary bile acid synthesis in a family with X-linked adrenoleukodystrophy. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(49):e13353.
156. Setchell KDR, Heubi JE, Bove KE, O'Connell NC, Brewsaugh T, Steinberg SJ, et al. Liver disease caused by failure to racemize trihydroxycholestanoic acid: Gene mutation and effect of bile acid therapy. *Gastroenterology.* 2003;124(1):217–32.
157. Van Veldhoven PP, Meyhi E, Squires RH, Fransen M, Fournier B, Brys V, et al. Fibroblast studies documenting a case of peroxisomal 2-methylacyl-CoA racemase deficiency: Possible link between racemase deficiency and malabsorption and vitamin K deficiency. *Eur J Clin Invest.* 2001;31(8):714–22.
158. Ferdinandusse S, Denis S, Clayton PT, Graham A, Rees JE, Allen JT, et al. Mutations in the gene encoding peroxisomal α -methylacyl-CoA racemase cause adult-onset sensory motor neuropathy. *Nat Genet.* 2000;24(2):188–91.
159. Smith EH, Gavrillov DK, Oglesbee D, Freeman WD, Vavra MW, Matern D, et al. An adult onset case of alpha-methyl-Acyl-CoA racemase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(SUPPL. 3):349–53.
160. Ferdinandusse S, Denis S, Mooyer PAW, Dekker C, Duran M, Soorani-Lunsing RJ, et al. Clinical and biochemical spectrum of D-bifunctional protein deficiency. *Ann Neurol.* 2006;59(1):92–104.
161. Ferdinandusse S, Kostopoulos P, Denis S, Rusch H, Overmars H, Dillmann U, et al. Mutations in the gene encoding peroxisomal sterol carrier protein X (SCPx) cause leukencephalopathy with dystonia and motor neuropathy. *Am J Hum Genet.* 2006;78(6):1046–52.
162. Horvath R, Lewis-Smith D,

- Douroudis K, Duff J, Keogh M, Pyle A, et al. SCP2 mutations and neurodegeneration with brain iron accumulation. *Neurology*. 2015;85(21):1909–11.
163. Srivastava A. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Clin Exp Hepatol*. 2014;4(1):25–36.
164. Vaz FM, Paulusma CC, Huidekoper H, de Ru M, Lim C, Koster J, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) deficiency: Conjugated hypercholanemia without a clear clinical phenotype. *Hepatology*. 2015;61(1):260–7.
165. Lin H, Qiu JW, Rauf YM, Lin GZ, Liu R, Deng LJ, et al. Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP) Deficiency Hidden Behind Citrin Deficiency in Early Infancy: A Report of Three Cases. *Front Genet*. 2019;10(November):1–8.
166. Van Herpe F, Waterham HR, Adams CJ, Mannens M, Bikker H, Vaz FM, et al. NTCP deficiency and persistently raised bile salts: an adult case. *J Inherit Metab Dis*. 2017;40(3):313–5.
167. Oelkers P, Kirby LC, Heubi JE, Dawson PA. Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium- dependent bile acid transporter gene (SLC10A2). *J Clin Invest*. 1997;99(8):1880–7.
168. Sultan M, Rao A, Elpeleg O, Vaz F, Libdeh B, Karpen S, et al. Organic Solute Transporter-beta (SLC51B) Deficiency in Two Brothers with Congenital Diarrhea and Features of Cholestasis. *Hepatology*. 2018;68(2):590–8.
169. Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G, et al. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology*. 2001;33(5):1206–16.
170. Fiorotto R, Spirlì C, Fabris L, Cadamuro M, Okolicsanyi L, Strazzabosco M. Ursodeoxycholic Acid Stimulates Cholangiocyte Fluid Secretion in Mice via CFTR-Dependent ATP Secretion. *Gastroenterology*. 2007;133(5):1603–13.
171. Amaral JD, Viana RJS, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CMP. Bile acids: Regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res*. 2009;50(9):1721–34.
172. Özcan U, Yilmaz E, Özcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes.

