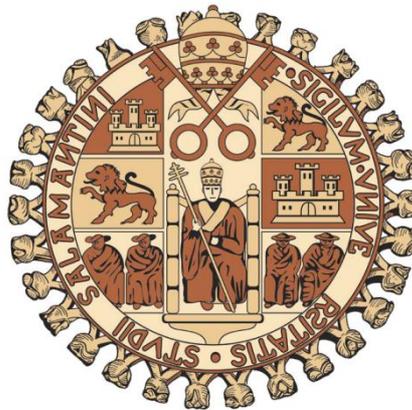




UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y
FARMACOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

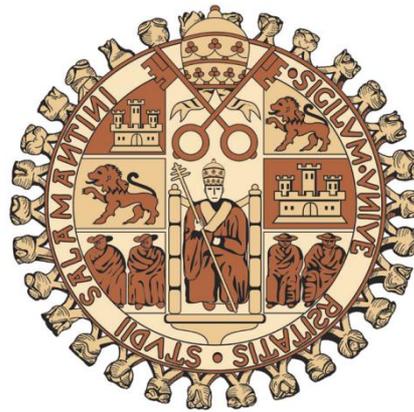
EFFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE
LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ENTEROHEPÁTICA
DE FXR/FGF19

TESIS DOCTORAL

2017



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y
FARMACOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

EFFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE
LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ENTEROHEPÁTICA
DE FXR/FGF19

Memoria que presenta **Dña. Faten Abdullah Alaqil** para optar al Título de
Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 24 de Marzo de 2017

Dra. Dña. MARÍA JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada “EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ENTEROHEPÁTICA DE FXR/FGF19”, presentada por Dña. Faten Abdullah Alaqil para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los Drs. D. José Juan García Marín del Departamento de Fisiología y Farmacología y Dña. Marta Rodríguez Romero, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 24 de Marzo de 2017.

Fdo. María Jesús Monte Río

Dr. D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA Y Dra. Dña. MARTA RODRÍGUEZ ROMERO, PROFESORA CONTRATADA DOCTORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada “EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ENTEROHEPÁTICA DE FXR/FGF19”, presentada por Dña. Faten Abdullah Alaqil 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.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a día 24 de Marzo de 2017.

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. Marta Rodríguez Romero

La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de una beca del Ministerio de Educación Superior de Arabia Saudí.

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

- Dirección General de Programas y Transferencia de Conocimiento del MICINN. Proyecto SAF2010-15517. “Relación entre FXR y riesgo de carcinogénesis en tejidos del circuito enterohepático. Implicaciones terapéuticas”. Investigador Principal: J.J. García Marín. Periodo: 2011-2013.
- Dirección General de Investigación Científica y Técnica del MINECO. Proyecto SAF2013-40620-R. “Implicación de los genes NR1H4, BIRC5 y SLC22A1 en la quimiorresistencia y quimiosensibilización del cáncer hepático”. Investigador Principal: J.J. García Marín. Periodo: 2014-2016.
- Fundación Samuel Solórzano Barruso. Ayudas a la Investigación 2014. “Repercusiones hepáticas e intestinales de la alteración en la vía de señalización FXR/FGF19 por tratamiento o hipersecreción de glucocorticoides”. Investigador Principal: M. Rodríguez Romero. Periodo: 2015.
- Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Proyectos de investigación en salud (AES 2015). Proyecto PI15/00179. “Autofagia en las enfermedades hepáticas: regulación por el genoma mitocondrial e identificación de potenciales dianas terapéuticas”. Investigador Principal: M.J. Pérez García. Periodo: 2016-2018.
- Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad del MINECO. Proyecto SAF2016-75197-R “Desarrollo de un modelo predictivo de la falta de respuesta a la quimioterapia en pacientes con hepatoblastoma”. Investigador Principal: R.I. Rodríguez Macías. Periodo: 2017-2019.
- Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Proyectos de investigación en salud (AES 2016). Proyecto PI16/00598. “Quimiorresistencia del adenocarcinoma gástrico: Caracterización de su huella genética y superación mediante edición genómica programada basada en CRISPR/Cas9”. Investigador Principal: J.J. García Marín. Periodo: 2017-2019.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral forman parte del siguiente manuscrito en preparación:

FA Al-Aqil, MJ Monte, R Rosales, A Peleteiro, R Gonzalez, CJ Aranda, B Ocon, I Uriarte, F Sanchez de Medina, O Martinez-Augustin, M Ávila, JJG Marin, MR Romero. Treatment with glucocorticoids interferes with bile acid homeostasis through impairment of FXR/FGF19/FGF21-mediated ileum-liver crosstalk.

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

El tratamiento con glucocorticoides altera la homeostasis de los ácidos biliares al interferir con la vía de comunicación intestino-hígado mediada por FXR/FGF19. **FA Al-Aqil**, MJ Monte, R Rosales, MA Serrano, E Herráez, F Jiménez, L Sanz-Ort, R Gonzalez, C Pizarro, CJ Aranda, O Borja, F Sánchez de Medina, O Martínez-Augustín, I Uriarte, MA Ávila, JJG Marín, MR Romero. Publicación: Gastroenterología y Hepatología. Vol 39: P.67-68. 2016. XLI Congreso Anual de la Asociación Española del Estudio del Hígado (AEEH) (Madrid, 2016).

Treatment with glucocorticoids interferes with bile acid homeostasis by affection FXR/FGF19-mediated ileum-liver crosstalk. MR Romero, **FA Al-Aqil**, MJ Monte, E Herraez, R Rosales, MA Serrano, F Jimenez, L Sanz-Ortega, C Pizarro, JC Aranda, B Ocon, I Uriarte, O Martínez-Augustín, F Sanchez de Medina, MA Avila, JJG Marin. Publicación: Journal of Hepatology. Vol 64(2): S178-S179. 2016. The International Liver Congress™ 2016-51st annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL) (Barcelona, 2016).

Altered bile acid homeostasis by treatment with glucocorticoids is mediated by interference with FXR/FGF19 ileum-liver crosstalk. **FA Al-Aqil**, MJ Monte, R Rosales, MA Serrano, F Jiménez, L Sanz-Ortega, R González, C Pizarro, CJ Aranda, B Ocón, F Sánchez de Medina, O Martínez-Augustín, I Uriarte, MA Ávila, JJG Marín, MR Romero. Falk Foundation Symposium 203 (FALK) (Dusseldorf, Alemania, 2016).

Alteración en la homeostasis de los ácidos biliares por interferencia de los glucocorticoides con la vía de señalización enterohepática FXR/FGF19. **FA Al-Aqil**, MJ Monte, R Rosales, MA Serrano, F Jiménez, L Sanz-Ortega, R González, C Pizarro, CJ Aranda, B Ocón, F Sánchez de Medina, O Martínez-Augustín, I Uriarte, MA Ávila, JJG Marín, MR Romero. XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (Salamanca, 2016).

La doctoranda también ha contribuido a la presentación de las siguientes comunicaciones a Congresos Científicos:

Role of post-transductional modifications in FXR-induced chemoprotection of liver cells to genotoxic compounds. E Herráez, L Valiño, O Briz, J Vaquero, E González-Sánchez, MJ Pérez, AG Blázquez, MA Serrano, MR Romero, FA Al-Aqil, L Sánchez-Vicente, JJG Marín. XXIII International Bile Acid Meeting (Friburgo, Alemania, 2014).

Papel de las modificaciones postransduccionales del receptor nuclear FXR en la quimioprotección de células hepáticas frente a la toxicidad producida por agentes genotóxicos. F Gonzalez-San Martin, E Herraiez, B Castaño, L Valiño, O Briz, J Vaquero, E Gonzalez-Sanchez, MJ Pérez, AG Blazquez, MA Serrano, MR Romero, FA Al-aqil, L Sanchez-Vicente, JJG Marín. Publicación: Rev ACAD, 30 (3): 92-93 XXXVII Reunión de la Asociación Castellana de Aparato Digestivo (ACAD), (Santander, 2014).

Papel del receptor nuclear FXR en la quimioprotección de células hepáticas frente a la toxicidad producida por agentes genotóxicos. E Herráez, O Briz, L Valiño, J Vaquero, E González-Sánchez, B Castaño, MJ Pérez, AG Blázquez, MA Serrano, MR Romero, FA Al-Aqil, L Sánchez-Vicente, F González-San Martín, JJG Marin. Publicación: Gastroenterología y Hepatología. P.38. 2015. XL Congreso Anual de la Asociación Española del Estudio del Hígado(AEEH) (Madrid, 2015).

Identification of the apical sodium bile salt transporter (ASBT) as a novel molecular target to enhance the sensitivity of cholangiocarcinoma to chemotherapy. E Lozano, RI Macias, MJ Monte, O Briz, F Jimenez, S Jimenez, B Castaño, R Al-Abdulla, FA Al-Aqil, A Hernandez, JM Banales , MA Serrano, JJG Marin. Publicación: Journal of Hepatology . Vol 62: P.S400-S401. 2015. The International Liver Congress™ 2015 50th (EASL) (Viena, Austria, 2015).

Nuevos agentes quimiosensibilizantes del carcinoma hepatocelular al sorafenib por bloqueo de las bombas ABC exportadoras de fármacos. S di Giacomo, L Sánchez-Vicente, A di Sotto, MJ Monte, MR Romero, M Asensio, M Alonso-Peña, FA Al-Aqil, G Mazzanti, JJG Marín, O Briz. Publicación: Gastroenterología y Hepatología. P.11. 2017. XL Congreso Anual de la Asociación Española del Estudio del Hígado (AEEH) (Madrid, 2017).

Agradecimientos:

Todas las etapas de la vida tienen su inicio y su final. Hoy me toca cerrar la etapa de mi Tesis Doctoral después de cuatro años maravillosos llenos de experiencias muy gratificantes tanto a nivel laboral como personal. Esta Tesis ha sido posible, no sólo a mi esfuerzo y dedicación, sino a todas aquellas personas que me han acompañado en este camino. No existen palabras para expresar mi más sincero agradecimiento a todos ellos. Por ello, quiero que se sientan identificadas en esta Memoria.

A mis directores

Al Dr. José Juan García Marín por brindarme la oportunidad de aprender y conocer el apasionante mundo de la ciencia y aportarme multitud de ideas que han hecho posible esta Tesis y crecer formando parte de un gran equipo, por su apoyo, sus consejos, supervisión y esfuerzo constantes para sacar adelante este trabajo. A la Dra. Marta Rodríguez Romero, por su gran paciencia y dedicación, por atenderme y corregirme en todo momento, tanto en la investigación como en lo relativo al idioma, por hacerlo todo tan fácil, por las geniales ideas que me ha dado a lo largo del trabajo, sin la que probablemente no podría haber presentado esta Tesis. Les agradezco a ambos haber sido un gran ejemplo a seguir para mí.

A la Dra. M^a Jesús Monte Río, por su paciencia y exigencia, y sobre todo por su gran ayuda a lo largo de este trabajo, especialmente en los experimentos *in vivo* y en los análisis de HPLC-MS/MS.

A la Dra. M^a Ángeles Serrano García por su generosidad y su ayuda incondicional en las relaciones interculturales

A la Dra. Rocío Rodríguez Macías, por ser un apoyo en las cuestiones lingüísticas, por sus consejos y por ayudarme tanto.

Al Dr. Oscar Briz Sánchez, por su gran ayuda en los experimentos de clonación, por todo lo que me ha enseñado y el tiempo que me ha dedicado durante el desarrollo de la investigación. Gracias por hacerlo todo mucho más sencillo.

A la Dra. M^a José Pérez por los buenos ratos pasados en el laboratorio, por su humor, y por todo su apoyo.

A todos mis compañeros de laboratorio, por su compañerismo y permitirme formar parte de un gran equipo. A la Dra. Elisa Herráez Aguilar, por su ayuda y disposición. A Elisa Lozano, a Ruba Al Abdullah, a Marta Alonso y a Maitane Asensio, por hacer menos difícil para mí el día a día, por su simpatía y gran sentido del humor, por su ayuda. Por todos los momentos inolvidables que hemos compartido y por compartir sus experiencias y consejos. A todos ellos, agradezco el haberme hecho sentir como una más del equipo y el haberse convertido en mi segunda familia.

También me gustaría dar las gracias al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, por permitirme el uso de sus instalaciones y equipamiento.

A M^a Isabel Hernández por su excelente trabajo en la secretaría. A los técnicos, auxiliares de laboratorio y al personal del Servicio de Experimentación Animal que han facilitado el trabajo diario.

Dedicada a:

A mi madre, a mis hermanos y a mi marido

por su cariño, su ánimo, por la paciencia y el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de todos estos años. Especialmente, a mi hermano Mohammad por su compañerismo durante todo este tiempo fuera de nuestro país.

A Nora, por ser mi amiga y, sobre todo, por haberme hecho sentir el calor hogareño a miles de kilómetros de casa, por su ayuda estos últimos meses de escritura, estrés y nervios.

A todos los nuevos amigos que me han abierto sus hogares y sus culturas.

ABREVIATURAS FRECUENTES

AC: Ácido colico

AQDC: Ácido quenodesoxicólico

AB: Ácido biliar

ADNc: ADN complementario

AF1: "Activation Function-1"

ALT: Alanina aminotransferase

APUD: "Amine precursor uptake descarboxilase"

ARNm: ARN mensajero

ASBT: "Apical sodium-dependent bile acid transporter"

AST: Aspartato aminotransferasa

BAAT: "Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase"

BCRP: "Breast cancer resistance protein"

BSEP: "Bile salt export pump"

BUD: Budesonida

CYP: Enzimas citocromo P450

Ct: Ciclo umbral

DBD: "DNA binding domain"

DC: Ácido desoxicólico

DEX: Dexametasona

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético

EEM: Error estándar de la media

ER: Elemento de respuesta

FGF: "Fibroblast grow factor"

FGFR4: “Fibroblast grow factor receptor”

FXR: ”Farnesoid X receptor”

GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GC: Ácido glicocólico

GR: “Glucocorticoid Receptor”

GW4064: Ácido 3-(2,6-diclorofenil)-4-(3'-carboxi-2-cloro-estilben-4-il)-oximetil-5-isopropil-isoxazol

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazintansulfónico

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HNF4 α : “Hepatocyte nuclear factor 4 alpha”

HPLC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

IBABP: “Ileal Bile Acid Binding Protein”

LB: Medio Luria-Bertani

LBD: “Ligand binding domain”

LDH: Lactato deshidrogenasa

LDL: “Low density lipoprotein”

LRH-1: “Liver receptor homologue-1”

LXR: “Liver X receptor”

MC: Ácido muricólico

MEM: “Minimum essential medium eagle”

MFS: Mifepristona

MOPS: Ácido morfolino propansulfónico

MRP2: “Multidrug resistance-associated protein 2”

MR: “Mineralocorticoid receptor”

MTT: Sal de tetrazolio

norDCA: Ácido nordesoxicólico

NR: “Nuclear receptor”

NTCP: “Sodium taurocholate cotransporting polypeptide”

OATP: "Organic anion transporting polypeptide"

ORF: "Open reading frame"

OST: "Organic solute transporter"

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PPAR: "Perinuclear proliferator-activated receptor"

PRED: Prednisolona

PXR: "Pregnane X receptor"

QDC: Ácido quenodesoxicólico

ROR: "Retinoid-related orphan receptor"

RT: Transcripción reversa

RXR: "Retinoid X receptor"

SDS: Dodecil sulfato sódico

SHP: "Small heterodimer partner"

TC: Ácido taurocólico

TDC: Ácido taurodesoxicólico

TLC: Cromatografía en capa fina

TR: "Thyroid hormone receptor"

TMC: Ácido taumuricólico

TQDC: Ácido tauroquenodesoxicólico

TUDC: Ácido tauroursodesoxicólico

UDC: Ácido ursodesoxicólico

VDR: Receptor de vitamina D

ÍNDICE

1. OBJETIVOS.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. SISTEMA ENTEROHEPÁTICO.....	7
2.1.1. El hígado.....	7
Anatomía e histología.....	7
2.1.2. El intestino delgado.....	12
Anatomía e histología del intestino delgado.....	12
2.2. ÁCIDOS BILIARES.....	17
2.2.1. Biosíntesis de los ácidos biliares.....	18
2.2.2. Conjugación de los ácidos biliares.....	20
2.2.3. Transporte hepático e intestinal de los ácidos biliares.....	20
2.2.4. Funciones de los ácidos biliares.....	22
2.3. RECEPTORES NUCLEARES	23
2.3.1. Concepto y tipos.....	23
2.3.2. FXR.....	25
Estructura genética.....	26
Papel fisiológico de FXR: Regulación del metabolismo y el transporte de ácidos biliares mediado por FXR.....	27
Regulación de la síntesis de ácidos biliares a través de la regulación hepática de la expresión de CYP7A1 por FXR.....	28
Regulación de la expresión de CYP7A1 a través de la regulación intestinal mediada por FXR: Factor de crecimiento fibroblástico (FGF19).....	29
2.3.3. Receptor de glucocorticoides.....	30
Estructura y actividad.....	30
Efectos secundarios de los glucocorticoides a través de su receptor.....	32

3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
3.1. MATERIAL.....	37
3.1.1. Material biológico.....	37
Animales.....	37
Líneas celulares.....	37
3.1.2. Productos y reactivos.....	37
3.1.3. Medios instrumentales.....	39
3.2. MÉTODOS.....	41
3.2.1. Modelos <i>in vivo</i>.....	41
Estudio del efecto <i>in vivo</i> del tratamiento con glucocorticoides en el modelo de rata Wistar	41
Estudio del efecto <i>in vivo</i> del tratamiento con glucocorticoides en el modelo de ratón.....	42
3.2.2. Modelo <i>in vitro</i>.....	42
Experimentos con líneas celulares.....	42
Estudio del efecto de los glucocorticoides en líneas celulares.....	43
3.2.3. Métodos de biología molecular.....	44
Cuantificación de los ARNm por RT-PCR cuantitativa.....	44
Extracción de ARN total.....	44
Transcripción reversa (RT).....	45
Diseño de cebadores.....	45
Cuantificación de los resultados.....	49
3.2.4. Otras técnicas de Biología Molecular.....	49
Transformación de bacterias competentes mediante choque térmico.....	49
Obtención y purificación del ADN plasmídico de bacterias transformadas.....	50
Geles de agarosa para electroforesis.....	50
3.2.5. Métodos de análisis.....	51

Determinación de la viabilidad celular (Test de Formazán).....	51
Determinación de ácidos biliares por HPLC-MS/MS.....	52
Medida del perfil hepático mediante tiras reactivas de química seca.....	54
3.2.6. Análisis estadístico.....	54
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
4.1. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ENTEROHEPÁTICA FXR/FGF15 EN RATA.....	57
4.1.1. Efecto sobre los genes involucrados en la homeostasis de ácidos biliares a nivel intestinal.....	57
4.1.2. Toxicidad hepática de los tratamientos con glucocorticoides	60
4.1.3. Efecto de la dexametasona sobre la vía de señalización enterohepática de Fxr/Fgf15/Fgf21.....	64
4.2. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACION ENTEROHEPÁTICA FXR/FGF15 EN RATÓN.....	69
4.2.1. Efecto sobre los genes involucrados en la homeostasis de ácidos biliares a nivel intestinal.....	69
4.2.2. Efecto de los glucocorticoides sobre los genes involucrados en la homeostasis de ácidos biliares a nivel hepático.....	76
4.2.3. Efecto de la dexametasona sobre los niveles y especies de ácidos biliares en suero de ratón.....	82
4.3. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LOS GENES IMPLICADOS EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ENTEROHEPÁTICA FXR/FGF19 EN CÉLULAS DE HEPATOMA DE ORIGEN HUMANO	89
4.4. DISCUSIÓN GENERAL.....	95

5. CONCLUSIONES.....100

6. BIBLIOGRAFÍA.....104

1-OBJETIVO

1- OBJETIVO

Aunque desde hace tiempo se conocía que los ácidos biliares participan en el control de su propia síntesis, ha sido la identificación del receptor nuclear huérfano “Farnesoid X Receptor” (FXR, *NR1H4*) como el elemento sensor de los niveles de ácidos biliares, lo que ha permitido avanzar durante la última década en el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan el metabolismo de estos esteroides. Los ácidos biliares activan FXR en los hepatocitos cuya consecuencia es un aumento de la expresión del factor de transcripción SHP (“Small Heterodimer Partner”), el cual reprime la expresión de la enzima clave en la ruta mayoritaria de síntesis *de novo* de ácidos biliares, la CYP7A1. A nivel intestinal, los ácidos biliares, activan en el ileocito FXR, que a su vez induce la expresión del factor de crecimiento fibroblástico 19 (FGF19) en humanos y 15 (Fgf15) en ratas y ratones. A través de la circulación portal FGF19/Fgf15 llega al hígado donde tras unirse a su receptor FGFR4 situado en la membrana basolateral de los hepatocitos gracias a la dimerización con la proteína β -Klotho, desencadena una cascada de señalización que inhibe la transcripción del gen *CYP7A1*.

Para plantear el objetivo de este trabajo también hay que tener en cuenta que la utilidad de los glucocorticoides como tratamiento crónico en enfermedades inflamatorias y autoinmunes se ve limitada por sus efectos secundarios, como son, entre otros, la aparición de trastornos hepáticos, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa e incluso diabetes. Pese a estas limitaciones, el uso de glucocorticoides también tiene efectos beneficiosos en el hígado, como lo avala su uso en ciertos tipos de hepatitis y desórdenes colestáticos. Aunque los efectos, ya sean perjudiciales o beneficiosos, puedan deberse en parte a las propiedades antiinflamatorias de los glucocorticoides, nos planteamos como hipótesis la posibilidad de que estos esteroides o su receptor GR (“Glucocorticoid Receptor”) puedan interactuar de forma directa o indirecta con mecanismos de control de la función hepática, en general, y el control de la homeostasis de ácidos biliares, en particular. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha descrito la existencia de una relación entre los glucocorticoides y la expresión de FXR hepático y sus genes diana. Esto plantea una interesante incógnita sobre la posible implicación de la interconexión entre la vía de señalización de FXR intestinal y hepática en la respuesta al tratamiento con glucocorticoides.

En base a estos antecedentes, se planteó como objetivo de esta Tesis Doctoral el evaluar los efectos del tratamiento de tres glucocorticoides de uso clínico, como la dexametasona, la budesonida y la prednisolona sobre la vía de señalización enterohepática de FXR/FGF19 y su repercusión en el metabolismo hepático de los ácidos biliares.

2- INTRODUCCIÓN

2.1. SISTEMA ENTEROHEPÁTICO

Desde una visión estructural el sistema gastrointestinal es un tubo elongado con un lumen que se inicia en el esófago y termina en el recto, dividiéndose en tres porciones, de las cuales la porción intermedia o intestino delgado, junto con la circulación portal y el hígado, constituyen lo que denomina circuito enterohepático (Grossman *et al.*, 2014).

2.1.1. El hígado

Anatomía e histología

El hígado es el órgano de mayor tamaño del organismo, ya que constituye aproximadamente el 2.5% del peso corporal en adultos y un 5% en recién nacidos. En cuanto a la anatomía, el hígado presenta dos caras: una diafragmática y otra visceral. En la cara diafragmática encontramos dos lóbulos: derecho e izquierdo, siendo éste último más grande (**Fig-11**). Estos lóbulos están divididos por el ligamento falciforme, el cual se extiende hasta la zona umbilical. Al llegar a la parte posterior de la cara diafragmática, el ligamento falciforme se divide en dos hojas dando lugar al ligamento coronario. Cada una de estas hojas se dirige a cada uno de sus bordes derecho e izquierdo del hígado, donde se une a la hoja peritoneal de la cara visceral del hígado, formando los ligamentos triangulares derecho e izquierdo. En la cara visceral encontramos dos lóbulos más: el lóbulo caudado y el lóbulo cuadrado.

El hígado recibe entre el 20-35% del aporte sanguíneo a través de la arteria hepática procedente del tronco celíaco, que aporta sangre rica en oxígeno y entre el 65-80% a través de la vena porta procedente del bazo, páncreas, estómago e intestino.

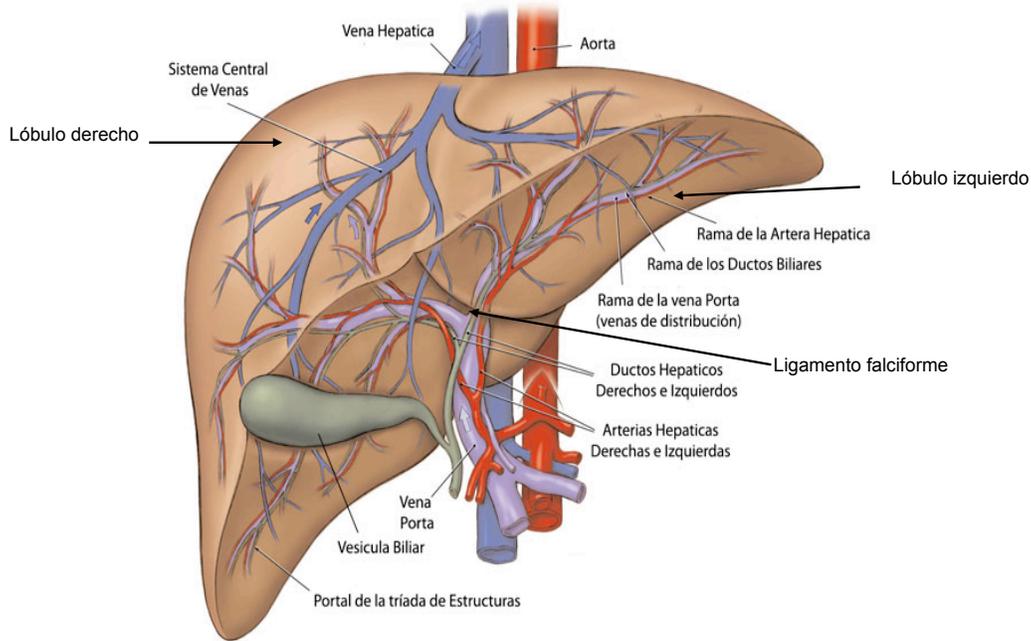


Fig-I1. Anatomía interna del hígado. Imagen tomada del libro “Nociones fundamentales de endocrinología y criminología” perteneciente a la Biblioteca online Gnóstica.

La unidad estructural y funcional del parénquima hepático es el acino hepático formado por la porción de tejido asociado a las ramas terminales de la vena portal y la arteria hepática y a un conducto biliar (**Fig-I2**). En el acino hepático, la sangre procedente de la arteria hepática y de la vena porta se mezcla en los sinusoides hepáticos.

Se pueden distinguir tres zonas acinares denominadas zonas 1, 2 y 3 de Rappaport (Rappaport, 1973) de tal manera que los hepatocitos situados cerca de los espacios porta (zona 1) son los primeros expuestos a la sangre aferente y reciben las concentraciones más elevadas de solutos de procedencia arterial y portal, mientras que los hepatocitos centrolobulillares (zona 3) reciben menores concentraciones de oxígeno,

nutrientes, señales hormonales y toxinas procedentes de la circulación aferente (Gumucio,1983).

En el hígado se distinguen varios tipos células:

- Células epiteliales:

- Hepatocitos, que son la fracción celular que forma el parénquima hepático
- Colangiocitos, que son las células que tapizan los conductos biliares

Los hepatocitos representan alrededor del 60% de las células del hígado y ocupan casi el 80% del volumen parénquimal, mientras que los otros tipos celulares ocupan aproximadamente el 6.5% del volumen hepático, y los espacios extracelulares ocupan el 16-20%.

- Células sinusoidales:

- Células endoteliales
- Macrófagos hepáticos o células de Kupffer
- Células estrelladas que pueden almacenar gotas lipídicas cargadas de vitaminas liposolubles o pueden diferenciarse a fibroblastos.

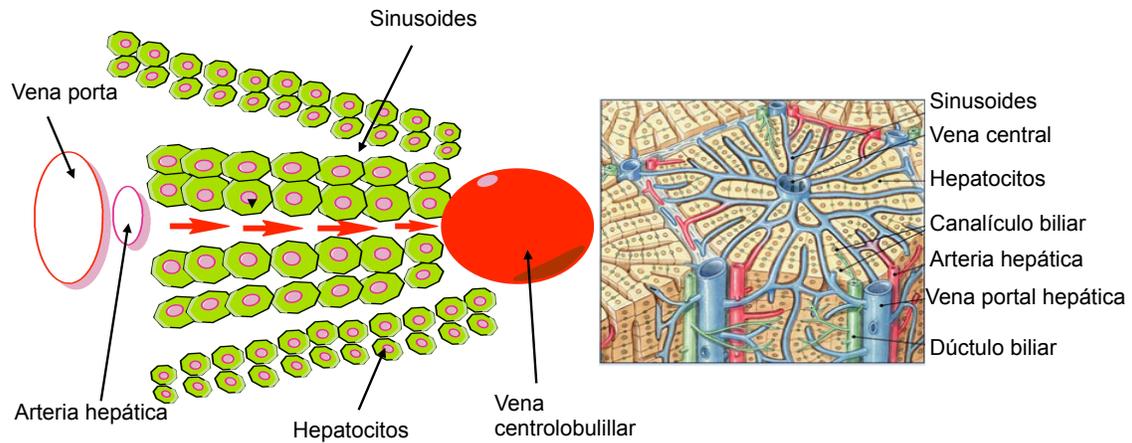


Fig-12. Esquema del acino hepático. Las flechas rojas indican el sentido de la circulación de la sangre a través del acino, desde las ramas de la vena porta y arteria hepática hacia la vena centrolobulillar, a través de los sinusoides.

El hepatocito

Los hepatocitos son las células mayoritarias del hígado. Se trata de una célula poliédrica de marcada polaridad con un diámetro medio de 25 μm . Su membrana celular posee tres regiones de distinta especificidad morfológica y funcional (Evans, 1980; Meier, 1988):

- **Membrana sinusoidal:** hacia el polo sanguíneo o espacio de Disse, formada por microvellosidades que crean una gran superficie de intercambio (Erlinger, 1982; Nathanson *et Boyer*, 1991).

- **Membrana lateral:** situada entre hepatocitos colindantes, (Meier, 1988). Contiene estructuras celulares como “tight junctions”, desmosomas y “gap junctions” que mantienen la adhesión mecánica y la conexión funcional entre los hepatocitos adyacentes (Meier, 1988),

- **Membrana canalicular:** es una invaginación de la superficie de la membrana celular del hepatocito, que al juntarse con la de los hepatocitos colindantes forman la estructura de canalículo biliar. Para que ésta se mantenga y puedan realizarse funciones secretoras típicas de esta membrana, alrededor de los canalículos biliares, el área citoplasmática adyacente es rica en filamentos y microtúbulos y pobre en orgánulos (Meier, 1988; Watanabe *et al.*, 1991). Esta membrana también presenta numerosas microvellosidades hacia la luz canalicular.

Las funciones del hígado

Entre las funciones del hígado, llevadas a cabo por el hepatocito cabe destacar su participación en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas, lípidos, y de los constituyentes de la bilis. Además juega un papel clave en la detoxificación de sustancias endógenas y xenobióticas.

- **Metabolismo de hidratos de carbono:** el tejido hepático juega un papel importante en el control de la homeostasis de la glucosa, ya que una de sus funciones es la de suministrar glucosa de forma continua al organismo. También es el encargado de sintetizar, almacenar y degradar los monosacáridos polimerizados en forma de glucógeno a través de los procesos de glucogénesis y glucogenólisis. La glucosa también es sintetizada en el hepatocito a través de la ruta de la gluconeogénesis a partir de precursores como el lactato, el glicerol y aminoácidos.

- **Metabolismo de lípidos:** prácticamente la totalidad de los componentes de las lipoproteínas se sintetizan en el hígado. El hepatocito sintetiza ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos a partir de hidratos de carbono y glicerol. También es una fuente importante junto con la dieta de colesterol (síntesis de *novo*) y a partir de éste es capaz de sintetizar los ácidos biliares (ABs), de los que se hablará en apartados

posteriores. En el hepatocito también se llevan a cabo procesos del catabolismo de lípidos como es la oxidación de ácidos grasos (β -oxidación).

- **Metabolismo nitrogenado:** el hepatocito sintetiza la mayoría de las proteínas plasmáticas, como la albúmina, que es la mayoritaria en plasma, o como los factores de coagulación fibrinógeno y protrombina. También lleva a cabo la producción de urea a partir de los aminoácidos y el catabolismo de bases púricas y pirimidínicas.

- **Secreción de bilis:** el hígado es el encargado de la secreción de la bilis, la cual es necesaria para la digestión de los alimentos y excreción de productos de desecho. La bilis es secretada hacia la vía biliar y posteriormente, al duodeno.

- **Otras funciones:** el hígado también es un órgano hematopoyético durante la vida fetal encargado de la producción de glóbulos rojos en el feto a partir del primer trimestre del embarazo y es el principal lugar de almacenamiento de sustancias como la vitamina A, vitamina D, vitamina B12, hierro y cobre.

2.1.2. Intestino delgado

Anatomía e histología del intestino delgado

Es el componente más largo del tubo digestivo, se extiende desde el píloro hasta la unión del ciego con el colon ascendente. Su longitud promedio es de 6 a 7 m y está dividido en tres porciones anatómicas (**Fig-I3**):

- **Duodeno:** es la primera región, tiene la longitud de 20 a 25 cm y dispuesto en forma de "C". En la porción inicial aparecen las glándulas de Brunner en la submucosa, cuya secreción alcalina protege a la mucosa de la acidez del quimo. En la segunda porción aparecen dos salientes en la mucosa: carúncula duodenal mayor, donde se abre la ampolla de Vater, desembocadura conjunta del conducto pancreático principal (de Wirsung) y colédoco (de la vía biliar), y carúncula duodenal menor, que desemboca en el conducto pancreático accesorio (de Santorini).

- **Yeyuno:** se encuentra en el abdomen superior, de unos 2.5 m de largo. Comienza en el ángulo formado con el duodeno denominado ángulo duodeno yeyunal para desembocar en el íleon.

- **Íleon:** De unos 3.5 m, discurre distalmente para terminar en la válvula ileocecal, que es el límite con el intestino grueso (Martin *et al.*, 1994).

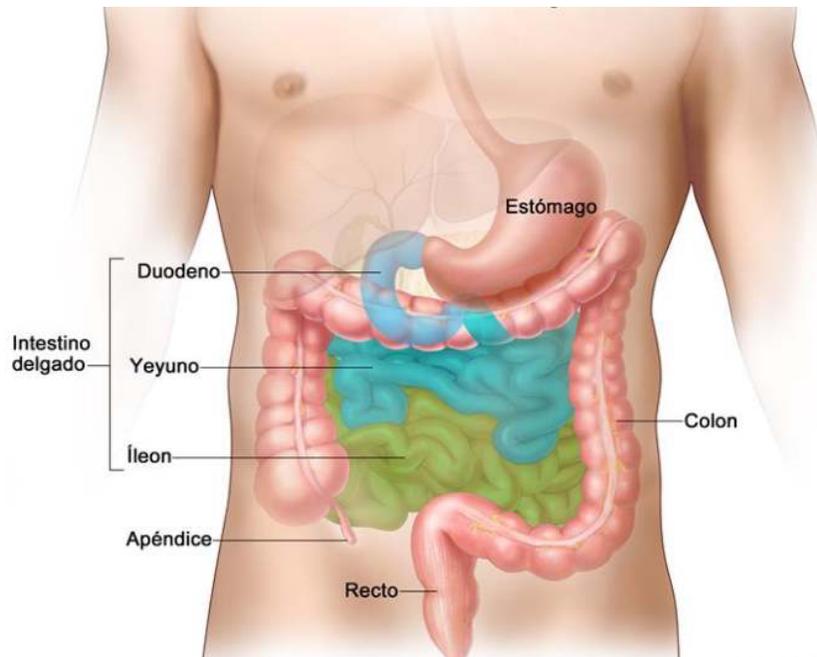


Fig-13. Anatomía interna del intestino delgado. Imagen tomada de <https://medlineplus.gov> .

La pared del intestino delgado, se encuentra conformada por cuatro capas bien diferenciadas, que desde la luz hacia fuera son (**Fig-14**):

- **Mucosa:** que consiste en una capa de epitelio que está especializado según las regiones, para las diferentes funciones digestivas, una capa de tejido conectivo, la lámina propia y una capa de músculo liso llamada muscular de la mucosa.

- Epitelio: compuesto por células caliciformes, absortivas superficiales y APUD.
 - Lámina propia: compuesta por tejido conectivo laxo. Contiene diferentes tipos celulares: células madre, caliciformes, cilíndricas, células de Paneth, fibroblastos, fibrocitos, endotelio vascular, células musculares lisas, varios tipos celulares sanguíneos y miofibroblastos subepiteliales intestinales que secretan diferentes factores de crecimiento esenciales para la proliferación y diferenciación celular. Por todo ello, la lámina propia no solo representa el entramado que sustenta el epitelio intestinal sino que, además, regula diferentes aspectos de su funcionalidad (Leedham *et al.*, 2005).
 - Muscular de la mucosa: formada por dos capas de músculo liso circular interno y longitudinal externo.
- **Submucosa:** es una capa de tejido conjuntivo denso, rico en fibras elásticas. Contiene también grupos ocasionales de células adiposas. En el duodeno, esta capa está ocupada en gran parte por las glándulas de Brunner (glándulas mucosas submucosas) pertenecientes a las vellosidades intestinales.
- **Muscular:** se compone de dos capas, la longitudinal externa y la circular de músculo liso, aunque también existen algunas fibras musculares lisas que pasan de una a otra capa. Entre ambas se sitúa el plexo mesentérico de Auerbach.
- **Serosa:** es la capa mas externa de la pared intestinal. Está cubierta por el peritoneo y localizada dentro de la cavidad abdominal. Es una membrana que consiste en un epitelio simple plano (mesotelio) y una pequeña cantidad de tejido conjuntivo (Ross *et al.*, 2005).

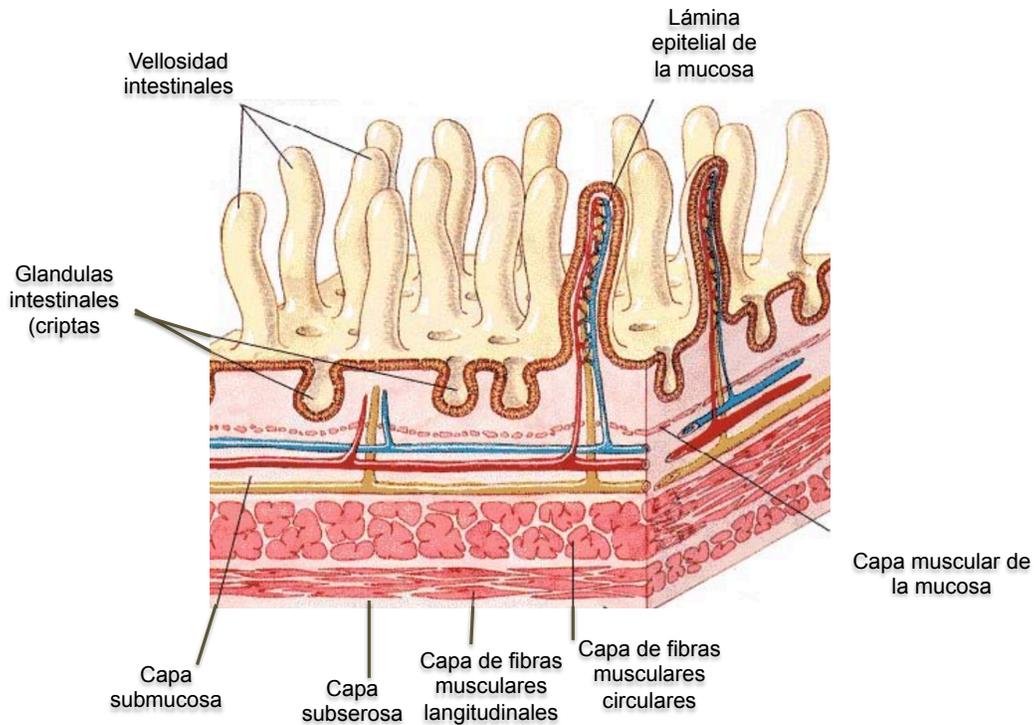


Fig-14. Esquema de las capas del intestino delgado. Imagen tomada de <http://www.unhealthline.com/human-body-maps/small-intestine>.

Funciones del intestino delgado

Las funciones principales del intestino delgado son la digestión y la absorción nutrientes y minerales de la dieta.

Absorción

La absorción es el movimiento de nutrientes, agua y electrolitos desde el lumen del intestino a las sangre. Existen dos vías de absorción, una celular y otra paracelular. En la vía celular, la sustancia atraviesa la membrana apical (luminal), penetra en la célula epitelial y a continuación es forzada hacia el exterior a través de la membrana basolateral hasta la sangre. Una gran variedad de transportadores situados en las

membranas apical y basolateral son responsables de muchos de los procesos de absorción.

En la vía paracelular, las sustancias se mueven a través de uniones herméticas entre las células epiteliales, por los espacios intercelulares, hacia la sangre.

La estructura de la mucosa intestinal es idónea para la absorción de cantidades grandes de nutrientes. Las características estructurales denominadas vellosidades y microvellosidades aumentan el área de superficie del intestino delgado, maximizando la exposición de los nutrientes a las enzimas digestivas y creando una superficie de absorción grande. La superficie del intestino delgado esta dispuesta en pliegues longitudinales, denominados pliegues de Kerckring. Las vellosidades tienen forma de dedos y se proyectan a partir de estos pliegues. Son mas largas en el duodeno, donde se produce la mayor parte de la digestión y la absorción, y más cortas en el ileon terminal. Las superficies de las vellosidades están recubiertas de células epiteliales (enterocitos) intercaladas con células secretoras de moco (células con forma de copa). La superficie apical de las células epiteliales se expande aun más gracias a pliegues diminutos denominados microvellosidades. La superficie de la microvellosidad se denomina borde en cepillo debido a su aspecto al microscopio. En conjunto, los pliegues de Kerckring, las vellosidades y las microvellosidades aumentan el área total unas 600 veces.

Las células epiteliales del intestino delgado poseen uno de los índices de recambio mas altos de cualquiera de las células del cuerpo, ya que son sustituidas cada 3 a 6 días. Este índice de recambio tan alto de las células mucosas las convierte en las células particularmente sensibles a los efectos de la irradiación y la quimioterapia (Costanzo *et al.*, 2011).

Digestión

Los alimentos ingeridos y procesados de forma mecánica sufren la acción de las enzimas digestivas y de los ABs para que puedan entonces ser absorbidos y después distribuidos a los tejidos del cuerpo.

Digestión de las proteínas

Aunque la digestión de las proteínas comienza en el estómago, por la acción de la pepsina y el ácido clorhídrico, continúa a lo largo del intestino. En el intestino delgado es llevada a cabo por la acción de la tripsina y la quimotripsina, carboxipeptidasas y elastasa, secretadas por el páncreas que descomponen las proteínas procedentes de la dieta en pequeños péptidos.

Digestión de los lípidos

Las enzimas, como la lipasa secretada por el páncreas, actúan sobre las grasas y lípidos ingeridos. Descomponen los triglicéridos en ácidos grasos libres y en monoglicéridos. Ésto se consigue con la ayuda de los ABs secretados por el hígado. Los ABs mantienen los triglicéridos en un ambiente acuoso hasta que la lipasa pueda descomponerlos en partes más pequeñas para que puedan ser captados por las vellosidades intestinales por absorción.

Digestión de hidratos de carbono

Aunque la digestión de los azúcares comienza en la boca, los hidratos de carbono se degradan a oligosacáridos y a monosacáridos como la glucosa por la acción de la amilasa pancreática. Otros carbohidratos pasan, sin ser digeridos, a lo largo del intestino donde, dependiendo del tipo, pueden ser descompuestos por las bacterias intestinales.

2.2. ÁCIDOS BILIARES

Los ABs son compuestos anfipáticos que se forman en el hígado como resultado del metabolismo del colesterol, obteniéndose ácidos carboxílicos mono-, di- o trihidroxilados, fácilmente secretables y con utilidad en los procesos digestivos (Monte *et al.*, 2009).

Los ABs son esteroides con veinticuatro átomos de carbono, cuyo grupo carboxilo en la cadena lateral suele estar conjugado con glicina o taurina (Lester, 1983). Los ABs primarios, sintetizados directamente por el hígado, son el ácido cólico (AC, 3 α , 7 α , 12 α -

trihidroxi-5 β -colanoico) y el ácido quenodesoxicólico (AQDC, 3 α , 7 α -dihidroxi-5 β -colanoico) mostrados en **Fig-15**. A su paso por el intestino, las bacterias de la flora intestinal los degradan dando lugar a los ABs secundarios (Ridlon *et al.*, 2006).