- Science (80-). 2016;313(5790).
173. Tanaka H, Makino I. Ursodeoxycholic acid-dependent activation of the glucocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;188(2):942–8.
 174. Harms MH, van Buuren HR, Corpechot C, Thorburn D, Janssen HLA, Lindor KD, et al. Ursodeoxycholic acid therapy and liver transplant-free survival in patients with primary biliary cholangitis. *J Hepatol.* 2019;71(2):357–65.
 175. Achufusi T, Safadi A, Mahabadi N. Ursodeoxycholic Acid. National Library of Medicine (NIH), StatPearls. 2022.
 176. Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, Clerici C, Costantino G, Maloney PR, et al. 6 α -Ethyl-Chenodeoxycholic Acid (6-ECDCA), a Potent and Selective FXR Agonist Endowed with Anticholestatic Activity. *Society.* 2002;45(17):15–8.
 177. Nevens F, Andreone P, Mazzella G, Strasser SI, Bowlus C, Invernizzi P, et al. A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis. *N Engl J Med.* 2016;375(7):631–43.
 178. Kowdley K V., Luketic V, Chapman R, Hirschfield GM, Poupon R, Schramm C, et al. A randomized trial of obeticholic acid monotherapy in patients with primary biliary cholangitis. *Hepatology.* 2018;67(5):1890–902.
 179. U.S. Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication due to risk of serious liver injury, FDA restricts use of Ocaliva (obeticholic acid) in primary biliary cholangitis (PBC) patients with advanced cirrhosis. 2021.
 180. Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, Rinella M, Anstee QM, Goodman Z, et al. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet.* 2019;394(10215):2184–96.
 181. Wang X, Pandey AK, Mulligan MK, Williams EG, Mozhui K, Li Z, et al. Joint mouse-human phenome-wide association to test gene function and disease risk. *Nat Commun.* 2016;7.
 182. Montet JC, Parquet M, Sacquet E, Montet AM, Infante R, Amic J. B-Muricholic acid; potentiometric and cholesterol-dissolving properties. *Biochim Biophysica Acta.* 1987;918(1):1–10.
 183. Nakashima T, Sakamoto Y, Inaba K, Mitsuyoshi H, Ishikawa H, Nakajima Y, et al. A paucity of unusual trihydroxy bile acids in the urine of patients with severe liver diseases. *Hepatology.*

- 1999;29(5):1518–22.
184. Zöhrer E, Meinel K, Fauler G, Moser VA, Greimel T, Zobl J, et al. Neonatal sepsis leads to early rise of rare serum bile acid tauro-omega-muricholic acid (TOMCA). *Pediatr Res* [Internet]. 2018;84(1):66–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41390-018-0007-y>
185. Takahashi S, Fukami T, Masuo Y, Brocker CN, Xie C, Krausz KW, et al. Cyp2c70 is responsible for the species difference in bile acid metabolism between mice and humans. *J Lipid Res*. 2016;57:2130–7.
186. Li J, Dawson PA. Animal models to study bile acid metabolism. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2019;1856(5):895–911.
187. de Boer JF, Verkade E, Mulder NL, de Vries HD, Huijkman NC, Koehorst M, et al. A Human-like Bile Acid Pool Induced by Deletion of Cyp2c70 Modulates Effects of Farnesoid X Receptor Activation in Mice. *J Lipid Res*. 2019;61:jl.r.RA119000243.
188. Penno CA, Morgan SA, Vuorinen A, Schuster D, Lavery GG, Odermatt A. Impaired oxidoreduction by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 results in the accumulation of 7-oxolithocholic acid. *J Lipid Res*. 2013;54:2874–83.
189. Wahlström A, Al-Dury S, Ståhlman M, Bäckhed F, Marschall HU. Cyp3a11 is not essential for the formation of murine bile acids. *Biochem Biophys Reports*. 2017;10:70–5.
190. Huijghebaert SM, Hofmann AF. Pancreatic carboxypeptidase hydrolysis of bile acid-amino acid conjugates: selective resistance of glycine and taurine amidates. *Gastroenterology*. 1986;90(2):306–15.
191. Woolbright BL, McGill MR, Yan H, Jaeschke H. Bile Acid-Induced Toxicity in HepaRG Cells Recapitulates the Response in Primary Human Hepatocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016;118(2):160–7.
192. Falany CN, Johnson MR, Barnes S, Diasio RB. Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N- acyltransferase. *J Biol Chem*. 1994;269(30):19375–9.
193. Falany CN, Fortinberry H, Edward H, Barnes S. Cloning, expression, and chromosomal localization of mouse liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *J Lipid Res*. 1997;38:1139–48.
194. Hirano S, Masuda N. Epimerization of the 7-hydroxy

- group of bile acids by the combination of two kinds of microorganisms with 7 α - and 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity, respectively. *J Lipid Res.* 1981;22(7):1060–8.
195. Honda A, Miyazaki T, Iwamoto J, Hirayama T, Morishita Y. Regulations of bile acid metabolism in mouse models with hydrophobic bile acid composition. *J Lipid Res.* 2019;
196. Marschall HU, Wagner M, Bodin K, Zollner G, Fickert P, Gumhold J, et al. Fxr $^{-/-}$ mice adapt to biliary obstruction by enhanced phase I detoxification and renal elimination of bile acids. *J Lipid Res.* 2006;47(3):582–92.
197. Ishibashi S, Schwarz M, Lund EG, Setchell KDR, Kayden HJ, Zerwekh JE, et al. Disruption of Cholesterol 7 α -Hydroxylase Gene in Mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. *J Biol Chem.* 1996;271(30):18024–31.
198. Schwarz M, Lund EG, Setchell KDR, Kayden HJ, Zerwekh JE, Björkhem I, et al. Disruption of cholesterol 7 α -hydroxylase gene in mice. II. Bile acid deficiency is overcome by induction of oxysterol 7 α -hydroxylase. *J Biol Chem.* 1996;271(30):18024–31.
199. Erickson SK, Lear SR, Deane S, Dubrac S, Huling SL, Nguyen L, et al. Hypercholesterolemia and changes in lipid and bile acid metabolism in male and female cyp7A1-deficient mice. *J Lipid Res.* 2003;44(5):1001–9.
200. Shea HC, Head DD, Setchell KDR, Russell DW. Analysis of HSD3B7 knockout mice reveals that a 3 α -hydroxyl stereochemistry is required for bile acid function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(28):11526–33.
201. Harris S, Nikolaos N, Arvaniti A, Cox R, Gathercole L, Tomlinson J. AKR1D1 (5 β -reductase) deletion drives hepatic inflammation, fibrosis and tumour development in vivo. *Endocr Abstr.* 2019;65:P186.
202. Li-Hawkins J, Lund EG, Turley SD, Russell DW. Disruption of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene in mice. *J Biol Chem.* 2000;275(22):16536–42.
203. Honda A, Salen G, Matsuzaki Y, Batta AK, Xu G, Leitersdorf E, et al. Differences in hepatic levels of intermediates in bile acid biosynthesis between Cyp27 $^{-/-}$ mice and CTX. *J Lipid Res.* 2001;42(2):291–300.
204. Honda A, Salen G, Matsuzaki Y, Batta AK, Xu G, Leitersdorf E, et al. Side chain hydroxylations in bile acid biosynthesis catalized by

- CYP3A4 are markedly up-regulated in Cyp27^{-/-} mice but not in cerebrotendinous xanthomatosis. *J Biol Chem.* 2001;276(37):34579–85.
205. Scheer N, Wilson ID. A comparison between genetically humanized and chimeric liver humanized mouse models for studies in drug metabolism and toxicity. *Drug Discov Today.* 2016;21(2):250–63.
206. Tag CG, Sauer-Lehnen S, Weiskirchen S, Borkham-Kamphorst E, Tolba RH, Tacke F, et al. Bile duct ligation in mice: Induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis. *J Vis Exp.* 2015;(96):1–11.
207. Geerts AM, Vanheule E, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: Macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *Int J Exp Pathol.* 2008;89(4):251–63.
208. Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Pojer C, Zenz R, et al. Effects of ursodeoxycholic and cholic acid feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver. *Gastroenterology.* 2001;121(1):170–83.
209. Zhang Y, Klaassen CD. Effects of feeding bile acids and a bile acid sequestrant on hepatic bile acid composition in mice. *J Lipid Res.* 2010;51(11):3230–42.
210. Fickert P, Fuchsbichler A, Marschall HU, Wagner M, Zollner G, Krause R, et al. Lithocholic acid feeding induces segmental bile duct obstruction and destructive cholangitis in mice. *Am J Pathol.* 2006;168(2):410–22.
211. Van Nieuwkerk CMJ, Elferink RPJO, Groen AK, Ottenhoff R, Tytgat GNJ, Dingemans KP, et al. Effects of ursodeoxycholate and cholate feeding on liver disease in FVB mice with a disrupted mdr2 P-glycoprotein gene. *Gastroenterology.* 1996;111(1):165–71.
212. Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Weiglein AH, Lammert F, et al. Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and Mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles. *Gastroenterology.* 2002;123(4):1238–51.
213. Ferdinandusse S, Denis S, van Roermund CWT, Preece MA, Koster J, Ebberink MS, et al. A novel case of ACOX2 deficiency leads to recognition of a third human peroxisomal acyl-CoA oxidase. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2018;1864(3):952–8.
214. Johansson Å, Curran JE, Johnson