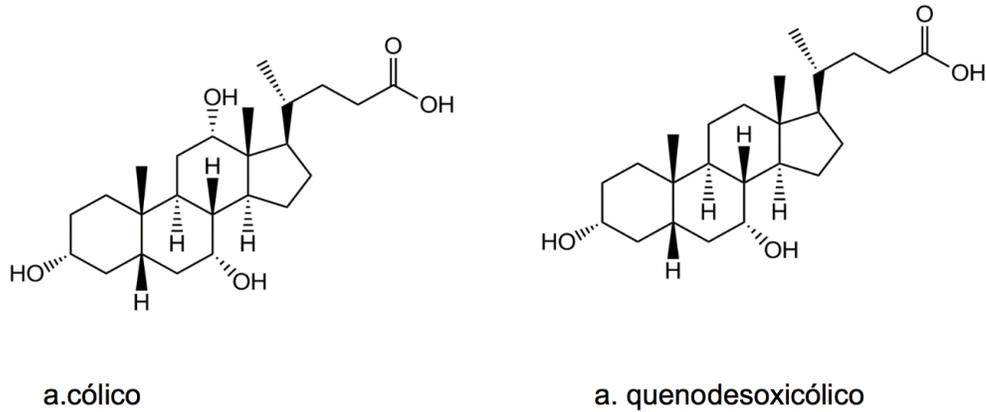


Fig-15. Estructura química de los ABs primarios, el ácido cólico (AC,3 α , 7 α , 12 α , trihidroxil-5 β -colanoico) y el ácido quenodesoxicólico (AQDC, 3 α , 7 α -dihidroxi-5 β -colanoico).

2.2.1. Biosíntesis de los ácidos biliares

Existen dos rutas metabólicas principales a partir de las cuales se sintetizan los ABs primarios a partir del colesterol (Monte *et al.*, 2009), tal como se muestra en la **Fig-16**.

- **Vía clásica o neutra:** sus productos principales son el AC y el AQDC, que se generan a partir de metabolitos intermedios de naturaleza neutra.
- **Vía alternativa o vía ácida:** el producto mayoritario de esta vía es el AQDC, generado a través de metabolitos intermedios de carácter ácido.

La principal vía para la síntesis de los ABs en humanos en condiciones fisiológicas es la vía neutra (**Fig-I6**), que se inicia por hidroxilación del colesterol en la posición 7 α gracias a la acción de la enzima microsomal perteneciente a la familia citocromo P450, colesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7A1), localizada en el retículo endoplásmico.

En cambio, durante la vida fetal y en ciertas patologías hepáticas, parece que la vía ácida podría ser la vía predominante (**Fig-I6**). En esta vía el paso limitante es la hidroxilación en el C27 de la cadena lateral, llevada a cabo por la enzima mitocondrial esterol 27-hidroxilasa (CYP27A1) (Deleze *et al.*, 1978; Bjorkhem, 1992). Posteriormente los compuestos intermedios generados a través de la acción de CYP27A1 se hidroxilan en la posición 7 α por la acción de la enzima oxisterol 7 α -hidroxilasa (CYP7B1).

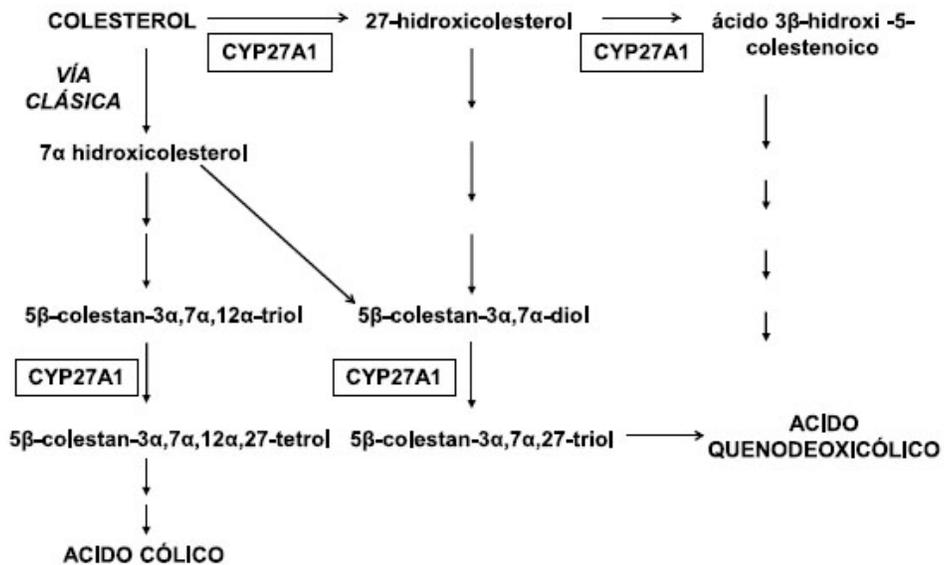


Fig-I6. Vías enzimáticas de la síntesis de ácido cólico y ácido quenodesoxicólico por la vía clásica a partir de la hidroxilación del colesterol y de la síntesis de ácido quenodesoxicólico por la vía ácida.

2.2.2. Conjugación de los ácidos biliares

Las principales biotransformaciones que experimentan los ABs son conjugaciones con aminoácidos (glicina o taurina). La enzima ácido biliar-CoA: aminoácido N-acetiltransferasa (BAAT, de sus siglas en inglés “bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase”) es la encargada del paso final de la síntesis de los ABs y de la reconjugación de los mismos con glicina o taurina para que puedan permanecer en la circulación enterohepática (Rembacz *et al.*, 2010). Otras reacciones de biotransformación que sufren los ABs son la sulfatación y la glucuronidación, aunque son vías minoritarias en individuos sanos. En cambio en situaciones de colestasis, cuando los ABs se acumulan en el hepatocito, sufren estas reacciones de conjugación para poder ser excretados por vía renal (Hofmann *et al.*, 1994).

2.2.3. Transporte hepático e intestinal de los ácidos biliares

Una vez sintetizados, los ABs son secretados a la bilis y concentrados en la vesícula biliar. Tras la ingesta, alcanzan el duodeno donde llevan a cabo sus funciones de digestión y absorción de las grasas y vitaminas liposolubles.

El 95% de los ABs intestinales se recuperan por transporte activo en el íleon llevado a cabo por el transportador ASBT “Apical Sodium Bile acid Transporter” gen *SLC10A2* (Craddock *et al.*, 1998), como muestra la **Fig-17**. Se trata de un mecanismo de cotransporte de una molécula de AB con 2 Na⁺. En el interior de ileocito el transportador citoplasmático IBABP (“Ileal Bile Acid Binding Protein”), gen *FABP6*, es el encargado de movilizar los ABs desde la membrana apical a la basolateral, donde a través del heterodímero OST α /OST β (de “Organic Solute Transporter”), genes *SLC51A* y *SLC51B*, son expulsados a la circulación portal (Dawson *et al.*, 2005).

A través de la sangre portal, y en menor medida por la arteria hepática, los ABs llegan al hígado, donde son captados a través de un proceso sodio-dependiente mediado por el transportador NTCP (“Na⁺-Taurocholate Co-transporting Polypeptide”, gen *SLC10A1*) (Hagebuch *et Meier*, 1994). También tiene lugar una captación de ABs independiente de sodio a través de miembros de la familia OATP (“Organic Anion

Transporting Polypeptides”) principalmente las isoformas 1B1 (gen *SLCO1B1*) y 1B3 (gen *SLCO1B3*) (Kullak-Ublick *et al.*, 2001).

La secreción canalicular de los ABs depende de su naturaleza iónica. Así, los ABs monoaniónicos, son expulsados al canalículo biliar a través de un proceso ATP-dependiente mediado por la bomba exportadora BSEP (“Bile Salt Export Pump, gen *ABCB11*”) (Gerloff *et al.*, 1998), mientras que los ABs sulfatados o glucuronidados son transportados por otras proteínas ABC, como la MRP2 (gen *ABCC2*) (Akita *et al.*, 2001) o la BCRP (gen *ABCG2*) (Blazquez *et al.*, 2011).

La gran especificidad de estos transportadores hepáticos e intestinales permite explicar los bajos niveles de los ABs en sangre, generalmente por debajo de 10 μM en individuos sanos (El-Mir *et al.*, 2001).

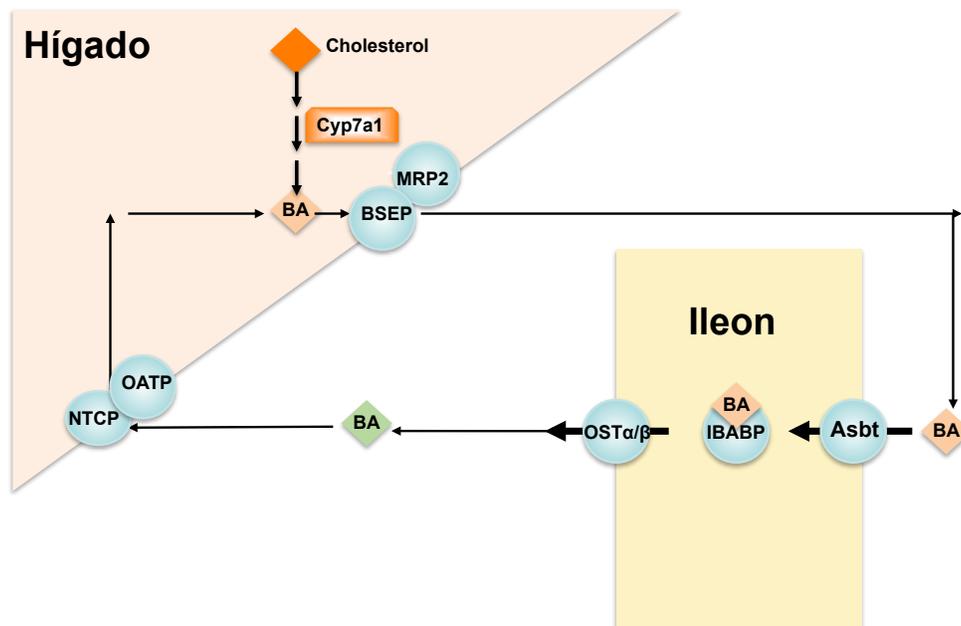


Fig-I7. Mecanismos de transporte activo para la recaptación de ácidos biliares intestinales desde el íleon y al hígado.

2.2.4. Funciones de los ácidos biliares

En el intestino

- Los ABs en el intestino forman micelas que favorecen la digestión y la absorción intestinal de las grasas de la dieta y de las vitaminas liposolubles (A, E, D y K).
- Activan las lipasas intestinales.
- Aceleran el transporte de lípidos.
- Modulan la motilidad intestinal, la secreción de hormonas gastrointestinales como la colecistoquinina, la secreción de agua y electrolitos (Combettes *et al.*, 1992).

En el hígado

- Generan la fracción del flujo biliar dependiente de ABs.
- Estimulan la contracción canalicular.
- Inducen la secreción biliar de fosfolípidos y colesterol.
- Modulan la síntesis *de novo* del colesterol y el número de receptores de membrana para las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

En la bilis

- Forman micelas para transportar sustancias hidrofóbicas como colesterol, protoporfirinas, etc.
- Actúan como soluciones amortiguadoras para el Ca^{2+} (Hofmann, 1988).

Otras funciones

Los ABs desempeñan un papel como moléculas señalizadoras en gran variedad de tejidos, con funciones sistémicas endocrinas a través de la activación de receptores nucleares (Houten *et al.*, 2006). Así, también podrían estar involucrados en el origen de

la respuesta adaptativa en colestasis y en otros daños hepáticos (Chiang *et al.*, 2002; Elorante *et al.*, 2005; Gerier *et al.*, 2007).

Por otra parte, en los últimos años, se ha sugerido que los ABs podrían estar involucrados en procesos de proliferación y diferenciación celular, secreción o apoptosis (Ahrendt *et al.*, 2000; Boberg *et al.*, 2000; Furubo *et al.*, 1999; Isa *et al.*, 2002; Tannapfel *et al.*, 2000). Algunas especies moleculares de ABs modulan la síntesis del ADN durante la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial en roedores (Marin *et al.*, 1993; Monte *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2006) y algunas de estas especies de ABs podrían jugar un papel importante en la aparición del cáncer gastrointestinal o incluso mamario (Costarelli *et Sander*, 2002; Raju *et al.*, 1990).

También se ha descrito que los ABs podrían jugar un papel importante en la regulación de la homeostasis glucídica y lipídica (Houten *et al.*, 2006). Recientemente se ha observado en modelos animales, que los ABs podrían prevenir el desarrollo de resistencia a la insulina y la aparición de obesidad inducida por la dieta (Ikemoto *et al.*, 1997), lo que supondría una implicación de los ABs en la regulación del metabolismo de la glucosa.

2.3. RECEPTORES NUCLEARES

2.3.1. Concepto y tipos

La superfamilia de receptores nucleares (NR, del inglés “Nuclear Receptor”), está constituida por más de 150 miembros capaces de activar o inhibir la transcripción de genes (Blumberg *et Evans*, 1998; Kliewer *et al.*, 1999; Mangelsdorf *et Evans*, 1995). Así por ejemplo, a nivel enterohepático, la unión de ABs a NRs puede modular la expresión de sus transportadores y el metabolismo de estos compuestos, o incluso favorecer o imposibilitar la respuesta a otro factor de transcripción, en condiciones fisiológicas y patológicas (Arrese *et al.*, 2002).

En general, estos factores de transcripción contienen los siguientes dominios:

- N-terminal de transactivación independiente de ligando (AF1, "Activation Function-1").
- Dominio central de unión al ADN (DBD, "DNA Binding Domain").
- Región bisagra que conecta el DBD con el dominio de unión a ligando.
- Dominio de unión a ligando C-terminal (LBD, "Ligand Binding Domain") (Aranda *et al.*, 2001; Chawla *et al.*, 2001).

Los NRs pueden localizarse en el citoplasma o en el núcleo, y llevan a cabo su acción por unión, ya sea en forma de monómeros, homodímeros o heterodímeros a los llamados elementos respuesta (ER), que son zonas específicas del gen diana con función reguladora. Los ER suelen contener seis pares de bases separadas por una región de entre cero y ocho nucleótidos. (Aranda *et al.*, 2001).

La expresión de un NR está condicionada por diferentes factores, entre los que destacan el tipo y tiempo de vida celular, el promotor y el ER al que se unan y por diferentes mecanismos de señalización intracelular e intranuclear (Smirlis *et al.*, 2001).

Tipos de NRs

La clasificación de los NRs puede realizarse de dos maneras:

Atendiendo a sus ligandos fisiológicos y sus funciones potenciales, los NR se clasifican en los siguientes grupos:

- **Receptores endocrinos:** donde se incluyen receptores que se unen a hormonas, como el receptor de glucocorticoides (GR, "Glucocorticoid Receptor"), el receptor de mineralocorticoides (MR, "Mineralocorticoid Receptor"), el receptor de andrógenos, de estrógenos, de progesterona y de hormonas tiroideas (TR, "Thyroid Hormone Receptor").
- **Receptores huérfanos adoptados:** debido a su homología en secuencia con los receptores endocrinos se les asignó este nombre. A este grupo pertenecen entre otros

el receptor de ABs FXR (“Farnesoid X Receptor”), del que se hablará en las secciones posteriores, el RXR (“Retinoid X Receptor”), PXR (“Pregnane X Receptor”), LXR (“Liver X Receptor”), PPAR γ y PPAR α (“Peroxisome Proliferator-Activated Receptor”). Muchos NRs se unen a sus ER como heterodímeros con el RXR (Mangelsdorf *et Evans*, 1995). Es posible que los receptores de este grupo puedan utilizarse en el futuro como dianas farmacológicas en desórdenes metabólicos (Lefebvre *et Semple*, 2006).

- **Auténticos receptores huérfanos:** esta tercera clase incluye a aquellos receptores cuyos ligandos son desconocidos (Mangelsdorf *et Evans*, 2014)

Atendiendo a su localización subcelular en ausencia de ligando se clasifican en:

- **NRs de Tipo I:** se encuentran en el citoplasma. La unión a su ligando produce un cambio conformacional que produce su liberación de las proteínas “heat shock” (HSP), para posteriormente homodimerizarse y traslocarse al núcleo donde ejercen su función

- **NRs de Tipo II:** se localizan en el núcleo independientemente de que estén unidos o no a su ligando. En esta última situación se encuentran unidos a proteínas co-represoras, que se disocian tras su unión a ligando, situación que además implica el reclutamiento de proteínas co-activadoras y del complejo de iniciación de la transcripción con la ARN polimerasa (Novac *et Heinzl*, 2004).

2.3.2. FXR

Como se ha indicado anteriormente, desde que se descubrió su activación por ABs, el FXR se ha clasificado como NR de tipo huérfano adoptado (Sonoda *et al.*, 2008., Makishima *et al.*, 1999., Parks *et al.*, 1999). Además de desempeñar un papel crucial en la homeostasis de los ABs, también interviene en la regulación del metabolismo del colesterol y de la glucosa, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Maglich *et al.*, 2003).

Estructura genética

Actualmente, se conoce la existencia de dos genes de FXR denominados FXR α y FXR β . El gen FXR α está muy conservado, presentando analogías en la secuencia desde los peces hasta el ser humano (Maglich *et al.*, 2003). En humanos el gen que codifica para FXR α (*NR1H4*) se localiza en cromosoma (12q23). En cambio el gen FXR β se expresa sólo en roedores, aunque se conserva como pseudogen en humanos (Otte *et al.*, 2003).

FXR se compone de once exones y diez intrones y presenta dos promotores diferentes situados “aguas arriba” del exón 3. Debido a un fenómeno de splicing alternativo se obtienen las cuatro isoformas de FXR α en humanos y cuya nomenclatura actual es: FXR α 1, FXR α 2, FXR α 3, FXR α 4.

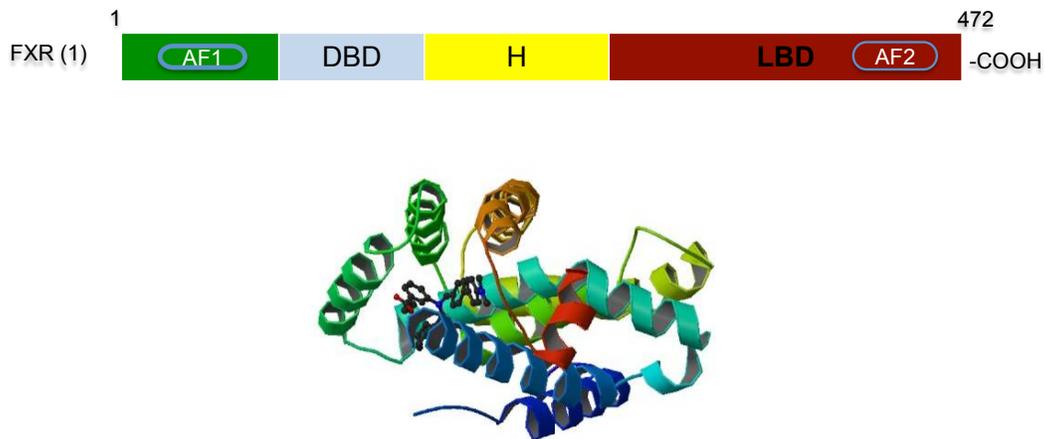


Fig-18. Estructura y transcrita del gen FXR humano.

Distribución tisular

En humanos, se ha descrito que las isoformas FXR α 1 y FXR α 2 se expresan en el hígado y glándulas suprarrenales, mientras que en colon y riñón se expresan exclusivamente las isoformas FXR α 3 Y FXR α 4. En el intestino delgado (íleon) se expresan todas las isoformas en niveles muy similares y no se detecta FXR en el cerebro, pulmón, músculo esquelético ni corazón (Huber *et al.*, 2002), aunque, existe controversia sobre la presencia de este NR en el músculo cardíaco (Bishop-Bailey *et al.*, 2004).

FXR es uno de los numerosos NRs que se expresan en células del sistema inmune humano, como en células mononucleadas y en linfocitos (Schote *et al.*, 2007).

Papel fisiológico de FXR: Regulación del metabolismo y el transporte de ácidos biliares mediado por FXR

La biosíntesis hepática y el transporte enterohepático de ABs son procesos que deben ser regulados de forma coordinada para mantener constante el tamaño del pool de ABs. En este sentido, por una parte, FXR regula en gran medida la expresión de transportadores hepáticos e intestinales y, por otra, los ABs que circulan en el sistema enterohepático activan FXR a nivel hepático (Trauner *et Boyer*, 2003) reprimiendo la síntesis de ABs mediante la inhibición de la expresión de la enzima llave de su síntesis CYP7A1 a través de SHP ("Small Heterodimer Partner") (Goodwin *et Lu*, 2000), y promoviendo la conjugación de ABs mediante la inducción de la enzima BAAT. Además, FXR controla la entrada de ABs al hígado mediante la inhibición de NTCP y su secreción al intestino delgado mediante la inducción de la expresión de BSEP y MRP2, ambas inducidas a nivel transcripcional por FXR (Ananthanarayanan *et al.*, 2001; Kast *et al.*, 2002).

En el intestino delgado, la activación de FXR induce la expresión de IBABP (Grober *et al.*, 1999) y OST α / β (Landrier *et al.*, 2006) e inhibe la expresión de ASBT. Esta inhibición ocurre también a través de SHP (Neimark *et al.*, 2002).

En situaciones en las que los ABs se acumulan a concentraciones tóxicas, FXR induce la expresión hepática de OST α/β , MRP3 y MRP4 (Dawson *et al.*, 2005), para permitir la eliminación de ABs por la orina, y de las enzimas de reacción de fase I CYP3A4, que cataliza la hidroxilación de ABs en diferentes posiciones (Araya *et Wikvall*, 1999; Bodin *et al.*, 2005), y de fase II como SULT2A1 (Song *et al.*, 2001) y UGT2B4 (Barbier *et al.*, 2003), que llevan a cabo reacciones de sulfatación y glucuronidación de ABs, respectivamente.

Regulación de la síntesis de ácidos biliares a través de la regulación hepática de la expresión de CYP7A1 por FXR

Los propios ABs son capaces de reprimir su síntesis mediante un mecanismo en el que el FXR hepático e intestinal funcionan de manera sinérgica. La reacción catalizada por la enzima CYP7A1 es la etapa limitante de este proceso biosintético (Russell, 2003). La regulación de la expresión de esta enzima es compleja, ya que en ella intervienen varios NRs, entre los que se encuentran LRH-1 y HNF4 α , que se unen a secuencias reguladoras en el gen *CYP7A1* y activan su expresión. La represión de *CYP7A1* mediada por FXR tiene lugar a través de una regulación directa del gen *SHP* por FXR. SHP es un peculiar receptor nuclear desprovisto de DBD, que ejerce una actividad represora tras dimerizar con varios receptores nucleares, entre los que se incluyen LRH-1 y HNF4 α (Goodwin *et Lu*, 2000). Sin embargo, en ratones *knock-out* para SHP, los ABs siguen siendo capaces de reprimir la expresión de CYP7A1, lo que indica la existencia de otro mecanismo independiente de SHP implicado en la represión de esta enzima. Aquí es donde entra en juego el FXR expresado en el intestino delgado que, tras ser activado por los ABs absorbidos en el íleon, induce la expresión de FGF19 (“Fibroblast Growth Factor 19”). Esta hormona es secretada a la circulación portal y alcanza el hígado, donde se une a su receptor de membrana, el FGFR4 (“Fibroblast Growth Factor Receptor 4”) que dimeriza con el correceptor β -Khloto y reprime la expresión de CYP7A1 a través de una ruta dependiente de quinasas (Inagaki *et al.*, 2005). Este mecanismo constituye una vía de interacción entre el hígado y el intestino para la regulación de la síntesis de ABs. La utilización de ratones *knock-out* específicos de tejido ha permitido analizar la contribución relativa de cada órgano a la represión de

CYP7A1 y parece ser que el FXR intestinal tiene un papel más determinante (Kim *et al.*, 2007).

Del mismo modo, se ha descrito una regulación similar para la enzima CYP8B1, que regula la proporción de síntesis AC:AQDC en la vía clásica (Kim *et al.*, 2007 ; Zhang *et Chiang*, 2001).

Regulación de la expresión de CYP7A1 a través de la regulación intestinal mediada por FXR: Factor de crecimiento fibroblástico 19 (FGF19)

FGF19 en humanos y su homólogo en roedores Fgf15, es una proteína de 24 kDa que está cobrando importancia en el entendimiento del metabolismo hepático y en particular de sus funciones hormonales. FGF19/15, junto con otros dos factores de crecimiento fibroblástico, FGF21 y FGF23, comparten la característica de actuar como moléculas endocrinas con efectos en tejidos distantes.

FGF19/15, como se ha comentado en el apartado anterior, desempeña un papel principal en la regulación de la síntesis de ABs, pero también en el metabolismo glucídico y lipídico. Sus efectos en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos se llevan a cabo de manera coordinada con FGF21, que también tiene funciones metabólicas y funciona junto con FGF19 en un tándem de repercusiones metabólicas que emulan al tándem insulina/glucagón.

En relación con sus efectos sobre la regulación de la homeostasis de ABs, como se ha comentado en el apartado anterior, FGF19/15 se sintetiza en el íleon en respuesta a la absorción de ABs, tras su unión a FXR (para una revisión: Walters *et al.*, 2015).

FGF19/15 en suero aumenta después de las comidas. Esta elevación es mucho menor en los pacientes que han tenido una resección ileal o que padecen patologías que cursan con inflamación intestinal como la enfermedad de Crohn. También se ha propuesto la desregulación de la vía FXR/FGF19 como factor causal en el trastorno

conocido comúnmente como diarrea crónica debido a malabsorción idiopática de ABs. Además, el ácido obeticolico, un derivado semisintético de ABs y un agonista de FXR potente, estimula la producción de FGF19 lo que mejora los síntomas en estos pacientes.

Las acciones metabólicas de FGF19 también sugieren sus posibilidades terapéuticas en trastornos producidos por obesidad, diabetes y síndrome metabólico. Así, los sujetos obesos que presentan esteatosis hepática no alcohólica y/o síndrome metabólico, presentan niveles muy bajos de FGF19 en suero, que aumentan rápidamente después de la cirugía bariátrica. Es importante destacar que en colestasis extrahepática, el hígado humano, secreta FGF19, lo que podría tener un efecto autocrino beneficioso inhibiendo la actividad de CYP7A1 evitando así la acumulación de niveles tóxicos de ABs.

2.3.3. RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES

Estructura y actividad

Los glucocorticoides son hormonas producidas en la zona fascicular media de la corteza suprarrenal durante situaciones de estrés, como puede ser el ayuno, y ejercen una gran variedad de funciones metabólicas a través de su receptor, el GR (*NR3C1*). Durante el ayuno, los glucocorticoides promueven la gluconeogénesis hepática. En tejidos periféricos, promueven el catabolismo de aminoácidos, la lipólisis y suprimen el sistema inmunitario. El GR pertenece al grupo de los receptores endocrinos (Sonoda *et al.*, 2008) y fue el primer NR clonado (Chrousos *et Kino*, 2005).

Existen dos isoformas de GR en humanos, GR α y GR β , que son el producto de un mismo gen: GR α es el GR clásico que se une a glucocorticoides, mientras que GR β , que no se une a estas hormonas, presenta una actividad transcripcional intrínseca que es independiente de GR α y ejerce un efecto inhibitor sobre la transcripción mediada por GR α (Kino *et al.*, 2009; Oakley *et al.*, 1999).

El GR α se puede enmarcar dentro de los NRs tipo I, ya que en ausencia de glucocorticoides se encuentra inactivo en el citoplasma. En dicho estado permanece

unido a las proteínas HSPs 90, 70 y 50 y a las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52 (Davies *et al.*, 2002; Grad *et al.*, 2007; Pratt *et al.*, 2004). Tras su unión a glucocorticoides, el GR sufre un cambio conformacional, se disocia de las HSPs, homodimeriza y se dirige al núcleo, donde se une a los ER a GR en el promotor de sus genes diana.

En general, se pueden distinguir seis modos de acción del GR α a nivel celular (Beck *et al.*, 2009):

1. El GR α entra en el núcleo, se une al ER a glucocorticoides en el promotor de algunos genes, e induce la expresión de los mismos.
2. El GR α se transloca al núcleo y facilita la acción de otro u otros factores de transcripción.
3. El GR α entra en el núcleo, se une al ER a glucocorticoides y reprime la expresión de ciertos genes.
4. El GR α entra en el núcleo y dificulta la unión de otro u otros factores de transcripción.
5. El GR α no entra en el núcleo, pero incrementa la actividad de una proteína en el citoplasma.
6. El GR α reduce la actividad de una proteína en el citoplasma.

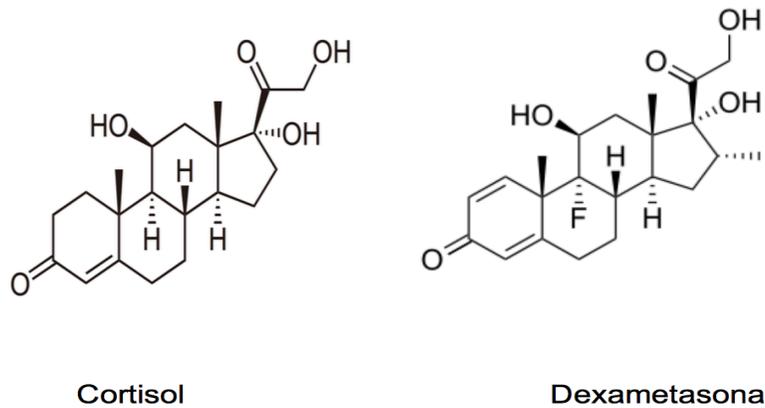


Fig-I9: Estructura química del cortisol y del fármaco dexametasona.

Efectos secundarios de los glucocorticoides a través de su receptor

Los análogos sintéticos de glucocorticoides se encuentran entre los fármacos más efectivos que se emplean de manera crónica en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como artritis, asma, Crohn y otras. También se utilizan en terapias farmacológicas del cáncer y del trasplante de órganos. Sin embargo, su utilidad se ve limitada debido a sus efectos secundarios, como son la dislipemia, pérdida de masa muscular, osteoporosis, problemas conductuales, problemas hepáticos, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa e incluso diabetes (Raalt *et al.*, 2009; Schäcke *et al.*, 2002).

En relación con los efectos indeseables sobre el hígado, cabe destacar el desarrollo de esteatosis hepática, elevación de transaminasas séricas, colelitiasis y colestasis.

Por otra parte en el síndrome de Cushing, caracterizado por el exceso de secreción endógena de glucocorticoides, los pacientes, además de algunos de los trastornos citados anteriormente, presentan un cuadro de hipercoagulabilidad debido al aumento de factores procoagulantes como son Factor VIII, Factor IX, Factor de von Willebrand y trombina. Este aumento podría estar relacionado con la elevación de los ABs, los cuales

además se correlacionan de manera positiva con los niveles de glucocorticoides en plasma de estos pacientes (Durovcová *et al.*, 2010), (Lu *et al.*, 2012; Van Zaane *et al.*, 2009).

Pese a los efectos negativos que conlleva el tratamiento o la exposición prolongada a los glucocorticoides sobre la funcionalidad hepática, el uso de los mismos también puede presentar efectos beneficiosos en el hígado. Así, la prednisona se ha utilizado en el tratamiento de la hepatitis autoinmune y la budesonida (BUD) en varios desordenes colestáticos. Ambas reducen los niveles séricos de marcadores de daño hepático y mejoran las lesiones histológicas, cuando se usan en combinación con ácido ursodesoxicólico (AUDC) (Czaja *et al.*, 2009; Rautiaine *et al.*, 2005).

Por tanto, los glucocorticoides parece que pueden presentar dos tipos de efectos sobre el hígado, o bien beneficiosos cuando se utilizan de manera controlada y por un tiempo limitado en desórdenes hepáticos, o bien perjudiciales cuando se encuentran en niveles patológicos o son administrados de manera crónica.

En nuestro grupo de investigación hemos encontrado evidencias de que existe una relación, aún no sabemos si directa o indirecta, entre los glucocorticoides y la expresión del propio FXR hepático y de sus genes diana. Así, el tratamiento de ratas con dexametasona (DEX) es capaz de inducir no sólo cambios en los niveles de ABs séricos y en su patrón de conjugación, también de enlentecer y disminuir la capacidad de secretarlos lo que puede ser también en parte reflejo de una reducción en la expresión de las dianas de Fxr, tales como Ntcp, Cyp7a1 y Baat, lo que sugiere que tanto el transporte como la síntesis y la conjugación de ABs pueden verse afectados por el tratamiento con glucocorticoides (Rosales *et al.*, 2013) **(Fig-110)**.

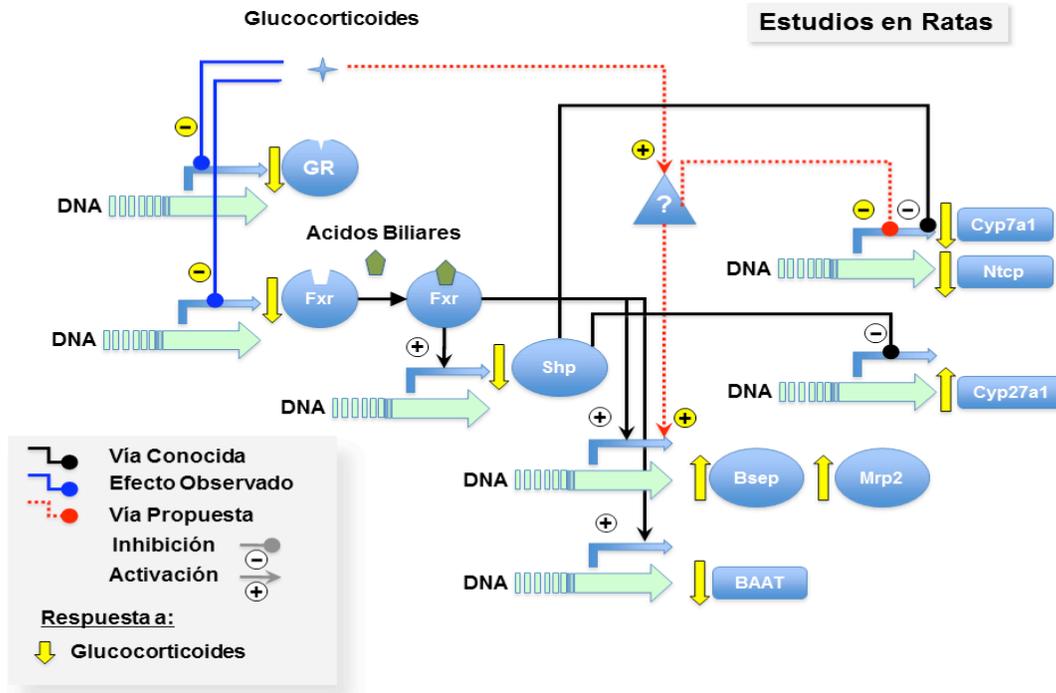


Fig-I10. Representación esquemática de la posible interacción entre los glucocorticoides y la vía de señalización de FXR en la regulación de la expresión de proteínas implicadas en la homeostasis de los ácidos biliares en hígado de rata (Rosales *et al.*, 2013).

3- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Material Biológico

Animales

Para llevar a cabo los estudios de esta Tesis Doctoral se utilizaron ratas Wistar macho y ratones C57BL/6 macho *wild-type* y *knock-out* para *Fxr*, procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (SEA). Los ratones *knock-out* para *Fgf15* se utilizaron en colaboración con los Dres. D. Matias Ávila y D. Iker Uriarte del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra. Los ratones *knock-out* para el receptor *Gr* de manera selectiva para el intestino se utilizaron en colaboración con los Dres. D. Fermín Sánchez de Medina y Dña. Olga Martínez-Augustín de la Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. Los animales se mantuvieron en habitaciones con temperatura y humedad controladas y con ciclos establecidos cada 12 de h de luz /oscuridad.

En todo momento los animales fueron tratados según las especificaciones de la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (*Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook*, 2ª edición, 2002) y bajo los protocolos establecidos por el SEA, previamente aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca, que se ajustan a las especificaciones de la Comunidad Europea (86/609/EEC, 2003/65/EC y 63/2010/UE) y la normativa española vigente para el uso y cuidado de animales utilizados en experimentación (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, RD 53/2013 y BOE-A-2013-1337).

Líneas celulares

En el desarrollo de este trabajo se empleó la siguiente línea celular:

- Alexander: hepatoma humano (ATCC: CRL-8024).

3.1.2. Productos y reactivos

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

- Abbot (Madrid): pentobarbital sódico (Nembutal N.R.).
- Air Liquid (Valladolid): nitrógeno líquido.
- AppliChem (Madrid): ácido morfolino propansulfónico (MOPS), agar, formamida y triptona.
- Applied Biosystems (Madrid): reactivos para PCR cuantitativa Power SYBR Green PCR Master Mix y SYBR[®]SelectMaster Mix.
- BDH (Poole, Inglaterra): Sacarosa.
- GE Healthcare (Madrid): enzimas de restricción, reactivos para la purificación de ADN de reacciones enzimáticas, para el aislamiento de ADN plasmídico a partir de bacterias PlasmidPrep Mini Spin Kit, para el aislamiento de ARN total Illustra RNAspin Mini Isolation Kit.
- Menarini Diagnostics: kit multiparmétrico Liver-1 consistente en tiras de bioquímica seca para medir parámetros indicativos de toxicidad hepática.
- Merck (Barcelona): acetato sódico anhidro, β-mercaptoetanol, etanol y formaldehído.
- Pronadisa (Hispalab S.A., Madrid): agarosa de bajo EEQ.
- Roche (Barcelona): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (Hepes).
- Santa Cruz Biotechnology (EEUU): el agonista de FXR GW4064.
- Sigma-Aldrich Química (Madrid): suero bovino fetal, medio de cultivo Minimum Essential Medium Eagle (MEM), dexametasona (DEX), prednisolona (PRED), budesonida (BUD), mifepristona (MFS), dimetilsulfóxido (DMSO), dodecil sulfato sódico (SDS), EDTA, tripsina, mezcla de antibióticos, azul de bromofenol, ampicilina, trizma base y xileno cianol.
- ThermoFisher (Madrid): el reactivo para transfección lipofectamina LTX, los patrones de pesos moleculares para ADN y ARN, el kit de retrotranscripción SuperScript[®] VILO[™] cDNA Synthesis Kit.
- VWR Internacional (Barcelona): bromuro de etidio, ácido acético.
- Waters (Madrid): cartuchos Sep-Pak Plus C18 para la extracción de ABs.

3.1.3. Medios instrumentales

Para realizar pesadas de sustancias sólidas se utilizó una balanza electrónica digital precisa 125A, y para pesar animales una balanza Sartorius BL 150S (Grupo Taper, Madrid).

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

El agua destilada y el agua ultrapura se obtuvieron con equipos de purificación de agua por osmosis inversa Milli-Ro 10 Plus y Milli-Q (Millipore Ibérica, Madrid).

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas 5417R y 5810R marca Eppendorf (Hucoa–Erloss, Madrid).

Para la PCR analítica y la transcripción reversa (RT) se utilizó un termociclador modelo Eppendorf Mastercycle ep Gradient (Thermo Fisher, Madrid). La cuantificación de los niveles relativos de ARNm se llevó a cabo en un equipo ABI Prism 7300 Sequence Detection System, de Applied Biosystems.

Las tiras de bioquímica seca para la determinación de toxicidad hepática se analizaron en un equipo Spotchem EZ SP-4430 de Menarini Diagnostics (Badalona).

Para politronar las muestras de tejido se utilizó un homogeneizador PolytronTyp PT 10/35 kinemática GMBH (Lucerna, Suiza).

Para realizar cultivos celulares se utilizó una campana de flujo laminar vertical modelo Telstar AV 30-70 (Telstar, Barcelona) y una estufa New Brunswick Scientific Co. Inc. (Pacisa Giralt, Grupo Taper). Se utilizaron placas de cultivo de seis pocillos y frascos Roux de cuello inclinado de la marca TPP (Biotech S.L., Madrid) en el cultivo de las líneas celulares. La esterilización de las soluciones se hizo mediante filtros Sterivex de 0.2 μm (Millipore Ibérica).

Para la determinación de ABs se usó un equipo de HPLC acoplado a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU). La columna cromatográfica de fase reversa Zorbax empleada era de Agilent Technologies (Madrid). Los reactivos y solventes para esta técnica fueron de grado HPLC. Los estándares de ABs se adquirieron en las casas Steraloids y Sigma.

Para la cuantificación de ADN o ARN se utilizó el espectrofotometro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher).

Para el crecimiento de bacterias se utilizó una estufa termostatzada a 37°C modelo S-20 (Selecta, Barcelona).

Para la visualización de la fluorescencia de los geles de ácidos nucleicos se empleó el equipo de captura y análisis de imagen Fujifilm LAS-4000 (TDI, Madrid).

Para la determinación de la viabilidad celular se empleó un espectrofotómetro ELISA ELx808 (BioTek, Alemania).

Como pequeño equipamiento de laboratorio se emplearon un agitador magnético calefactor Selecta (DueroLab), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington, EEUU) y micropipetas Wilson (Prosisa, Salamanca).

Todo el material de vidrio utilizado procedia de Afora (Madrid).

Las muestras se conservaron en congeladores de -20°C (Zanussi), -80°C (Revco, Pacisa) y en contenedores de nitrógeno líquido.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Modelos *in vivo*

Estudio del efecto *in vivo* del tratamiento con glucocorticoides en el modelo de rata Wistar

Para el estudio del efecto del tratamiento con glucocorticoides sobre la vía de señalización enterohepática de FXR, se utilizaron ratas Wistar macho de 200-300 g. Se les administró una suspensión de DEX, PRED o BUD en aceite de maíz, a una dosis de 50 mg/kg p.c. El tratamiento se llevó a cabo durante 4 días y la vía de administración fue intraperitoneal (i.p.). Se siguió el mismo procedimiento con ratas control a las que solo se les inyectó el vehículo. En otra serie de experimentos se realizaron tratamientos con dosis crecientes de DEX: 0.5, 1 y 5 mg/kg p.c. durante 7 días. El tratamiento se realizó utilizando DMSO como cosolvente y a las ratas control se les inyectó solución salina i.p. con la máxima concentración de DMSO utilizada para la preparación de la suspensión de DEX (DMSO <0.1%).

Finalizado el tratamiento, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico i.p. con una dosis de 50 mg/kg p.c. Se practicó una laparotomía ventral media y se procedió a la recogida de bilis, sangre, hígado e intestino.

Las muestras de bilis se obtuvieron mediante canulación del conducto biliar. Se recogió bilis durante 30 min en viales previamente tarados y el volumen se calculó al considerar la densidad relativa de la bilis aproximadamente igual a 1 g/ml (Klaassen *et al.*, 1974).

La sangre se recogió por venopunción de la vena cava y se utilizó para analizar los ABs en suero y para realizar los estudios de toxicidad hepática utilizando reactivos de química seca.

Las muestras de hígado e íleon se lavaron en solución salina y se embebieron en RNAlater o se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

Estudio del efecto *in vivo* del tratamiento con glucocorticoides en el modelo de ratón

Para el estudio del efecto del tratamiento con glucocorticoides sobre la vía de señalización de FXR, se utilizaron ratones machos (C57BL/6) de 25-30g. Se les administró una suspensión de DEX, PRED o BUD en solución salina utilizando como cosolvente DMSO, en diferentes dosis comprendidas entre 0 y 5.0 mg/kg p.c. El tratamiento se llevó a cabo durante 7 días y la vía de administración fue i.p. Se siguió el mismo procedimiento con los ratones del grupo control a los que solo se les inyectó solución salina con DMSO <0.1%.

Finalizado el tratamiento, los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico vía i.p. con una dosis de 50 mg/kg p.c. Se les practicó una laparotomía ventral media y se procedió a la recogida de bilis, sangre, hígado e intestino.

3.2.2. Modelos *in vitro*

Experimentos con líneas celulares

El medio de cultivo estéril para la línea celular Alexander, fue MEM suplementado con L-glutamina, bicarbonato sódico y piruvato sódico. Al medio se le añadió suero bovino fetal inactivado al 10% (v/v). La inactivación del suero se realizó a 56°C durante 30 min. También se añadió una mezcla de antibióticos y antimicóticos al 1% que contenía: penicilina (20 U/ml), estreptomina (0.02 mg/ml) y anfotericina B (0.05 µg/ml).

Tanto al recibir las células del proveedor como al recuperarlas del N₂ líquido en el que se conservaban por periodos largos de tiempo, la descongelación de los criotubos se hizo en condiciones de esterilidad en un baño a 37°C. Una vez descongeladas, se centrifugaron a 250 xg durante 10 min. El precipitado se resuspendió en el medio de cultivo indicado anteriormente y se pasó a frascos Roux de cultivo de superficie 25 cm² que se introdujeron en la estufa a 37°C, en atmósfera del 5% de CO₂ en aire y humedad relativa del 80%.

El crecimiento de las células se produjo tras la adhesión a la superficie de la placa o frasco de cultivo. Una vez confluyente el cultivo se realizó una tripsinización (siguiendo las instrucciones del proveedor) para desprender las células de la placa de cultivo, y así, poder realizar los pases, sembrar las placas para los distintos tipos de experimentos o bien congelar alícuotas para su almacenamiento.