- MP, Freed KA, Fenstad MH, Bjørge L, et al. Identification of ACOX2 as a shared genetic risk factor for preeclampsia and cardiovascular disease. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(7):796–800.
215. Zhou X, Xu M, Zeng W, Chen Z, Lu G, Gong Y, et al. Combined effects of FH (E404D) and ACOX2 (R409H) cause metabolic defects in primary cardiac malignant tumor. Vol. 4, *Cell Death Discovery.* Springer US; 2018.
216. Bjørklund SS, Kristensen VN, Seiler M, Kumar S, Alnæs GIG, Ming Y, et al. Expression of an estrogen-regulated variant transcript of the peroxisomal branched chain fatty acid oxidase ACOX2 in breast carcinomas. *BMC Cancer.* 2015;15(1):1–13.
217. Nakajima Y, Miyahara I, Hirotsu K, Nishina Y, Shiga K, Setoyama C, et al. Three-dimensional structure of the flavoenzyme Acyl-CoA oxidase-II from rat liver, the peroxisomal counterpart of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenase. *J Biochem.* 2002;131(3):365–74.
218. Tokuoka K, Nakajima Y, Hirotsu K, Miyahara I, Nishina Y, Shiga K, et al. Three-dimensional structure of rat-liver acyl-CoA oxidase in complex with a fatty acid: Insights into substrate-recognition and reactivity toward molecular oxygen. *J Biochem.* 2006;139(4):789–95.
219. Baumgart E, Vanhooren JCT, Fransen M, Marynen P, Puype M, Vandekerckhove J, et al. Molecular characterization of the human peroxisomal branched-chain acyl-CoA oxidase: cDNA cloning, chromosomal assignment, tissue distribution, and evidence for the absence of the protein in Zellweger syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(24):13748–53.
220. Monte MJ, Alonso M, Briz O, Herraiz E, Macias RR, Perez MJ, et al. Identification of a New Inborn Error in the Peroxisomal Steps of Bile Acid Synthesis Resulting in Accumulation of Toxic Bile Acid Intermediates and Hepatocellular Damage. *J Hepatol.* 2016;64(2):S301.
221. Alonso-Peña M. Identificación de un nuevo defecto genético del metabolismo de los ácidos biliares: deficiencia de la enzima ACOX2. Bases moleculares, fisiopatología e implicación en el daño hepatocelular idiopático. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca; 2019.
222. Monte MJ, Alonso-Peña M, Briz O, Herraiz E, Berasain C, Argemi J, et al. ACOX2 deficiency: An inborn error of bile acid synthesis identified in an adolescent with persistent hypertransaminasemia.