Estudio del efecto de los glucocorticoides en líneas celulares

En estos estudios se emplearon células Alexander cotransfectadas con construcciones que contenían el ORF de FXR α 1 o de RXR, obtenidas en nuestro laboratorio por el Dr. Javier Vaquero utilizando la tecnología Gateway (Vaquero *et al.*, 2013). El medio de cultivo se sustituyó por otro que contenía 20 μ M de DEX o PRED 48 h después de la siembra y 24 h después de la transfección utilizando lipofectamina. Transcurridas otras 24 h, se añadió la cantidad correspondiente de GW4064 y MFS para alcanzar una concentración final de 1 μ M y 40 μ M respectivamente. Pasadas otras 24 h las placas se lavaron con PBS estéril y se procedió a tripsinizar las células para posteriormente aislar el ARN utilizando el kit comercial Illustra RNAspin Mini Isolation (GE Healthcare).

Para determinar la posible toxicidad de los compuestos ensayados, se realizó un ensayo de viabilidad celular en presencia de dosis crecientes de cada compuesto (de 0 a 100 μ M). Para ello, las células Alexander se sembraron a una densidad de 15000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (100 μ l/pocillo). A las 24 h se sustituyó el medio de cultivo por medio que contenía el compuesto de interés a la concentración deseada. La viabilidad celular se determinó mediante test de formazán, después de 24-48 h de incubación en presencia de los compuestos, según correspondiera.

3.2.3. Metodos de Biología Molecular

Cuantificación de ARNm por RT-PCR cuantitativa

Para determinar los niveles de expresión de genes se utilizó una variante de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, 1986). La PCR cuantitativa (RT-QPCR) se realizó en el termociclador ABI Prism 7300 (Applied Biosystem) utilizando SYBR Green I como fluorocromo. Para la cuantificación relativa del producto se determinó el ciclo umbral o cycle threshold (Ct) durante la fase exponencial del proceso. Los resultados se calcularon mediante de la fórmula de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Extracción de ARN total

Para extraer el ARN total a partir de homogenados de tejido se utilizo el kit comercial Illustra RNAspin mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para cuantificar la cantidad de ARN se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop.

Transcripción reversa (RT)

Para sintetizar el ADNc, se realizó una RT con 2 µg del ARN total extraído, utilizando el método comercial SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen).

Diseño de cebadores

Los cebadores o “primers” específicos para el ADNc codificante de cada una de las proteínas a estudiar se diseñaron con el programa “Primer Express” y su especificidad se chequeó con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabla MM-1. Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes humanos por RT-QPCR

Proteína/Gen	Cebador Forward(5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Amplicón(pb)	Nº de Acceso
GAPDH (<i>GAPDH</i>)	GGAGTCAACGGATTTGGTCGTA	AATTTGCCATGGGTGGAATCA	149	NM_002046
FXR (<i>NR1H4</i>)	TCTCCTGGGTGCGCTGACT	ACTGCACGTCCCAGATTTTAC	122	NM_005123
GR (<i>NR3C1</i>)	CTAATGGCTATTCAAGCCCCAGCAT	GTGCTGTCCTTCCACTGCTCTT	191	NM_000176
FGF21 (<i>FGF21</i>)	TGACCAGAGCCCCGAAAGTCT	CAGGGTCAAAGTGGAGCGATCCATA	137	NM_019113
FGF19 (<i>FGF19</i>)	GCGCACAGTTTGCTGGAGATCA	AGTCTTCCTCCGAGTACTGAAGCAG	134	NM_005117
BSEP (<i>ABCB11</i>)	ACATGCTTGCGAGGACCTTTA	GGAGGTTGCGTGCACCAGGTA	106	NM_003742
CYP27A1 (<i>CYP27A1</i>)	ACTGCACCAGTTACAGGTGCTTTACA	CCATGTCGTTCCGTAAGTGGTACT	152	NM_000784
SHP (<i>NR0B2</i>)	GGCTTCAATGCTGTCTGGAGT	CCCTTTCAGGCAGGCATATT	52	NM_021969
PEPCK (<i>PCK1</i>)	AGTATGACAACCTGCTGGTTGGCTCT	ATGGGCACTGTGTCTCTTTGCTCT	103	NM_0025913

Tabla MM-2. Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes de rata por RT-QPCR

Proteína/Gen	Cebador Forward(5'-3')	Cebador Revers(5'-3')	Amplicón(pb)	Nº de Acceso
Gapdh (<i>Gapdh</i>)	GTGCAGTGCCAGCCTCGT	GCCACTGCAAATGGCAGC	102	NM_017008
Fxr (<i>Nr1h4</i>)	GAAAGAGCGGCATCTCCGA	TGCTGTGAGCAGAGCGTACTCTT	104	NM_021745
Gr (<i>Nr3c1</i>)	GGTACTCAAGCCCTGGAATGAGA	AGCACCCCGTAATGACATCCTGAA	131	NM_012576
Cyp7A1 (<i>Cyp7a1</i>)	GCTTTACAGAGTGCTGGCCAA	CTGTCTAGTACCGGCAGGTCATT	92	NM_012942
Cyp27A1 (<i>Cyp27a1</i>)	CCTTTGGGACTCGCACCA	GCCCTCCTGTCTCATCACTTG	70	NM_73231
Fgf21 (<i>Fgf21</i>)	GTCCGACAGAGGTATCTCTACACAGATGA	GAGCTCCAGGAGACTTTCTGGACT	120	NM_1307521
Asbt (<i>Slc10a2</i>)	GCTTCTGTGGACTTGGCCATT	TCCAGAAGCTTTCTTCTTTTGCCT	119	NM_017222
Fgf15 (<i>Fgf15</i>)	GGAGGACCAGAACGAACGAAATCTGT	CCGAGTAGCGAATCAGCCCGTATA	137	NM_130753
Ostα (<i>Ostalpha</i>)	GCTGCCACCCCTCATACTT	GATGCCATCAGGAATGAGAAACA	22	NM_221376
Ostβ (<i>Ostbeta</i>)	AGAAACCAGGGCCGCTCTA	TCCTTCTGCACTGTGGTCCAT	104	NM_238546
Ibabp (<i>Fabp6</i>)	CATGAAGCGCCTGGGTCTT	ACATTCTTTGCCAATGGTGAAC	157	NM_017098

Tabla MM-3. Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes de raton por RT QPCR

Proteina/Gen	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Amplificación(pb)	Nº de Acceso
Gapdh (<i>Gapdh</i>)	CAGGGCTGCCATTTGCAG	CTGTGCCGTTGAATTTGCC	122	NM_008084
Fxr (<i>Nr1h4</i>)	TGAGGGCTGCAAAGGTTTCTTCC	TACATGTCCATCACGCAGTTGCC	90	NM_009108
Gr (<i>Nr3c1</i>)	GAGCAGTGAAGGACAGCACA	GAGCTTCCAGGTTTCATTCCAGCTT	123	NM_0081733
Fgf21 (<i>Fgf21</i>)	GTCCGGCAGAGGTACCTCTACA	GAGCTCCAGGAGACTTTCTGGACT	118	NM_0200134
Fgf15 (<i>Fgf15</i>)	ATGTCTCCAAGTCTTCCCTCCGAAT	CCGAGTAGCGAATCAGCCCGTATA	189	NM_008003
Fgfr4 (<i>Fgfr4</i>)	TCTACCCACAGCAAGCACCCCTA	CGCAGCCGAATGCCTCCAATA	110	NM_008011
Fgfr1 (<i>Fgfr1</i>)	CTCGAGACCCCATCAGGATCTGAA	GCCTTCGCAAGCTGACTCTCA	134	NM_010206.3
Bsep (<i>Abcb11</i>)	TGACTTTCCACAGTGGCGTCT	ATGGTGTCTGCAATCTTCACTCA	87	NM_021022
Cyp7a1 (<i>Cyp7a1</i>)	AGCTCTGGAGGGAATGCCAT	GAGCCGCAGAGCCTCCTT	90	NM_007824
Cyp27a1 (<i>Cyp27a1</i>)	CATCTGCGTCAGGCTTTGAA	AGCCGGGTGATAAAGTCACTGATA	101	NM_024264
Baat (<i>Baat</i>)	GTTCTGAGGGTTGCTGTAAACTACTGTT	GACCTGGATGTGCACAGGCT	141	NM_007519.3
Ntcp (<i>Slc10a1</i>)	GGCCACAGACACTGCGCT	AGTGAGCCTTGATCTTGCTGAACT	101	NM_011387
Asbt (<i>Slc10a2</i>)	TTGCACAGCACAAGCAGTGA	TGCATTGAAGTTGCTCTCAGGT	103	NM_011388
Shp (<i>Nr0b2</i>)	CCTCTCAACCCAGATGTGCCA	TACCAGAAGGGTGCCTGGAATGTT	181	NM_011850
Ostα (<i>Ostalpha</i>)	TTGCTCTGTTCCAGGTGCTT	GATCTGCCCACT GTTAGCCAA	81	NM_145932
Ostβ (<i>Ostbeta</i>)	GATGCGGCTCCTTGGAATTA	TTCGATTTCTGTTTGCCAGGAT	103	NM_178933
Pxr (<i>Nr112</i>)	CTGCTCACAGGTTCTGTTCT	CACTCAGCCATCTGTGCTGCTAAA	158	NM_010936
Ibabbp (<i>Fabp6</i>)	GTTTCATGAAGCGCCTGGGTCTT	CCATCTTCACGGTAGCCTTGAACCTTCT	209	NM_008375

Tabla MM-3. Cebadores utilizados para cuantificar los niveles de expresión de genes de raton por RT-QPCR

Proteina/Gen	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')	Amplicón(pb)	Nº de Acceso
β -Klotho (Klb)	AGGTATGCATGCACCAGGAGAGAA	CACTTTCGAATGTGCCTTGATCAGGTT	85	NM_0311802
Pepck (Pck1)	GAAGTTCGTGGAAGGCAATGCTCA	TGAGAGCCAGCCAACAGTTGTCATA	155	NM_011044.2
Mrp2 (Abcc2)	TCTAGAGACGGATAGCCTCATTCA	CCTGTCTAGGACCATTACCTTGT	125	NM-013806
Hnf4α (Hnf4alpha)	CCAGCCTACACCACCCTGGAGTT	TTCCTCACGCTCCTCCTGAA	207	NM_008261
Lrh-1 (NR5A2)	GATGCCAGAAAACATGCAAGTGTCTCAA	CCTTGCAGCTTTCGCACGTGA	84	NM_030676.3

Cuantificación de los resultados

Se utilizó la expresión de un gen endógeno como elemento normalizador, de forma que la relación entre el Ct del gen diana y el Ct del gen control endógeno se utilizó como un valor de Ct normalizado del gen diana. Este valor sirve para normalizar la cantidad de ADNc añadido a la reacción y corregir variaciones en la cantidad de ARN de partida en la muestra. Para poder comparar los resultados entre diferentes análisis, se utilizó una muestra de ADN que se usó como calibrador, al que se le otorgó el valor 1 ó 100% de expresión del gen interés o gen diana. La cantidad de ADN diana, normalizada frente al control endógeno y relativa al calibrador/muestra control, se calculó mediante: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para conseguir este valor fue necesario realizar los siguientes cálculos:

- 1- Calcular el Ct promedio de cada muestra para cada una de las dianas y del control endógeno (en cada placa se dispone cada muestra por duplicado).
- 2- Calcular ΔCt como Ct diana – Ct control endógeno.
- 3- Calcular $\Delta\Delta Ct$ como ΔCt muestra – ΔCt calibrador.

3.2.4. Otras técnicas de Biología Molecular

Transformación de bacterias competentes mediante choque térmico

Para obtener los plásmidos utilizados en los estudios de transfección se emplearon bacterias DH5 α competentes proporcionadas por el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la universidad de Salamanca. Sobre la suspensión de bacterias competentes se añadieron 5 ng del plásmido correspondiente. La mezcla se incubó sobre hielo durante 30 min. Para facilitar la internalización de los plásmidos se sometieron las bacterias a un choque térmico: para lo cual se incubaron en un baño a 42°C durante 2 min e inmediatamente se enfriaron sobre hielo durante 2 min. Se añadió entonces medio SOC frío (4°C) y se incubaron las bacterias a 37°C durante 1 h en agitación.

Para seleccionar las bacterias transformadas, se sembraron en placas de Luria-Bertani (LB)-agar suplementadas con ampicilina y se incubaron a 37°C durante 12 h. Se seleccionaron las colonias bien definidas y aisladas.

Obtención y purificación del ADN plasmídico de bacterias transformadas

Para purificar el ADN plasmídico se utilizó el kit comercial PlasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) que se basa en aplicar el lisado de bacterias transformantes, obtenido en condiciones alcalinas, sobre una columna constituida por una resina de intercambio iónico. A continuación se realizan lavados sucesivos para eliminar las endonucleasas y las sales. Finalmente, el ADN plasmídico se eluye de las columnas, en condiciones de baja salinidad y su concentración de ADN se cuantificó en el equipo de Nanodrop.

Geles de agarosa para electroforesis

Geles de agarosa desnaturizantes

- Tampón MOPS 10x: MOPS 0.2 M, acetato sódico anhidro 80 mM, EDTA 10 mM, pH 7.0.
- Solución de carga desnaturizante: formamida 95% (p/v), azul de bromofenol 0.025% (p/v), xileno cianol 0.025% (p/v), EDTA 18 mM y SDS 0.025% (p/v).

Para la preparación del gel se pesó la cantidad de agarosa adecuada para alcanzar la concentración del 1% (p/v) y se disolvió en agua ultrapura. Para facilitar la disolución, la mezcla se calentó hasta ebullición y se mantuvo en agitación constante. Seguidamente, se añadió el tampón MOPS 10x (10% v/v) y formaldehído (18% v/v). Cuando la solución se enfrió hasta unos 50°C, se depositó sobre un molde y se colocó el peine adecuado al número de muestras del que se disponía. Una vez polimerizada la agarosa, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis que contenía el tampón de electroforesis MOPS 1x. Las muestras y el marcador de tamaños moleculares de ARN (0.5-10 kb) se mezclaron con un volumen de solución de carga desnaturizante que

contenía bromuro de etidio al 0.008% y se calentaron a 75°C durante 10 min. Antes de cargar las muestras, el gel se sometió a una corriente de 50 V para limpiar las calles, y posteriormente el gel se visualizó bajo luz UV.

Todo el material utilizado en la realización de los geles fue convenientemente tratado para eliminar las ARNasas y evitar así la degradación del ARN.

Geles de agarosa no desnaturalizantes

- Tampón TAE: trizma base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8.
- Solución de carga no desnaturalizante: sacarosa 40% (p/v), azul de bromofenol 0.25% (p/v), xileno cianol 0.25% (p/v).

Para la preparación del gel se pesó la cantidad de agarosa necesaria y se disolvió en TAE para alcanzar el 1%. Para disolver la agarosa, la mezcla se calentó hasta ebullición. Se añadió a continuación SYBR Green I (SYBR Safe, Invitrogen) para visualizar el ADN. Una vez que la agarosa hubo polimerizado en un molde con el peine adecuado, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis con tampón TAE. Las muestras se mezclaron con 0.1 volúmenes de solución de carga antes de depositarse en el gel. Como patrón de tamaños moleculares de ADN se empleó el estándar de 1 kb. Se conectó la cubeta a una fuente eléctrica a una velocidad constante de 80 V. Posteriormente las bandas del gel se visualizaron en el equipo de captura y análisis de imagen Fujifilm LAS-4000.

3.2.5. Metodos de análisis

Determinación de la viabilidad celular (Test de Formazán)

El test de formazán es un método colorimétrico utilizado para cuantificar el número de células vivas en ensayos de proliferación o quimiosensibilidad celular. El formazán, soluble en medios acuosos, se forma a partir de sales de tetrazolio (MTT) por la acción de deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas

(Marshall *et al.*, 1995). Se puede cuantificar espectrofotométricamente la cantidad de formazán producido ya que es un compuesto que absorbe a 490 nm. Dicha cantidad es proporcional al número de células vivas. Transcurrido el período experimental, se retiró el medio de cultivo con los compuestos objeto de estudio y las células se incubaron durante 4 h en presencia de MTT a 37°C, en una estufa con atmósfera del 5% CO₂ y humedad relativa del 80%. Transcurrido este tiempo se añadió la solución de lisis y solubilización (10% SDS en 0.01 M de HCl) y las placas se incubaron en la estufa a 37°C durante 12 h. Finalmente se determinó la absorbancia del MTT en el sobrenadante por espectrofotometría en un lector de ELISA.

Determinación de ácidos biliares por HPLC-MS/MS

Previo a su análisis por HPLC-MS/MS se extrajeron y concentraron los ABs del suero obtenido de los experimentos *in vivo*, para lo que se realizó una extracción sólido-líquido en cartuchos Sep-Pak con relleno de octadecilsilano (C18). Los cartuchos Sep-Pak Plus C18 fueron suministrados por Waters (Madrid).

Preparación de las muestras de suero

Tras diluir el plasma 1:4 (v/v) con NH₄HCO₃ 0.4 M, se añadió la cantidad adecuada de ácido nordesoxicólico (norDCA) en metanol, que se utilizó como estándar interno. A continuación la mezcla se calentó a 65°C durante 2 h y, posteriormente, se centrifugó 10 min a 3500 rpm. El sobrenadante resultante se aplicó al cartucho.

Preparación de las muestras de bilis

Debido a la naturaleza pobre en proteínas de la bilis y a su elevada concentración de ABs, las muestras de bilis se diluyeron directamente en metanol a la proporción adecuada para analizarlas directamente en el HPLC-MS/MS, sin extracción previa.

Extracción sólido-líquido en cartuchos Sep-Pak con relleno C18

Antes de iniciar el procedimiento, el cartucho se activó con 5 ml de metanol seguidos de 5 ml de agua destilada. Una vez activado, se aplicó lentamente la muestra en caliente. A continuación, se lavó el cartucho aplicando sobre el mismo de manera sucesiva 10 ml de agua destilada, 3 ml de acetona al 10% en agua y 10 ml de agua destilada. Posteriormente, se extrajeron los ABs retenidos en el cartucho aplicando lentamente 5 ml de metanol, que se evaporó bajo corriente de aire hasta sequedad.

Análisis de ácidos biliares por HPLC-MS/MS

El método utilizado para el análisis de ABs fue una modificación del descrito por Ye y colaboradores (Ye *et al.*, 2007). Para la separación cromatográfica se empleó una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m, termostaticada a 35°C. Se utilizó un método de elución en gradiente usando como fase móvil una mezcla de metanol y agua, conteniendo ambos 5 mM de acetato amónico y 0.01% de ácido fórmico, pH 4.6. Se comenzó a trabajar con 80:20 de metanol/agua y se fue incrementando la concentración de metanol en la mezcla hasta el 97%, de manera lineal durante 9 min, para retornar a la proporción inicial en 1 min y mantenerla durante los últimos 5 min del análisis. El flujo de trabajo fue de 0.5 ml/min. La determinación de los ABs en el triple cuadrupolo se llevó a cabo utilizando ionización negativa, para obtener los aniones moleculares de cada una de las especies moleculares analizadas. Las condiciones de trabajo para la fuente iónica fueron: temperatura del gas (N_2) 350°C, flujo del gas 8 ml/min, presión del nebulizador 10 psi, voltaje 2.500 V. Se empleó el modo de trabajo MRM siguiendo la transición específica de cada uno de los iones precursores (ión molecular H^+) a los respectivos iones producto resultantes, que fueron los siguientes:

- ABs tauroconjugados: ión producto 80.2 m/z, correspondiente al grupo SO_3^- de la taurina
- ABs glicoconjugados: ión 74 m/z, correspondiente a la glicina desprendida en su fragmentación.

- ABs libres: se siguió la transición de ión molecular a ión molecular, (por ejemplo, AC de 407.4 m/z a 407.4 m/z), ya que como han descrito otros autores, con este método no es posible fragmentar el ión molecular (Ye *et al.*, 2007).
- Estándar interno: norDCA, transición de 377 m/z a 331.3 m/z.

Las muestras se reconstituyeron en 200 µl de metanol y se centrifugaron durante 30 segundos a 18000 xg antes de su inyección en el cromatógrafo. El volumen de inyección fue de 2 µl. Se construyeron rectas patrón para cada una de las especies moleculares de ABs mediante inyección de soluciones metanólicas con concentraciones de cada AB entre 0.1 y 25 µM. Se corrigió la concentración de cada AB calculada a partir de su recta patrón por la recuperación obtenida para el estándar interno norDCA.

Medida del perfil hepático mediante tiras reactivas de química seca

Esta determinación se lleva a cabo utilizando el equipo Spotchem EZ, que precisa de una calibración mediante la tarjeta correspondiente a la tira reactiva que se quiere determinar. En el caso de la determinación del perfil hepático la tira está compuesta por una zona de test multicapa para realizar una espectrometría de reflexión (Liver-1, A. Menarini, panel de perfil hepático para química seca). Se lleva a cabo una determinación cuantitativa de LDH, AST, ALT, albúmina, proteína total y bilirrubina total en muestras de suero o plasma. La valoración de los resultados se lleva a cabo mediante comparación con los valores normales de referencia que son (a 37°C): LDH 230-460 U/l, ALT <33 U/l, AST 10-27 U/l, Alb 3.8-5.1 g/dl, T-Pro 6.7-8.3 g/dl y T-Bil 0.2-1 mg/dl.

3.2.6. Análisis estadístico

Para la expresión de los resultados se ha calculado la media y el error estándar de la media (EEM). Tras llevar a cabo un ANOVA, para calcular la significación estadística de las diferencias entre medias se utilizó el test de la t de Student, el test de valores apareados o el de comparación múltiple de Bonferroni, según fuese apropiado en cada caso.

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ENTEROHEPÁTICA FXR/FGF15 EN RATA

4.1.1. Efecto sobre los genes involucrados en la homeostasis de ABs a nivel intestinal

En diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que los glucocorticoides pueden modular la síntesis de ABs a través de la regulación de las enzimas clave de su síntesis, tanto de la vía neutra (CYP7A1) como de la vía ácida (CYP27A1) (Vlahcevic *et al.*, 1996). También se ha demostrado que la expresión de los transportadores principales de ABs, NTCP en el hepatocito (Eloranta *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2011) o ASBT en el ileocito (Jung *et al.*, 2004; Out *et al.*, 2014) involucrados en su tráfico a través de los diferentes tejidos que componen el circuito enterohepático, podría estar regulada por glucocorticoides a través de su receptor GR.