- J Hepatol. 2017;66(3):581–8.
223. Vilarinho S, Sari S, Mazzacuva F, Bilgüvar K, Esendagli-Yilmaz G, Jain D, et al. ACOX2 deficiency: A disorder of bile acid synthesis with transaminase elevation, liver fibrosis, ataxia, and cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(40):11289–93.
224. Schippers IJ, Moshage H, Roelofsen H, Mu M, Ruiters M, Kuipers F, et al. Immortalized human hepatocytes as a tool for the study of hepatocytic (de-)differentiation. *Cell Biol Toxicol*. 1997;13:375–86.
225. Laible M, Boonrod K. Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids. *J Vis Exp*. 2009;27(27):e1135.
226. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15655–60.
227. Geer LY, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, He S, et al. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res*. 2009;38(SUPPL.1):492–6.
228. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:421–9.
229. Ye L, Liu S, Wang M, Shao Y, Ding M. High-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Chromatogr B*. 2007;860:10–7.
230. Leníček M, Vecka M, Žížalová K, Vítek L. Comparison of simple extraction procedures in liquid chromatography–mass spectrometry based determination of serum 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one, a surrogate marker of bile acid synthesis. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2016;1033–1034:317–20.
231. Markwell MAK, Haas SM, Bieber L, Tolbert N. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*. 1978;87:206–10.
232. Liu M, Crawford J. Liver Biopsy. In: Johnson L, editor. *Encyclopedia of Gastroenterology*. Elsevier Inc.; 2003. p. 516–22.
233. Brosch M, Kattler K, Herrmann A, von Schönfels W, Nordström K, Seehofer D, et al. Epigenomic map of human liver reveals principles of zoned morphogenic and metabolic control. *Nat Commun*. 2018;9(1):1–11.

234. Hoang SA, Oseini A, Feaver RE, Cole BK, Asgharpour A, Vincent R, et al. Gene Expression Predicts Histological Severity and Reveals Distinct Molecular Profiles of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–14.
235. National Library of Medicine (NIH). Sequence Read Archive (SRA).
236. Kechin A, Boyarskikh U, Kel A, Filipenko M. CutPrimers: A New Tool for Accurate Cutting of Primers from Reads of Targeted Next Generation Sequencing. *J Comput Biol.* 2017;24(11):1138–43.
237. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15–21.
238. National Library of Medicine (NIH). Genome Reference Consortium Human Build 38 (GRCh38). 2013.
239. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* 2015;31(2):166–9.
240. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2009;26(1):139–40.
241. The R Foundation. The R Project for Statistical Computing.
242. Argemi J, Latasa MU, Atkinson SR, Blokhin IO, Massey V, Gue JP, et al. Defective HNF4alpha-dependent gene expression as a driver of hepatocellular failure in alcoholic hepatitis. *Nat Commun.* 2019;10(1).
243. National Library of Medicine (NIH). Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37). 2009.
244. Li B, Dewey CN. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics.* 2011;12(323):e1-16.
245. Auguste P, Guillet C, Fourcin M, Olivier C, Pouplard-barthelaix A, Gascan H. Signaling of Type II Oncostatin M Receptor. *J Biol Chem.* 1997;272(25):15760–4.
246. Chiang JYL. Hepatocyte nuclear factor 4a regulation of bile acid and drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009;5(2):137–47.
247. Kim I, Ahn SH, Inagaki T, Choi M, Ito S, Guo GL, et al. Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J Lipid Res.* 2007;48(12):2664–72.
248. Solaas K, Ulvestad A, Söreide O, Kase BF. Subcellular organization

- of bile acid amidation in human liver: A key issue in regulating the biosynthesis of bile salts. *J Lipid Res.* 2000;41(7):1154–62.
249. Mouzaki M, Wang AY, Bandsma R, Comelli EM, Arendt BM, Zhang L, et al. Bile acids and dysbiosis in non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2016;11(5):1–13.
250. Boulias K, Katrakili N, Bamberg K, Underhill P, Greenfield A, Talianidis I. Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP. *EMBO J.* 2005;24(14):2624–33.
251. Inoue Y, Yu A, Inoue J, Gonzalez FJ. Hepatocyte Nuclear Factor 4 α Is a Central Regulator of Bile Acid Conjugation. *J Biol Chem.* 2004;279(4):2480–9.
252. Atili A, Angelico M, Cantafora A, Alvaro D, Capocaccia. Bile acid-induced liver toxicity: Relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Med Hypotheses.* 1986;12(1):57–69.
253. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, et al. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene.* 1999;18(3):813–22.
254. Stojsavljević S, Palčić MG, Jukić LV, Duvnjak LS, Duvnjak M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(48):18070–91.
255. Di Maira G, Foglia B, Napione L, Turato C, Maggiora M, Sutti S, et al. Oncostatin M is overexpressed in NASH-related hepatocellular carcinoma and promotes cancer cell invasiveness and angiogenesis. *J Pathol.* 2022;257(1):82–95.
256. Malik N, Kallestad JC, Gunderson NL, Austin SD, Neubauer MG, Ochs V, et al. Molecular Cloning, Sequence Analysis, and Functional Expression of a Novel Growth Regulator, Oncostatin M. *Mol Cell Biol.* 1989;9(7):2847–53.
257. West N, Owens B, Hegazy A. The oncostatin M-stromal cell axis in health and disease. *Scand J Immunol.* 2018;88(3):e12694.
258. Miyajima A, Kinoshita T, Tanaka M, Kamiya A. Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11:177–83.
259. Znoyko I, Sohara N, Spicer SS, Trojanowska M, Reuben A. Expression of oncostatin M and its receptors in normal and cirrhotic human liver. *J Hepatol.* 2005;43(5):893–900.
260. Levy MT, Trojanowska M, Reuben A. Oncostatin NI: a cytokine

- upregulated in human cirrhosis, increases collagen production by human hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 2000;32(2):218–26.
261. Vee L, Jouan E, Stieger B, Lecureur V, Fardel O. Regulation of drug transporter expression by oncostatin M in human hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(3):304–11.
262. Mosley B, De Imus C, Friend D, Boiani N, Thoma B, Park LS, et al. Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem.* 1996;271(51):32635–43.
263. Schaefer LK, Wang S, Schaefer TS. Oncostatin M activates stat DNA binding and transcriptional activity in primary human fetal astrocytes: Low- and high-passage cells have distinct patterns of stat activation. *Cytokine.* 2000;12(11):1647–55.
264. Van Wagoner N, Choi C, Repovic P, Benveniste E. Oncostatin M Regulation of Interleukin-6 Expression in Astrocytes: Biphasic Regulation Involving the Mitogen-Activated Protein Kinases ERK1/2 and p38. *J Neurochem.* 2004;75(2):563–75.
265. Pollack V, Sarközi R, Banki Z, Feifel E, Wehn S, Gstraunthaler G, et al. Oncostatin M-induced effects on EMT in human proximal tubular cells: Differential role of ERK signaling. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2007;293(5):1714–26.
266. Smyth DC, Takenaka S, Yeung C, Richards CD. Oncostatin M regulates osteogenic differentiation of murine adipose-derived mesenchymal progenitor cells through a PKCdelta-dependent mechanism. *Cell Tissue Res.* 2015;360(2):309–19.
267. Veto B, Bojcsuk D, Bacquet C, Kiss J, Sipeki S, Martin L, et al. The transcriptional activity of hepatocyte nuclear factor 4 alpha is inhibited via phosphorylation by ERK1/2. *PLoS One.* 2017;12(2):e0172020.
268. McGill MR, Yan H, Ramachandran A, Murray GJ, Rollins E, Jaeschke H. HepaRG cells: a human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology.* 2012;53(3):974–82.
269. Le Vee M, Gripon P, Stieger B, Fardel O. Down-Regulation of Organic Anion Transporter Expression in Human Hepatocytes Exposed to the Proinflammatory Cytokine Interleukin 1B. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(2):217–22.
270. Zhao Y, Meng C, Wang Y, Huang H,