En un trabajo previo de nuestro grupo (Rosales *et al.*, 2013) el tratamiento de ratas con DEX (50 mg/kg p.c.) durante 4 días, fue capaz no sólo de inducir cambios en los niveles de ABs séricos y en su patrón de conjugación, sino también de enlentecer y disminuir la capacidad de secretarlos, lo que podría ser en parte el reflejo de una reducción en la expresión de genes diana de Fxr, tales como Ntcp, Cyp7a1 y Baat. En conjunto, estos resultados llevaron a pensar que tanto el transporte, como la síntesis y la conjugación de ABs podrían verse afectados por el tratamiento con glucocorticoides (Rosales *et al.*, 2013).

Así pues, teniendo en cuenta las evidencias anteriormente mencionadas, que indican que los glucocorticoides pueden interactuar con la ruta que regula la homeostasis de ABs a nivel hepático, ya sea de forma directa a través de los genes de su metabolismo y transporte, o indirectamente por su interacción con su sensor FXR u otros factores nucleares (Rosales *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2011), se planteó la posibilidad de que estos esteroides también interaccionasen con la señalización mediada por la vía FXR/FGF19 a nivel intestinal, que se considera encargada de prevenir la acción tóxica debida a la acumulación de los ABs.

Por tanto, se propuso como primer objetivo de este trabajo el estudiar las repercusiones a nivel intestinal del tratamiento con glucocorticoides sobre los genes implicados en la homeostasis de los ABs. Para ello, se analizaron sus niveles de expresión en íleon de ratas tratadas con glucocorticoides (DEX, PRED y BUD) 50 mg/kg p.c. durante 4 días. Los resultados más relevantes se recogen en la **Tabla-R1**. A diferencia de lo que ocurría en el hígado (Rosales *et al.*, 2013), en el intestino no se observaron cambios significativos en los niveles de ARNm de Fxr, ni Gr. Tampoco se observaron cambios en la expresión de los componentes del dímero Osta/Ost β , regulados directamente por Fxr.

Sin embargo, para otras dianas directas de Fxr, como Ibabp y Shp, se observaron modificaciones en la abundancia de ARNm en respuesta al tratamiento con DEX o BUD, pero no con PRED. Estudios realizados por otros autores en ratas sugieren que los glucocorticoides pueden influir en la expresión y maduración de Ibabp en neonatos de esta especie (Hwang *et Henning*, 2001). En el trabajo realizado por nuestro grupo con anterioridad también habíamos observado modificaciones en los niveles de expresión hepática de Shp, sin embargo eran en sentido contrario al que hemos descrito ahora en íleon de rata. Así, por una parte se producía una reducción de Shp en hígado de rata en respuesta al tratamiento con glucocorticoides. Además, este efecto sobre la expresión de Shp presentaba un componente independiente de FXR, ya que también se observaba en el modelo *in vitro* con células Alexander de hepatoma humano que carecen de expresión endógena de FXR (Rosales *et al.*, 2013).

Tabla-R1. Efecto del tratamiento con glucocorticoides sobre los niveles de expresión de genes implicados en la homeostasis de ABs en ileon de rata

Función	Proteína	Δ Ct	Abundancia de ARNm (% del grupo control)			
			Control	Dexametasona	Prednisolona	Budesonida
Factores de crecimiento Receptores Nucleares	Fgf15	29.2±0.9	468±116 ^a	101±54	1547±51 ^a	
	Fxr	18.7±0.1	131±10	116±7	134±10	
	Shp	27.6±0.7	287±57 ^a	50±7	363±116 ^a	
	Gr	20.9±0.1	80±7	103±13	111±18	
Transportadores	Asbt	17.7±0.2	126±9	174±9 ^a	143±17 ^a	
	Ost α	15.4±0.1	99±6	115±7	118±11	
	Ost β	15.8±0.1	101±6	121±7	109±10	
	Ibabp	14.1±0.2	12±3 ^b	111±8	13±2 ^b	

Tabla-R1. Niveles relativos de ARNm determinados mediante RT-QPCR en ileon de rata tratadas con el glucocorticoide indicado (50 mg/kg p.c.) durante 4 días. Los valores se expresan como porcentajes respecto al grupo Control (ratas tratadas con solución salina), y son medias±EEM de 8 animales por grupo. Los resultados se normalizaron usando Gapdh, ^ap <0.05 y, ^bp <0.01 en comparación con el grupo Control mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Ct, ciclo umbral.

En relación con los resultados obtenidos para el transportador apical de ABs, Asbt, éste aumentó sus niveles de expresión en respuesta todos los glucocorticoides, pero de manera significativa sólo en ratas tratadas con PRED o BUD. Se ha demostrado que la expresión basal de Asbt en rata podría no encontrarse regulada por Fxr, al contrario de lo que ocurre en el ratón, donde se regula por la vía Fxr/Shp/Lrh-1 (Nowicki *et al.*, 1997). Sin embargo tanto en rata (Nowicki *et al.*, 1997), ratón (Out *et al.*, 2014) y humano (Jung *et al.*, 2004), se ha observado que los tratamientos con glucocorticoides, pueden modificar los niveles de ARNm de ASBT/Asbt lo que sugiere un posible papel del GR/Gr en su regulación (para una revisión ver: Kusters *et Karpen*, 2008).

Por otra parte, el péptido FGF19/Fgf15 es sintetizado por el ileocito en respuesta a la activación de FXR/Fxr por ABs. Se trata de una hormona secretada a la sangre portal que alcanza a los hepatocitos donde ejerce un efecto represor de la síntesis de la enzima clave CYP7A1/Cyp7a1, constituyendo un mecanismo de protección frente a la acumulación en el organismo de ABs (Inagaki *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2009). En la **Tabla-R1** se puede observar que los niveles ileales de ARNm correspondiente a Fgf15 aumentaron considerablemente en respuesta a DEX y BUD, lo que concuerda con la represión de Cyp7a1 en presencia de estos dos glucocorticoides en este modelo (Rosales *et al.*, 2013). Sin embargo, aunque otros autores han descrito una implicación de FGF19/Fgf15 en la regulación de ASBT/Asbt de forma directa, o bien a través de c-Fos (Out *et al.*, 2014; Sinha *et al.*, 2008), la magnitud de la sobreexpresión de Fgf15 en ileon de rata en respuesta a DEX, PRED y BUD, no concordaba con el cambio de expresión de Asbt que se encontró en estas muestras.

4.1.2. Toxicidad hepática de los tratamientos con glucocorticoides

A la vista de estos resultados, consultamos las fuentes bibliográficas, y encontramos que existían sólo dos trabajos publicados en los que se había analizado el efecto de los glucocorticoides sobre la homeostasis de los ABs a través de la vía de señalización de FXR (Out *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2012). Ambos utilizaban un modelo de ratón C57BL/6 *wild-type* y/o *knock-out* para Fxr, a los que trataban con este tipo de fármacos a menos dosis de las utilizadas por nosotros aunque durante más tiempo. Los datos de uno de estos trabajos (Out *et al.*, 2014), mostraban que los ratones tratados con PRED expresaban más Asbt ileal pero, a diferencia de

nuestros resultados, experimentaban un descenso de Fgf15, en ausencia de cambios en el ARNm de Shp intestinal. En el otro trabajo publicado (Lu *et al.*, 2012), en ausencia de datos sobre los niveles de Fgf15, el tratamiento con DEX era capaz de inducir la sobreexpresión de Cyp7a1, lo que no concordaba con lo observado en nuestro laboratorio (Rosales *et al.*, 2013). Debido a las contradicciones entre los diferentes trabajos decidimos investigar si la variabilidad en el efecto de los glucocorticoides sobre la vía de señalización intestinal Fxr/Fgf15 se debía a artefactos relacionados con un efecto dosis-dependiente, o si era fármaco- o especie-específico.

Además, como en el trabajo de Lu y colaboradores (Lu *et al.*, 2012), se observaba toxicidad hepática a una dosis de 1 mg/kg p.c./día de DEX, como sugería el aumento de ALT, bilirrubina e infiltración de macrófagos, se decidió determinar el rango en el que la DEX no inducía toxicidad hepática. Para ello se trataron ratas con distintas dosis de DEX durante 7 días.

Los resultados se recogen en la **Fig-R1**. Se observó como la dosis de 1 mg/kg p.c. administrada durante 7 días elevaba los niveles séricos de las transaminasas ALT y AST. Sin embargo, la dosis inferior de 0.5 mg/kg p.c. no producía cambios significativos en estos marcadores de daño hepático. Estos cambios se acompañaban de una elevación de los ABs totales en suero, que no se observó a la dosis más altas (5 mg/kg p.c.) a pesar de que estos presentaban niveles séricos de transaminasas muy elevados (**Fig-R1**).

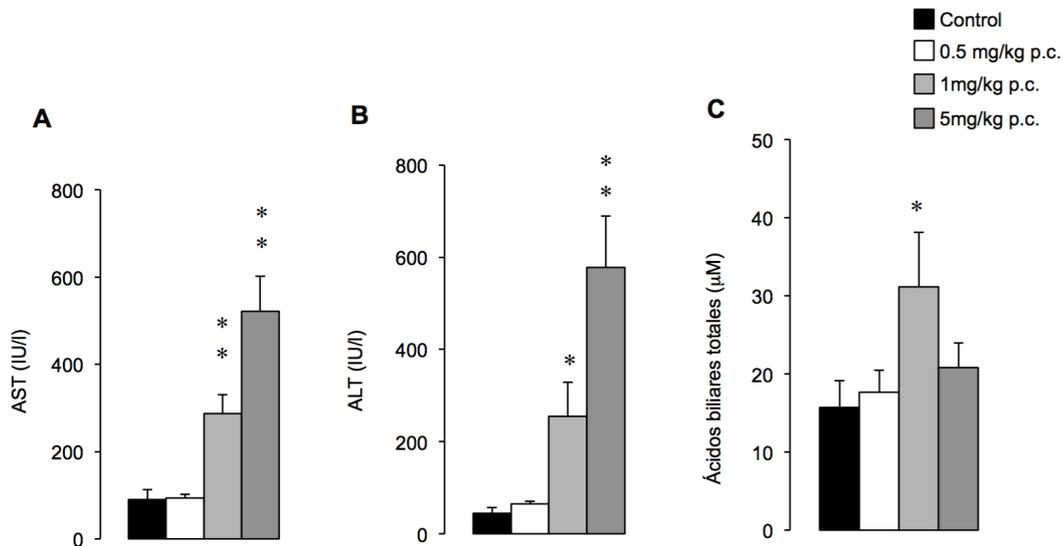


Fig-R1. Análisis de las enzimas hepáticas AST, ALT y los ácidos biliares totales en suero de ratas control y tratadas con diferentes dosis de dexametasona, i.p. durante 7 días. Los valores se expresan como media±EEM (n=4 por grupo). *p <0.05 y **p<0.01 en comparación con el grupo control mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

En la **Tabla-R2** se resumen los cambios encontrados en la bilirrubina, proteínas totales y albúmina sérica en estas ratas. Se puede observar como a dosis iguales o superiores a 0.5 mg/kg p.c. hay un aumento significativo de la albúmina y las proteínas totales, pero no de la bilirrubina, lo que ya ha sido descrito con anterioridad y que podría ser debido a una respuesta adaptativa al tratamiento con glucocorticoides (Savary *et al.*, 2001).

Por otra parte, hemos observado en estas ratas que el tratamiento con dosis altas de glucocorticoide produce hepatomegalia y disminución del peso corporal, lo que se traduce en que la relación peso de hígado/peso corporal aumentaba de manera significativa a medida que subíamos la dosis de DEX (**Fig-R2**). Esto podría traducirse en un aumento de la función hepática global, lo que justificaría la ausencia de hipercolanemia e hiperbilirrubinemia en animales tratados con la dosis más alta de DEX (5 mg/kg p.c.) (**Fig-R1C**).

Tabla-R2. Efecto de los glucocorticoides sobre los parámetros de funcionalidad hepática en rata

	control	0.5 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg
Albumina g/l	2.6 ± 0.1	3.0 ± 0.1 ^b	3.7 ± 1.5 ^b	3.9 ± 1.4 ^b
Bilirrubina Total g/l	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.4	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0
Proteínas Totales g/l	4.8 ± 0.2	5.7 ± 0.6 ^b	4.6 ± 1.7	4.5 ± 1.7

Tabla-R2. Análisis de albumina, bilirrubina total y proteínas totales en el suero de ratas control y tratadas con diferentes dosis de dexametasona, i.p. durante 7 días. Los valores se expresan como media ± EEM de 4 animales en cada grupo, ^ap < 0.05 y ^bp < 0.01 en comparación con el grupo control mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

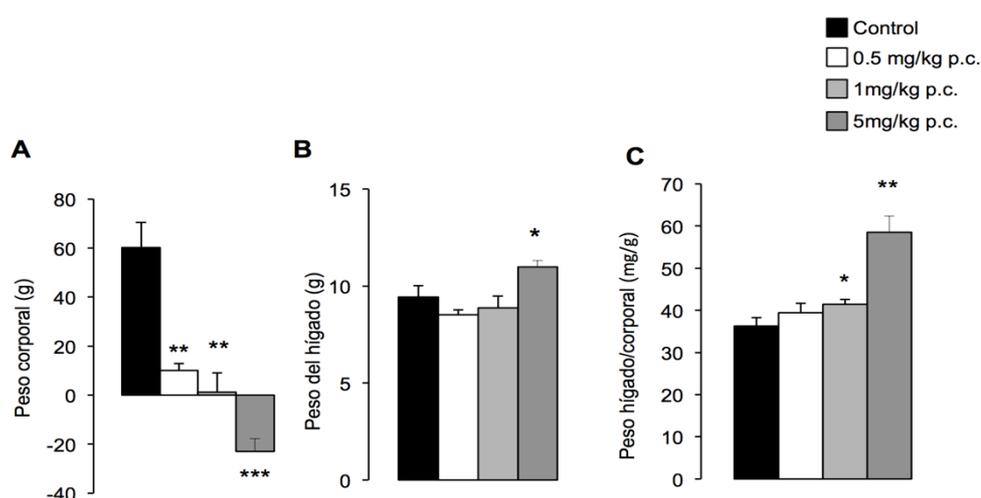


Fig-R2. Ganancia de peso corporal durante 7 días de tratamiento (A), peso total del hígado al final del periodo experimental (B) y relación peso hígado/peso corporal (C) en ratas control y tratadas con diferentes dosis de dexametasona, i.p. durante 7 días. Los valores se expresan como media ± EEM (n=4 por grupo). *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001 comparadas con el grupo control mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

4.1.3. Efecto de la DEX sobre la vía de señalización enterohepática Fxr/Fgf15/Fgf21

En estas condiciones experimentales se analizaron los niveles de expresión de los genes implicados en el metabolismo de ABs a nivel enterohepático. Se observó que los niveles del ARNm de Fgf15 en íleon se reducían significativamente de forma dosis-dependiente a partir de 0.5 mg/kg p.c. y hasta la dosis más alta ensayada, es decir, 5 mg/kg p.c. (**Fig-R3**), lo que concuerda con el trabajo de Out y colaboradores (Out *et al.*, 2014), en el que además se observó que al igual que ocurría en nuestra muestras, los niveles del ARNm de Asbt se incrementaban durante el tratamiento con DEX (Out *et al.*, 2014) (**Fig-R4**). Sin embargo, al contrario de lo descrito por estos autores, pese a la marcada disminución de la expresión de Fgf15, los niveles de ARNm de Cyp7a1 también mostraron una tendencia a disminuir de manera dosis-dependiente (**Fig-R5**), incluso a dosis no hepatotóxicas.

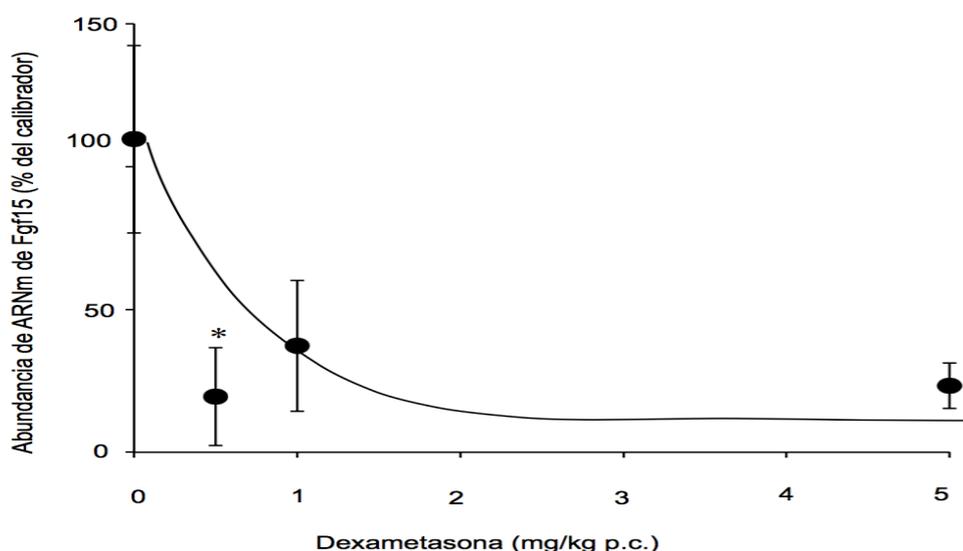


Fig-R3. Niveles de ARNm de Fgf15 determinados por RT-QPCR en íleon de rata control y tratadas con diferentes dosis de dexametasona durante 7 días. Los resultados se representan como porcentaje de abundancia respecto al calibrador (ARNm de íleon de rata control) en cada muestra normalizada por Gapdh y son media±EEM (n=4 por grupo). *p<0.05, **p<0.01 en comparación con el grupo control, mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

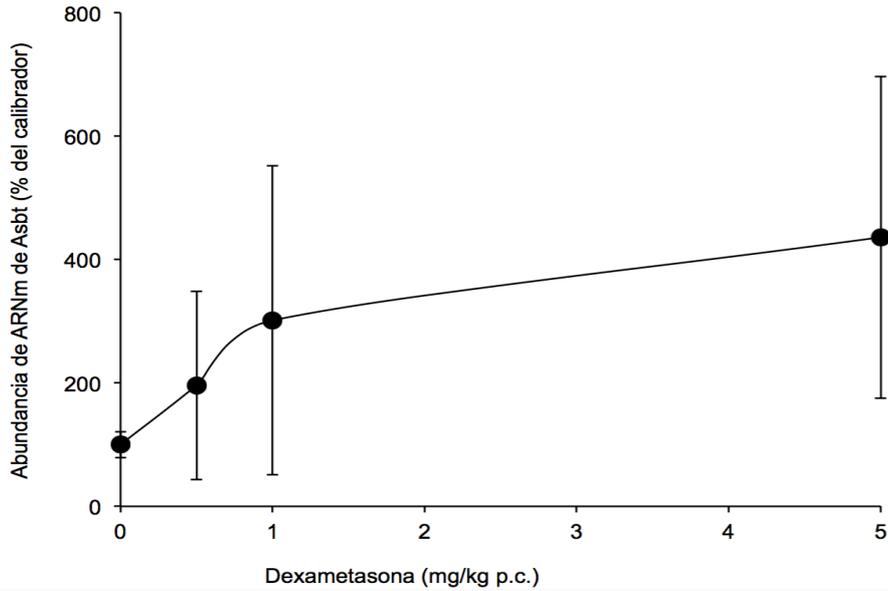


Fig-R4. Niveles de ARNm de Asbt determinados por RT-QPCR en íleon de rata control y tratadas con diferentes dosis de dexametasona durante 7 días. Los resultados se representan como porcentaje de abundancia respecto al calibrador (ARNm de íleon de rata control). En cada muestra la normalización se llevó a cabo determinando el ARNm de Gapdh. Los resultados se expresan como media±EEM (n=4 por grupo). No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) al comparar los grupos mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

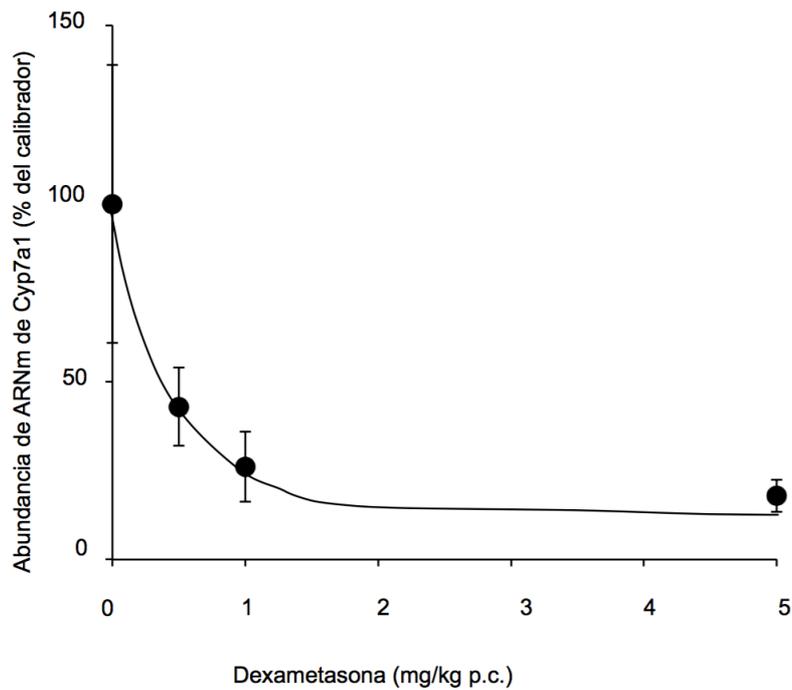


Fig-R5. Niveles de ARNm de la enzima Cyp7a1 determinados por RT-QPCR en hígado de rata control y tratadas con diferentes dosis de dexametasona durante 7 días. Los resultados se representan como porcentaje de abundancia respecto al calibrador (ARNm de hígado de rata control). En cada muestra la normalización se llevó a cabo determinando el ARNm de Gapdh. Los resultados se expresan como media±EEM (n=4 por grupo). *p<0.05, **p<0.01 en comparación con el grupo control, mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Para investigar el efecto del tratamiento con glucocorticoides sobre el eje Fxr/Fgf15/Fgf21, se analizaron los niveles de la expresión hepática de Fgf21. Estos aumentaron significativamente y de manera dosis-dependiente hasta 1 mg/kg p.c. de DEX. Aunque seguían elevados a la dosis de 5 mg/kg p.c., (**Fig-R6**), observamos una tendencia a disminuir lo que podría ser un reflejo del aumento de la relación peso de hígado/peso corporal observada a esta dosis del tratamiento.