- Liu W, Zhang J, et al. IL-1 β inhibits β -Klotho expression and FGF19 signaling in hepatocytes. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2016;310(4):e289-300.
271. Foglia B, Sutti S, Pedicini D, Cannito S, Bocca C, Maggiora M, et al. Oncostatin M, A Profibrogenic Mediator Overexpressed in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Stimulates Migration of Hepatic Myofibroblasts. *Cells.* 2019;9(1).
272. Honda A, Miyazaki T, Iwamoto J, Hirayama T, Morishita Y, Monma T, et al. Regulation of bile acid metabolism in mouse models with hydrophobic bile acid composition. *J Lipid Res.* 2020;61(1):54–69.
273. Friedman LS, Dienstag JL, Watkins E, Hinkle CA, Spiers JA, Rieder S V., et al. Evaluation of blood donors with elevated serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med.* 1987;107(2):137–44.
274. Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann AF, et al. Inhibition of bile acid transport across Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB 11)-coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-inducing drugs. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(9):1575–81.
275. Suga T, Yamaguchi H, Sato T, Maekawa M, Goto J, Mano N. Preference of conjugated bile acids over unconjugated bile acids as substrates for OATP1B1 and OATP1B3. *PLoS One.* 2017;12(1):1–15.
276. Ferdinandusse S, Denis S, Dacremont G, Wanders RJA. Toxicity of peroxisomal C27-bile acid intermediates. *Mol Genet Metab.* 2009;96(3):121–8.
277. Sokolovic D, Nikolic J, Kocic G, Jevtovic-Stoimenov T, Veljkovic A, Stojanovic M, et al. The effect of ursodeoxycholic acid on oxidative stress level and DNase activity in rat liver after bile duct ligation. *Drug Chem Toxicol.* 2013;36(2):141–8.
278. Zhou B, Ho SS, Greer SU, Spies N, Bell JM, Zhang X, et al. Haplotype-resolved and integrated genome analysis of the cancer cell line HepG2. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(8):3846–61.
279. Guillevin L, Mahr A, Callard P, Godmer P, Pagnoux C, Leray E, et al. Hepatitis B virus-associated polyarteritis nodosa: Clinical characteristics, outcome, and impact of treatment in 115 patients. *Medicine (Baltimore).* 2005;84(5):313–22.
280. Stoffels M, Zhou Q, Chen C, Aksentijevich I, Kastner DL, Merkel PA, et al. Update on CECR1

- molecular diagnostics: New mutations in the deficiency of ADA2 (DADA2) and the North American polyarteritis nodosa (PAN) cohort. *Pediatr Rheumatol*. 2015;13(1):1–2.
281. Santiago TMG, Zavialov A, Saarela J, Seppanen M, Reed AM, Abraham RS, et al. Dermatologic features of ADA2 deficiency in cutaneous polyarteritis nodosa. *JAMA Dermatology*. 2015;151(11):1230–4.
282. Kennedy F, Kapelow R, Kalyon BD, Roth NC, Rishi A, Barilla-LaBarca ML. A rare case of Polyarteritis Nodosa associated with autoimmune hepatitis: a case report. *BMC Rheumatol*. 2021;5(1):1–5.
283. Harrold LR, Liu NYN. Polyarteritis nodosa presenting as pancytopenia: Case report and review of the literature. *Rheumatol Int*. 2008;28(10):1049–51.
284. Boulling A, Le Maréchal C, Trouvé P, Raguénès O, Chen JM, Férec C. Functional analysis of pancreatitis-associated missense mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) gene. *Eur J Hum Genet*. 2007;15(9):936–42.
285. Paumgartner G, Beuers U. Mechanisms of action and therapeutic efficacy of ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease. *Clin Liver Dis*. 2004;8(1):67–81.
286. Poupon RE, Chrétien Y, Poupon R, Paumgartner G. Serum bile acids in primary biliary cirrhosis: Effect of ursodeoxycholic acid therapy. *Hepatology*. 1993;17(4):599–604.
287. Van Nieuwerk CMJ, Groen AK, Ottenhoff R, Van Wijland M, Van Den Bergh Weerman MA, Tytgat GNJ, et al. The role of bile salt composition in liver pathology of *mdr2* (-/-) mice: Differences between males and females. *J Hepatol*. 1997;26(1):138–45.
288. Benz C, Angermüller S, Otto G, Sauer P, Stremmel W, Stiehl A. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile acid-induced apoptosis in primary human hepatocytes. *Eur J Clin Invest*. 2000;30(3):203–9.
289. Paolini M, Pozzetti L, Montagnani M, Potenza G, Sabatini L, Antelli A, et al. Ursodeoxycholic acid (UDCA) prevents DCA effects on male mouse liver via up-regulation of CYP and preservation of BSEP activities. *Hepatology*. 2002;36(2):305–14.
290. Takigawa T, Miyazaki H, Kinoshita M, Kawarabayashi N, Nishiyama K, Hatsuse K, et al. Glucocorticoid receptor-dependent immunomodulatory effect of ursodeoxycholic acid on liver lymphocytes in mice. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*.