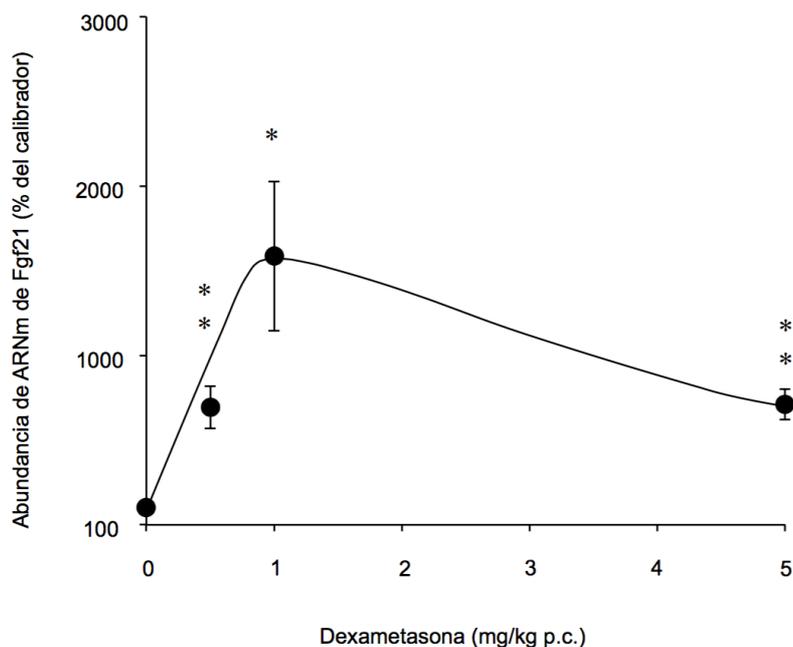


Fig-R6. Niveles de ARNm de Fgf21 determinados por RT-QPCR en hígado de rata control y tratadas con diferentes dosis de dexametasona durante 7 días. Los resultados se representan como porcentaje de abundancia respecto al calibrador (ARNm de hígado de rata control) en cada muestra normalizada por Gapdh y son media±EEM (n=4 por grupo). *p<0.05, **p<0.01 en comparación con el grupo control, mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Cuando se llevó a cabo la determinación del perfil de las diferentes especies moleculares de ABs en suero de rata, se mostró una composición similar en términos de formas libres (α MC, β MC, UDC, CA, CDC y DC) y tauroconjugadas (T α MC, T β MC, TUDC, TC, TCDC y TDC) en los dos grupos experimentales donde no se había observado toxicidad hepática (control y dosis de 0.5 mg/kg p.c.) (**Fig-R7B y R7C**). No se observaron diferencias en las concentraciones de ABs totales (**Fig-R7A**).

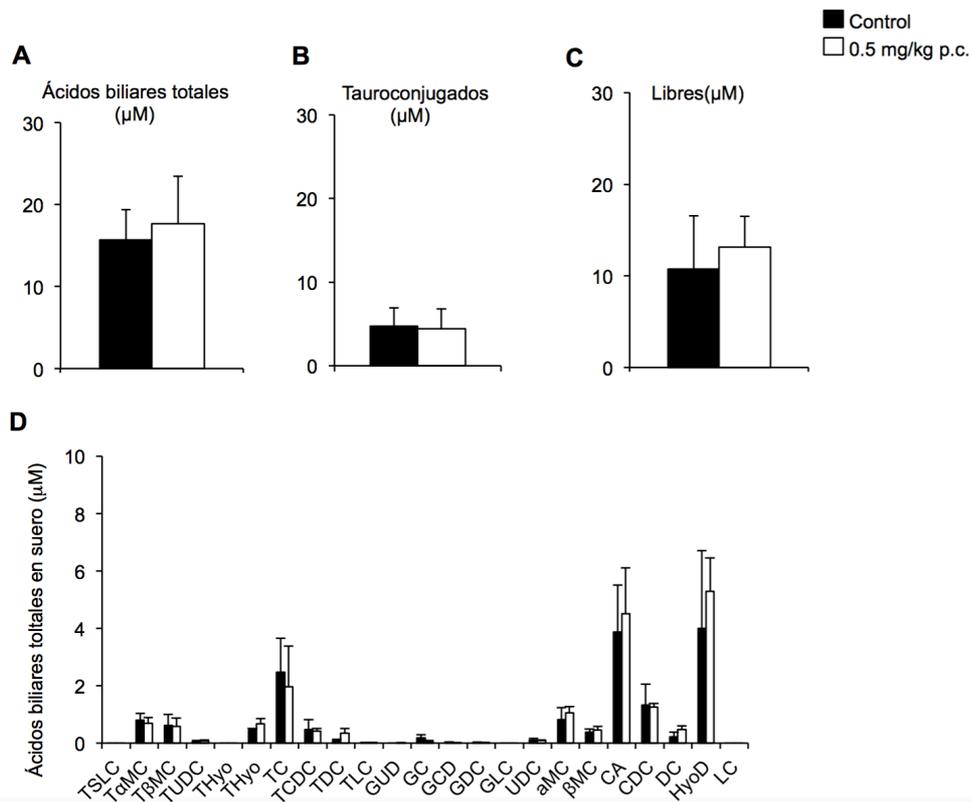


Fig-R7. Concentración de ácidos biliares totales (A), tauroconjugados (B), libres (C) y contenido de las diferentes especies moleculares (D) en suero de ratas control o tratadas durante 7 días con 0.5 mg/kg p.c. de dexametasona. La determinación de ácidos biliares se llevó a cabo por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media±EEM (n=4 por grupo). No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) al comparar ambos grupos mediante el test de la t de Student.

4.2. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ENTEROHEPÁTICA FXR/FGF15 EN RATÓN

4.2.1. Efecto sobre los genes involucrados en la homeostasis de ABs a nivel intestinal

Para dilucidar si los efectos de los glucocorticoides sobre el eje enterohepático que regula FXR dependía de la especie empleada como modelo *in vivo*, se trataron ratones C57BL/6 con distintas dosis de DEX durante 7 días. Se observó que los niveles de expresión de Fgf15 en íleon se reducían de manera drástica y dosis-dependiente a partir de 0.25 mg/kg p.c. y hasta el rango más alto ensayado, que fue de 5 mg/kg p.c. (**Fig-R8A**). Este mismo efecto se pudo observar en respuesta al tratamiento con PRED o BUD (**Fig-R8B**), lo que concuerda con lo descrito para la rata en el apartado anterior (**Fig-R3**) y con lo encontrado por Out y colaboradores (Out *et al.*, 2014), a una dosis de PRED de 12.5 mg/kg p.c. en esta misma cepa de ratones.

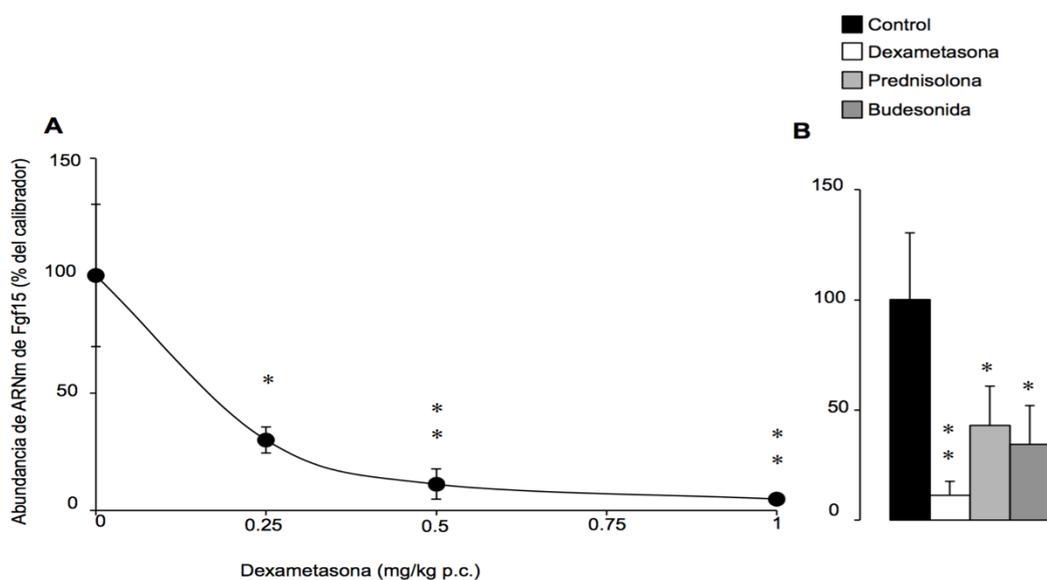


Fig-R8. Niveles de ARNm de Fgf15 determinados por RT-QPCR en íleon de ratones C57BL/6 control y tratados con diferentes dosis de dexametasona (**A**) ó 0.5 mg/kg p.c. de distintos glucocorticoides (**B**) durante 7 días. Los resultados se representan como porcentaje de abundancia respecto al calibrador (ARNm de íleon de ratón control) en cada muestra normalizada por Gapdh y son media±EEM (n=5-10 por grupo). *p<0.05, **p<0.01 en comparación con el grupo control, mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Para investigar si el descenso en la expresión ileal de Fgf15 era debido a cambios en los niveles de expresión del receptor nuclear que lo regula, se analizaron los niveles de ARNm de Fxr en los diferentes grupos de ratones tratados con DEX. Se encontró una cierta variabilidad en la expresión de Fxr y una tendencia a disminuir a concentraciones altas, pero no se registraron cambios significativos tras el tratamiento con DEX (**Fig-R9A**) ni en respuesta al tratamiento con PRED o BUD (**Fig-R9B**).

Por otra parte, dado que en el trabajo de Lu y colaboradores (Lu *et al.*, 2012), en este mismo modelo experimental, los autores observaron toxicidad hepática cuando los ratones se trataban con DEX a dosis de 1 mg/kg/p.c./día, se decidió estudiar la toxicidad hepática de dosis más bajas de este glucocorticoide.

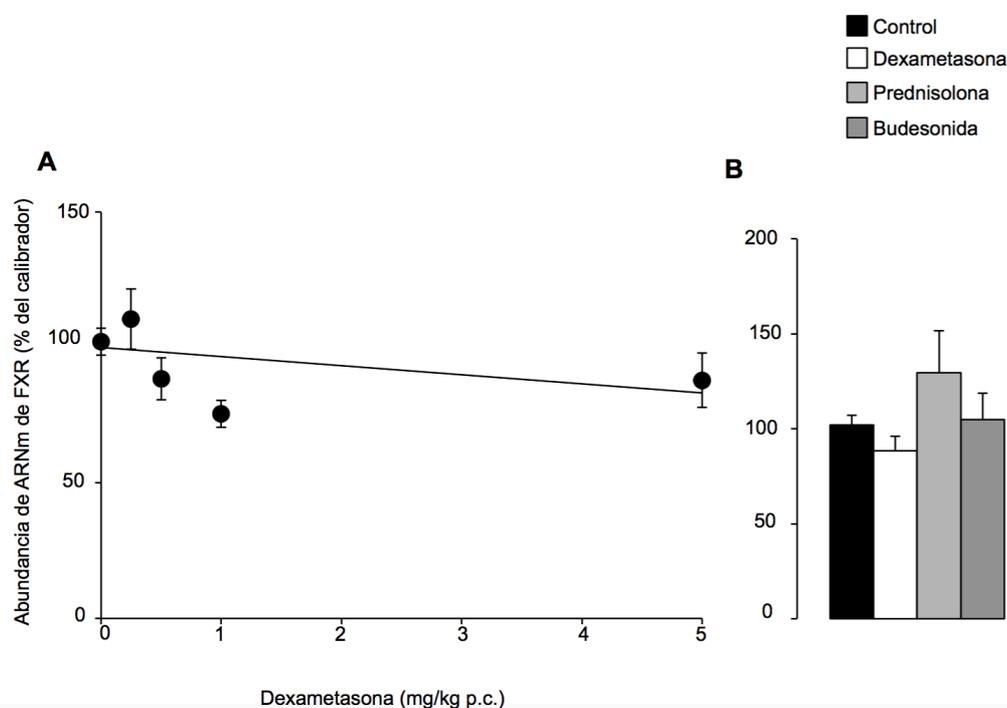


Fig-R9. Niveles de ARNm de Fxr en íleon de ratones C57BL/6 control y tratados con diferentes dosis de dexametasona (**A**) ó 0.5 mg/kg p.c. de distintos glucocorticoides (**B**) durante 7 días determinados por RT-QPCR . Los resultados se representan como porcentaje de abundancia respecto al calibrador (ARNm de íleon de ratón control) en cada muestra normalizada por Gapdh y son media±EEM (n=5-10 por grupo). *p<0.05, **p<0.01 en comparación con el grupo control, por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Los resultados se recogen en la **Fig-R10**. Se observó que la dosis de 1 mg/kg p.c. administrada durante 7 días elevaba los niveles séricos de las transaminasas ALT y AST, mientras que la dosis inferior 0.5 mg/kg p.c. no producía cambios significativos en estas dos enzimas hepáticas. Solo a la dosis mayor ensayada se observó una elevación de los niveles séricos de ABs totales (**Fig-R10C**). Además, como también habíamos visto en rata y se ha descrito anteriormente, se observó un cambio significativo en los niveles circulantes de albumina y proteínas totales que aumentaron tanto con la dosis 0.5 mg/kg p.c. como de 1 mg/kg p.c. (**Tabla-R3**). No se observaron cambios significativos en la concentración total de bilirrubina a las dosis de DEX utilizadas.

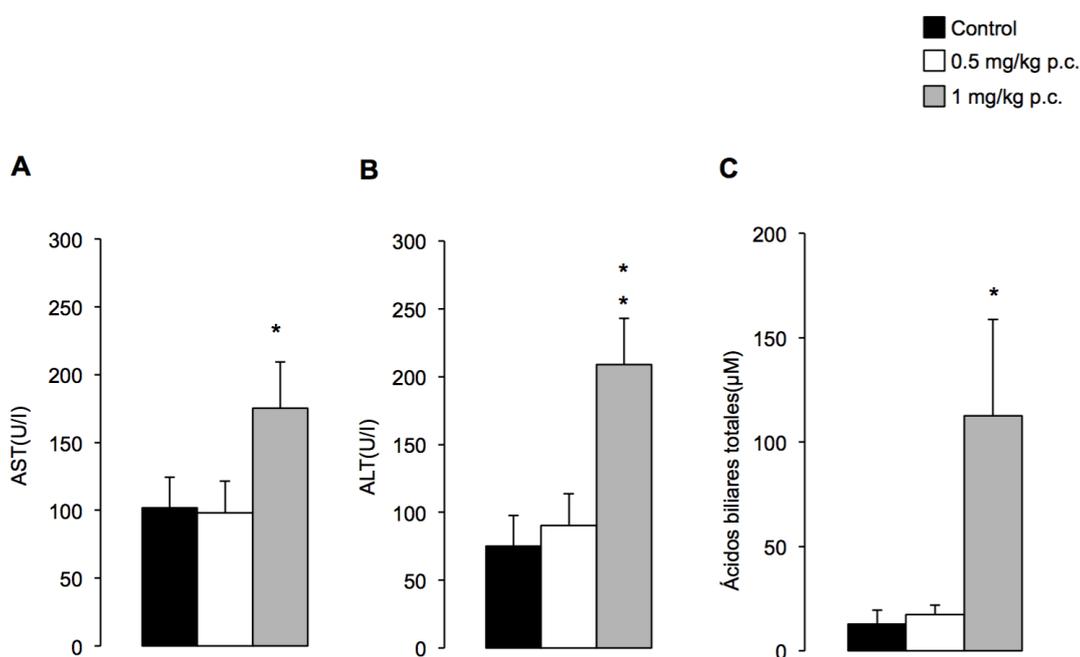


Fig-R10. Análisis de las enzimas hepáticas AST (**A**), ALT (**B**) y los ácidos biliares totales en suero (**C**) de ratones control y tratados con diferentes dosis de dexametasona, i.p. durante 7 días. Los valores se expresan como media±EEM de 5-10 animales en cada grupo, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ en comparación con el grupo control por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Como a dosis de DEX iguales o superiores a 1 mg/kg p.c. aparecían efectos tóxicos sobre el hígado, se fijó como tratamiento de los ratones para este estudio la dosis de 0.5 mg/kg p.c. de DEX al día durante 7 días.

En estas condiciones se investigó si el efecto de la DEX sobre la expresión ileal de Fgf15 era dependiente de Fxr. Para ello se trataron ratones *Fxr^{-/-}* con la dosis de DEX seleccionada. Los niveles basales de Fgf15 ileal en ratones *Fxr^{-/-}* fueron muy bajos en comparación con los encontrados en la cepa silvestre (**Fig-R11**).

Tabla-R3. Efecto de los glucocorticoides sobre los parámetros de funcionalidad hepática en ratones C57BL/6

	Control	0.5 mg/kg p.c.	1 mg/kg p.c.
Albumina g/dl	1.7 ± 0.0	1.9 ± 0.0 ^b	2.1 ± 0.1 ^b
Bilirrubina Total g/dl	1.2 ± 0.2	2.2 ± 0.8	1.6 ± 0.3
Proteínas Totales g/dl	4.2 ± 0.1	5.0 ± 0.2 ^b	5.5 ± 0.3 ^b

Tabla-R3. Análisis de albumina, bilirrubina total y proteínas totales en suero de ratones control y tratados con diferentes dosis de dexametasona, i.p. durante 7 días. Los valores se expresan como media±EEM de 5-10 animales en cada grupo, ^ap<0.05 y ^bp<0.01 en comparación con el grupo control por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

El tratamiento con DEX reducía aún más de manera significativa dicha expresión (**Fig-R11**). Los ratones *Gr^{-/-}* también presentaban una menor expresión ileal basal de Fgf15. En esta cepa también disminuía la expresión de Fgf15 en respuesta al tratamiento con DEX.

La regulación de FGF19 y de su ortólogo murino Fgf15 a través de FXR/Fxr activado en presencia de ABs ha sido bien estudiada (Song *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007; Kliewer *et Mangelsdorf*, 2015). Otros factores nucleares que pueden estar involucrados en su regulación comienzan a tomar relevancia, como son VDR activado por las vitaminas A y D (Schmidt *et al.*, 2010), Diet1 una glicoproteína endosomal involucrada en el tráfico de otras proteínas a través de las “tight-

junctions” (Vergnes *et al.*, 2013; Reue *et al.*, 2013; Lee *et Vergnes*, 2013), SREBP-2 (Miyata *et al.*, 2014), PPAR α (Zhou *et al.*, 2014) y PXR (Wistuba *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la posible participación del receptor GR/Gr en la expresión de FGF19/Fgf15. A la vista de los resultados obtenidos (**Fig-R11**), se puede sugerir que GR/Gr, a través de sus ligandos naturales, juega un papel directo y/o indirecto en la regulación de la expresión ileal de FGF19/Fgf15. En ratones se ha descrito que Fgf15 presenta un patrón circadiano inverso al de cortisol y corticosterona, de manera que a medida que transcurre el día los niveles de Fgf15 van disminuyendo (Stroeve *et al.*, 2010) a medida que se van elevando los de estos glucocorticoides (Gong *et al.*, 2015).

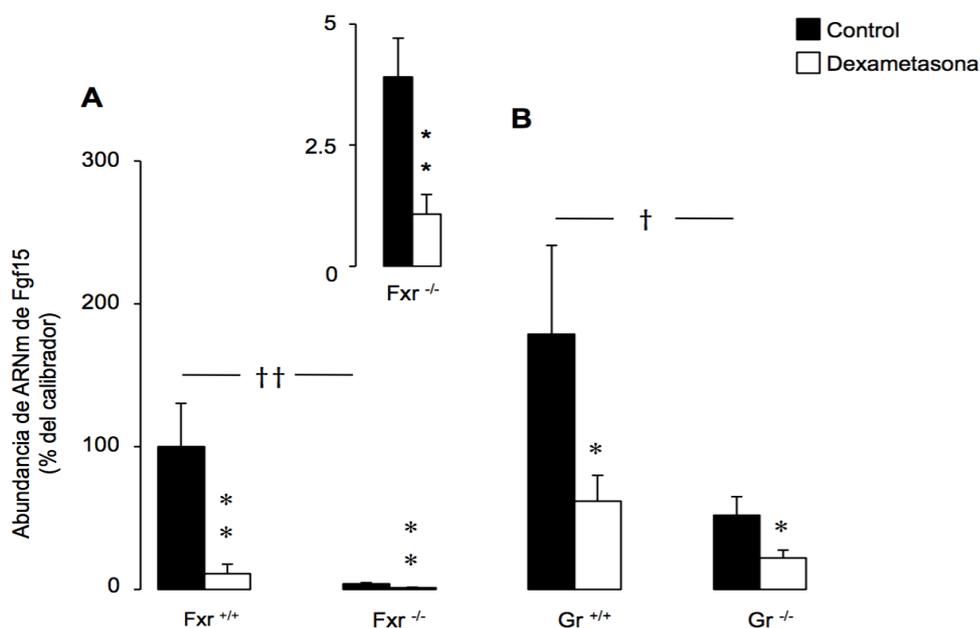


Fig-R11. Niveles de ARNm de Fgf15 determinados por RT-QPCR en íleon de ratones C57BL/6, *Fxr*^{-/-} y KO selectivamente para *Gr*^{-/-} intestinal, control y tratados con dexametasona (0.5 mg/kg p.c.) durante 7 días (**A**). Niveles de ARNm de Fgf15 encontrados en el ratón *Fxr*^{-/-} tras el tratamiento con DEX (**B**). Los resultados se representan como porcentaje de abundancia respecto al calibrador para lo que se utilizó ARNm de íleon de ratón de la cepa de referencia o *wild-type* (WT). Cada muestra fue normalizada por su contenido en ARNm para Gapdh y los resultados se expresan como media±EEM (n=5-10 por grupo). *p<0.05, **p<0.01 en comparación con el grupo control, †p<0.05, ††p<0.01 en comparación con los ratones WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Cuando se analizaron otras dianas directas de Fxr como Ibabp y $Ost\alpha$, a diferencia de lo que ocurría para Ibabp de rata, pero al igual que ocurría con $Ost\alpha$, encontramos que en el ratón su expresión permanecía invariable en respuesta al tratamiento con DEX. Esto ocurría tanto en la cepa silvestre como en $Fxr^{-/-}$, donde como está descrito en la bibliografía, los niveles basales de Ibabp y $Ost\alpha$ eran inferiores a los encontrados en la cepa silvestre (**Fig-R12**) (Dekaney *et al.*, 2008; Heidker *et Caiozzi*, 2015).