- 2013;305(6):427–38.
291. Guarino MPL, Cocca S, Altomare A, Emerenziani S, Cicala M. Ursodeoxycholic acid therapy in gallbladder disease, a story not yet completed. *World J Gastroenterol.* 2013;19(31):5029–34.
292. European Medicines Agency. Recommendation for maintenance of orphan designation at the time of marketing authorisation. Chenodeoxycholic acid sigma-tau (chenodeoxycholic acid) for the treatment of inborn errors in primary bile acid synthesis. Vol. 44. 2017.
293. Ministerio de Sanidad G de E. Acuerdos de la Reunión de la Comisión Interministerial de Precios de los Medicamentos. Sesión 215 de 30 de septiembre de 2021. 2021.
294. Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. Pharmacoeconomic Review Report: Obeticholic Acid (Ocaliva): (Intercept Pharma Canada, Inc.): Indication: For the treatment of primary biliary cholangitis. 2017.
295. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Ocaliva 5 y 10 mg 30 comprimidos recubiertos. Base de datos BOT PLUS. Último acceso: 08/06/2022.
296. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Ursobilane 300 y 500 mg 60 cápsulas. Base de datos BOT PLUS. Último acceso: 08/06/2022.
297. J.A. Wanders R, Ferdinandusse S. Peroxisomes, Peroxisomal Diseases, and the Hepatotoxicity Induced by Peroxisomal Metabolites. *Curr Drug Metab.* 2012;13(10):1401–11.
298. Kitani K. The protective effect of hydrophilic bile acids on bile acid hepatotoxicity in the rat. *Ital J Gastroenterol.* 1995;27(7):366–71.
299. Gaillard D, Masson D, Garo E, Souidi M, de Barros JPP, Schoonjans K, et al. Muricholic acids promote resistance to hypercholesterolemia in cholesterol-fed mice. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13).
300. Rosen H, Reshef A, Maeda N, Lippoldt A, Shpizen S, Triger L, et al. Markedly reduced bile acid synthesis but maintained levels of cholesterol and vitamin D metabolites in mice with disrupted sterol 27- hydroxylase gene. *J Biol Chem.* 1998;273(24):14805–12.
301. Zhang Y, Lu Z, Zeng W, Zhao J, Zhou X. Two sides of NNMT in alcoholic and non-alcoholic fatty liver development. *J Hepatol.* 2021;74(Letters to the editor):1250–2.
302. Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH. Off-target

- effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2015;4(11):e264.
303. Gälman C, Arvidsson I, Angelin B, Rudling M. Monitoring hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase activity by assay of the stable bile acid intermediate 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in peripheral blood. *J Lipid Res*. 2003;44(4):859–65.
304. Wanders RJA, Vreken P, Ferdinandusse S, Jansen GA, Waterham HR, van Roermund CWT, et al. Peroxisomal fatty acid α - and β -oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem Soc Trans*. 2001;29(2):250.
305. Casteels M, Schepers L, Van Veldhoven PP, Mannaerts GP. Separate peroxisomal acyl-CoA oxidases for fatty acids and trihydroxycoprostanic acid in human liver. In: *Biochemical Society Transactions*. 1990. p. 1003–4.
306. Van Veldhoven PP, Vanhove G, Asselberghs S, Eyssen HJ, Mannaerts GP. Substrate specificities of rat liver peroxisomal acyl-CoA oxidases: Palmitoyl-CoA oxidase (inducible acyl-CoA oxidase), pristanoyl-CoA oxidase (non-inducible acyl-CoA oxidase), and trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *J Biol Chem*. 1992;267(28):20065–74.
307. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Vol. 138, *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc.; 2013. p. 103–41.
308. McGill M, Williams C, Xie Y, Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen-induced Liver Injury in Rats and Mice: Comparison of Protein Adducts, Mitochondrial Dysfunction, and Oxidative Stress in the Mechanism of Toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;264(3):387–94.
309. Banks AT, Zimmerman HJ, Ishak KG, Harter JG. Diclofenac-associated hepatotoxicity: Analysis of 180 cases reported to the food and drug administration as adverse reactions. *Hepatology*. 1995;22(3):820–7.
310. National Library of Medicine (NIH). LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs (NSAIDs) [Internet]. 2020 [cited 2022 May 11]. Available from: ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548614/
311. Tang W. The Metabolism of Diclofenac - *Enzymology and*



BIBLIOGRAFÍA

Toxicology Perspectives. Curr Drug
Metab. 2005;4(4):319–29.