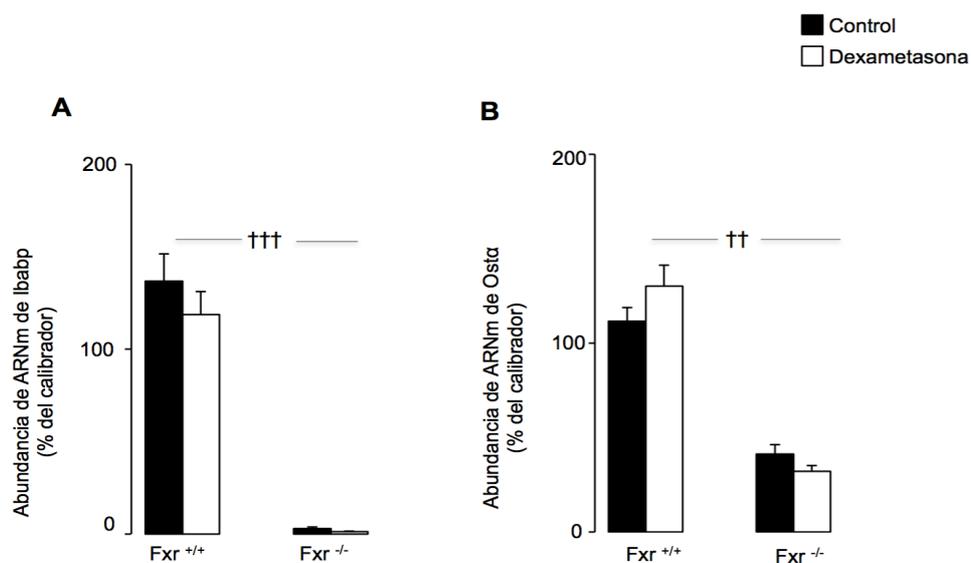


Fig-R12. Niveles de ARNm de Ibabp y $Ost\alpha$ determinados por RT-QPCR en íleon de ratones C57BL/6 $Fxr^{+/+}$ y $Fxr^{-/-}$, control y tratados con dexametasona (0.5mg/kg p.c.) durante 7 días. Los resultados se representan como porcentaje de abundancia respecto al calibrador para lo que se utilizó ARNm de íleon de ratón $Fxr^{+/+}$ control. Cada muestra fue normalizada por su contenido en ARNm para Gapdh y los resultados se expresan como media \pm EEM (n=5-10 por grupo). †p<0.05, ††p <0.01 y †††p <0.001 en comparación con los ratones $Fxr^{+/+}$ mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

En concordancia con los resultados obtenidos por nosotros en rata como los descritos por otros en ratón (Out *et al.*, 2014), los niveles de expresión de Asbt (**Fig-R13**), se incrementaron en respuesta al tratamiento con DEX. Sin embargo, tanto en los ratones $Fxr^{-/-}$ como en los $Gr^{-/-}$ tratados con DEX no se observaron cambios en la expresión de Asbt. Por el contrario, se observó una disminución de este

transportador en respuesta a DEX en los ratones $Fgf15^{-/-}$, cuyos niveles basales de *Asbt* eran similares a los que presentaba la cepa silvestre correspondiente. Se ha descrito que la regulación de la expresión de *Asbt* en ratón está mediada principalmente por la vía *Fxr/Shp/Lrh-1* (Nowicki *et al.*, 1997), sin embargo, pese a que la expresión *Shp* ileal en estas cepas de ratón, es prácticamente indetectable, no pueden excluirse otros mecanismos en los que pudieran estar involucrados los glucocorticoides bien de manera directa o de forma indirecta, a través de su receptor, y en los que, según sugieren los resultados de la (**Fig-R13**), es indispensable la presencia de *Fxr* y *Gr* para que se de esta respuesta. Por otra parte, en estudios *in vitro* se ha comprobado que *Fgf15* puede reprimir la expresión de *Asbt* en enterocitos y colangiocitos (Sinha J *et al.*, 2008). A la vista de los resultados encontrados en los ratones $Fgf15^{-/-}$, se puede concluir que la modulación de los niveles de ARNm de *Asbt* por los tratamientos con glucocorticoides, también requiere la intervención de *Fgf15*.

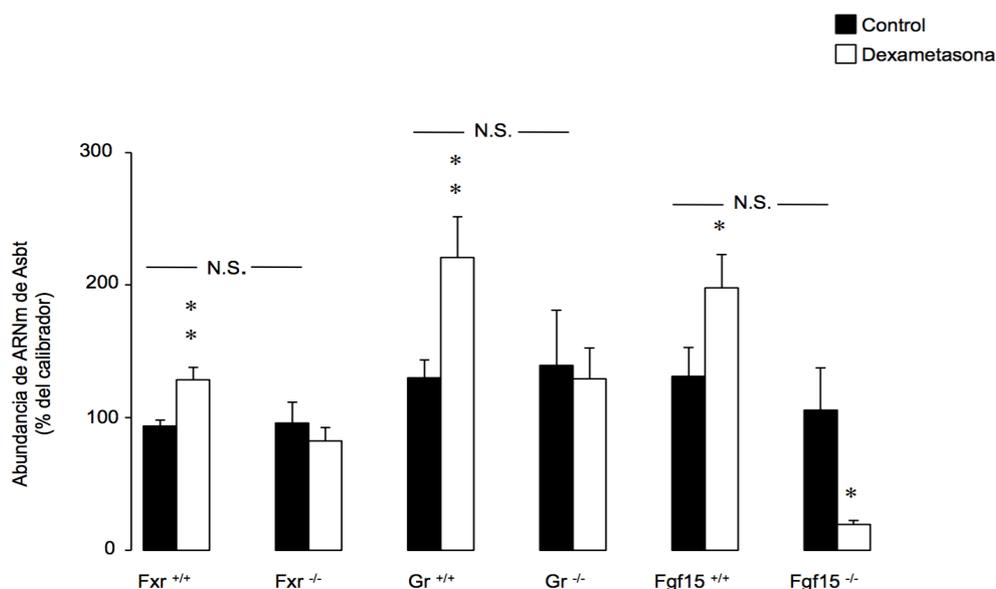


Fig-R13. Niveles de ARNm del transportador ileal de los ácidos biliares *Asbt* determinados por RT-QPCR en íleon de ratones C57BL/6, $Fxr^{-/-}$, KO selectivamente para $Gr^{-/-}$ intestinal y $Fgf15^{-/-}$, control y tratados con dexametasona (0.5 mg/kg p.c.) durante 7 días. Los resultados se representan como porcentaje de abundancia respecto al calibrador para lo que se utilizó ARNm de íleon de ratón de la cepa de referencia o *wild-type* (WT). Cada muestra fue normalizada por su contenido en ARNm para *Gapdh* y los resultados se expresan como media±EEM (n=5-10 por grupo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ en comparación con el grupo control mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

4.2.2. Efecto de los glucocorticoides sobre los genes involucrados en la homeostasis de ABs a nivel hepático

En condiciones fisiológicas, FGF19/Fgf15 una vez secretado desde el ileocito en respuesta a la activación de Fxr por los ABs, alcanza el hígado donde se une a su receptor específico FGFR4/Fgfr4. Como resultado de esta unión se desencadena una cascada de señalización mediada por tirosina quinasas JUNK, ERK1/2 y PI3K, que reprime la síntesis de la enzima clave en la síntesis de ABs, la CYP7A1/Cyp7a1 (para una revisión ver: Uriarte *et al.*, 2014). Sin embargo, en nuestro estudio, pese a la marcada disminución de la expresión de Fgf15 observada tras el tratamiento con DEX, la expresión de Cyp7a1 no se modificó significativamente (**Fig-R14**), lo que concuerda con lo que también se había observado en rata (**Fig-R3 y R5**).

Esta falta de efecto no se debía a la disminución de la expresión de los genes que codifican para los receptores de la membrana del hepatocito que intervienen en la respuesta a Fgf15, ya que el tratamiento con DEX no inducía cambios en los niveles de ARNm de Fgfr4 y β -Klotho (**Tabla-R4**).

Además, observamos que en ratones *Fxr*^{-/-} la expresión basal de Cyp7a1 se encontraba aumentada respecto de su cepa silvestre y el tratamiento con glucocorticoides redujo de manera significativa su expresión (**Fig-R14**). Similares resultados se encontraron en los ratones *Gr*^{+/+} y *Gr*^{-/-}. En ambas cepas, la expresión de Cyp7a1 se reducía por el tratamiento con glucocorticoides (**Fig-R14**). Por el contrario, en ratones *Fgf15*^{-/-}, cuyos niveles basales de Cyp7a1 eran significativamente más elevados que los encontrados en ratones *Fgf15*^{+/+}, los glucocorticoides indujeron una subida en la expresión de Cyp7a1.

Estos resultados fueron inesperados, ya que en todas las cepas de ratón utilizadas, como ya se ha comentado antes (**Fig-R11**), el tratamiento con DEX había reducido drásticamente los niveles de expresión de Fgf15, por lo que esperábamos que Cyp7a1 estuviese sobreexpresado y no al contrario.

En estas mismas condiciones experimentales, tampoco se observaron cambios significativos en los niveles de ARNm de otros genes hepáticos implicados en el transporte (Ntcp, Bsep y Mrp2), la conjugación (Baat) y el control de la homeostasis

de ABs (Fxr, Shp, Lrh-1, Hnf4 α y Pxr) o genes dianas de glucocorticoides implicados en el metabolismo enterohepático (Gr y Pepck) (**Tabla-R4**).

Tabla-R4. Efecto del tratamiento con glucocorticoides sobre los niveles de expresión de genes implicados en la homeostasis de ABs en hígado de ratón

Función	Abundancia de RNAm(% del grupo control)	
	Proteína	WT control vs dexametasona
Receptores Nucleares/Membrana	Fgfr4	88.1 \pm 11.2
	β -klotho	104.4 \pm 13.9
	Shp	92.4 \pm 13.8
	Lrh-1	106.4 \pm 13.5
	Hnf4 α	122.4 \pm 14.1
	Pxr	130.1 \pm 25.9
	Gr	88.1 \pm 10.2
Transportadores	Bsep	101 \pm 6
	Ntcp	95.2 \pm 6.9
	Mrp2	112.7 \pm 19.4
Enzimas	Baat	133 \pm 20.5
	Pepck	117 \pm 19

Tabla-R4. Niveles relativos de ARNm determinados mediante RT-QPCR en hígado de ratones C57BL/6 tratados con dexametasona (0.5 mg/kg p.c.) durante 7 días. Los valores se expresan como porcentajes respecto al grupo control (ratones tratados con solución salina) y son medias \pm EEM de 8-10 animales por grupo. Los resultados se normalizaron usando Gapdh. No se encontraron diferencias significativas con el grupo control mediante el test de la t de Student.

A continuación estudiamos la expresión de las otras enzimas responsables del control de la síntesis de ABs, Cyp27a1 y Cyp8b1.

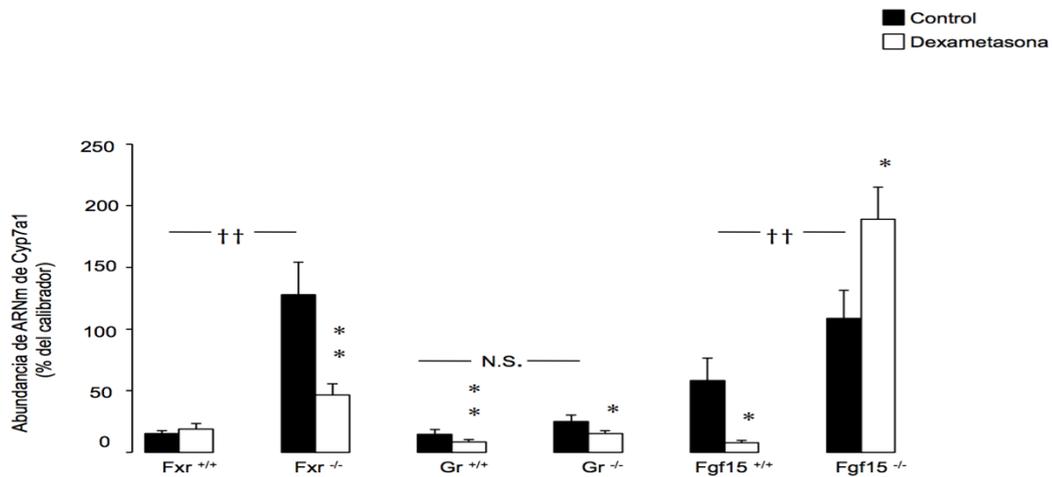


Fig-R14. Niveles de ARNm de la enzima Cyp7a1 determinados por RT-QPCR en hígado de ratones C57BL/6, *Fxr*^{-/-}, KO selectivamente para *Gr*^{-/-} intestinal y *Fgf15*^{-/-}, control y tratados con dexametasona (0.5 mg/kg p.c.) durante 7 días. Los resultados se representan como porcentaje de abundancia respecto al calibrador para lo que se utilizó ARNm de hígado de ratón de la cepa de referencia o *wild-type* (WT). Cada muestra fue normalizada por su contenido en ARNm para *Gapdh* y los resultados se expresan como media±EEM (n=5-10 por grupo). *p<0.05, **p<0.01 en comparación con el grupo control, †p <0.05, ††p <0.01 en comparación con los ratones WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Así, los niveles de expresión de la enzima clave en la vía ácida de la síntesis de los ABs, Cyp27a1 (**Fig-R15**), disminuyeron sólo en ratones *Gr*^{-/-} tras el tratamiento con DEX. La regulación de esta enzima viene determinada por los niveles de ABs en el hepatocito, y es un proceso, mediado por HNF4α (Chen *et al*, 2003), que como se mostró en la **Tabla-R4** no se modificaba en respuesta al tratamiento con DEX. Estos resultados sugieren que existe una regulación de Cyp27a1 a través del GR activado por glucocorticoides (Tang *et al*, 2008).

Por otra parte, la enzima cuya actividad determina las cantidades relativas de las especies moleculares di- y trihidroxiladas de ABs, Cyp8b1, cuya expresión está regulada a través de FXR en condiciones fisiológicas y del receptor nuclear RORα en presencia de DEX (Mörk *et al.*, 2016), no se vio afectada de manera significativa por el tratamiento con el fármaco, salvo en los ratones de tipo silvestre *Fxr*^{+/+} y *Gr*^{+/+} donde los niveles de expresión presentaban una tendencia a disminuir en presencia del glucocorticoide.

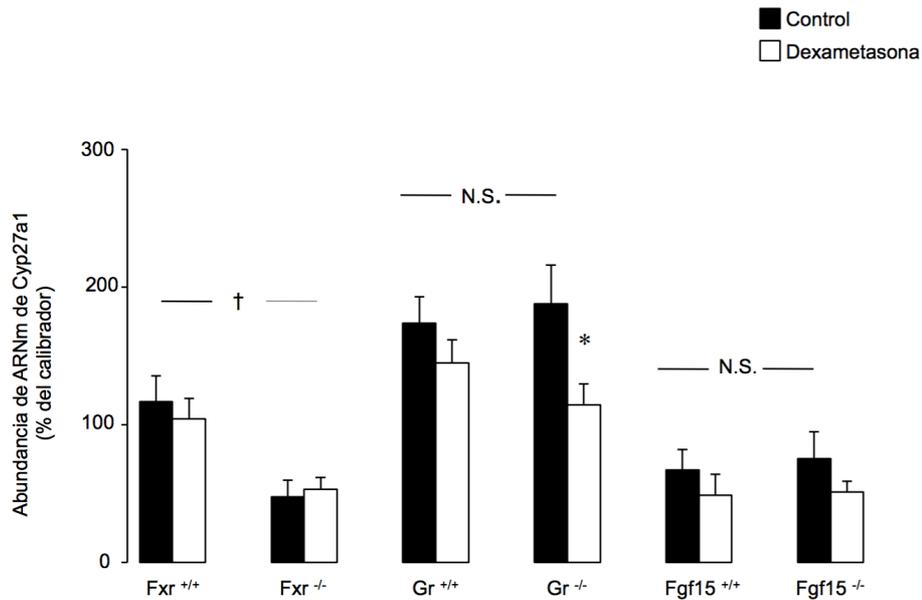


Fig-R15. Niveles de ARNm de la enzima Cyp27a1 determinados por RT-QPCR en hígado de ratones C57BL/6, *Fxr*^{-/-}, KO selectivamente para *Gr*^{-/-} intestinal y *Fgf15*^{-/-}, control y tratados con dexametasona (0.5mg/kg p.c.) durante 7 días. Los resultados se representan como porcentaje de abundancia respecto al calibrador para lo que se utilizó ARNm de hígado de ratón de la cepa de referencia o *wild-type* (WT). Cada muestra fue normalizada por su contenido en ARNm para *Gapdh* y los resultados se expresan como media±EEM (n=5-10 por grupo). *p<0.05, **p<0.01 en comparación con el grupo control, †p <0.05, ††p <0.01 en comparación con los ratones WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

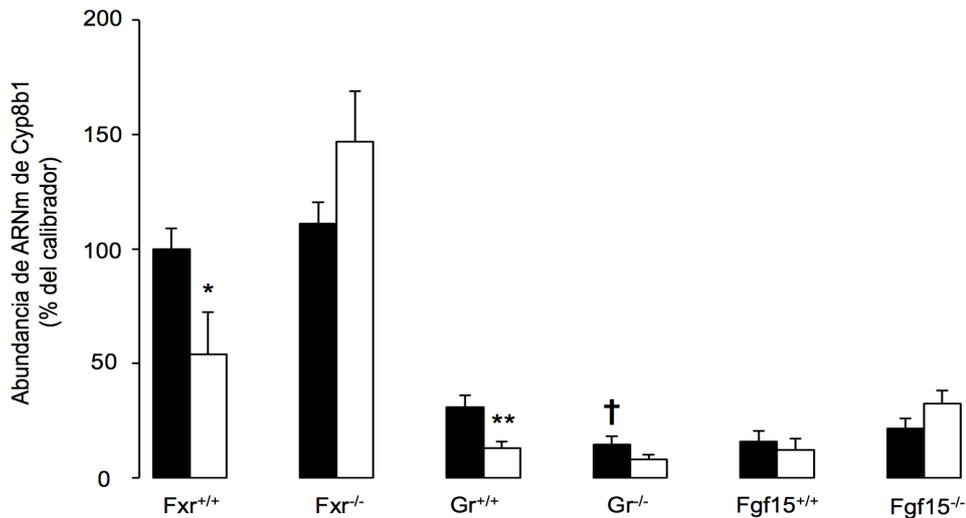


Fig-R16. Niveles de ARNm de la enzima Cyp8b1 determinados por RT-QPCR en hígado de ratones C57BL/6, *Fxr*^{-/-}, KO selectivamente para *Gr*^{-/-} intestinal y *Fgf15*^{-/-}, control y tratados con dexametasona (0.5 mg/kg p.c.) durante 7 días. Los resultados se representan como porcentaje de abundancia respecto al calibrador para lo que se utilizó ARNm de hígado de ratón de la cepa de referencia o *wild-type* (WT). Cada muestra fue normalizada por su contenido en ARNm para *Gapdh* y los resultados se expresan como media±EEM (n=5-10 por grupo). *p<0.05, **p<0.01 en comparación con el grupo control, †p <0.05, en comparación con los ratones WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Para investigar el impacto del tratamiento con glucocorticoides sobre el tandem *Fgf15/Fgf21*, se estudió la abundancia de ARNm de éste último en respuesta a diferentes dosis de DEX. Al igual que ocurría en ratas y hemos comentado en apartados anteriores y como han observado otros autores (Vispute *et al.*, 2017), los niveles de expresión de *Fgf21* se incrementaron de manera dosis-dependiente en respuesta al tratamiento con DEX (**Fig-R17**). Para evaluar si *Fxr* estaba implicado en este efecto, se determinó la expresión de *Fgf21* en el hígado de ratones *Fxr*^{-/-}. Los niveles de ARNm de *Fgf21* en estos animales ya eran significativamente mayores en comparación con los encontrados en los ratones de la cepa silvestre (**Fig-R18**). El tratamiento con DEX fue capaz de inducir un aumento adicional en su expresión. En los ratones *Gr*^{-/-} y *Fgf15*^{-/-}, la expresión de *Fgf21* no fue diferente a la de su cepa de tipo silvestre (**Fig-R18**), pero el tratamiento con DEX también indujo un aumento de su expresión. Así, en todas las cepas de ratón utilizadas la abundancia de ARNm de *Fgf21* se incrementó por el tratamiento con

DEX (**Fig-R18**), y este efecto no era debido a cambios de expresión o a una activación de Pxr, ya que como se recoge en la **Tabla-R4**, no se modificaron los niveles de ARNm de Pxr, ni de su diana directa Mrp2 tras el tratamiento.

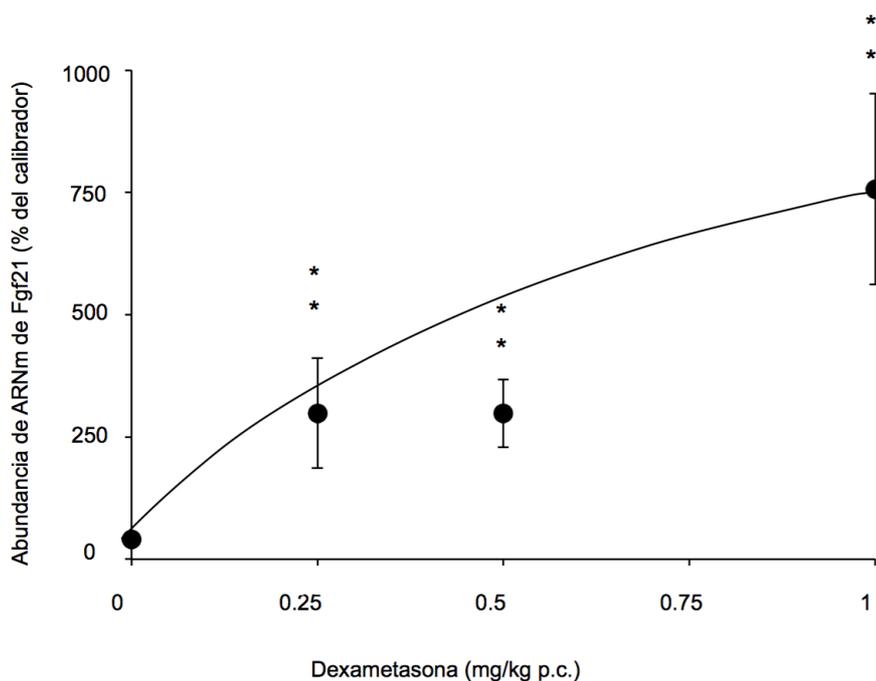


Fig-R17. Niveles de ARNm de Fgf21 determinados por RT-QPCR en hígado de ratones control y tratados con diferentes dosis de dexametasona durante 7 días. Los resultados se representan como porcentaje de abundancia respecto al calibrador (ARNm de hígado de ratón control) en cada muestra normalizada por Gapdh y son media±EEM (n=5-10 por grupo). *p<0.05, **p<0.01 en comparación con el grupo control, por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

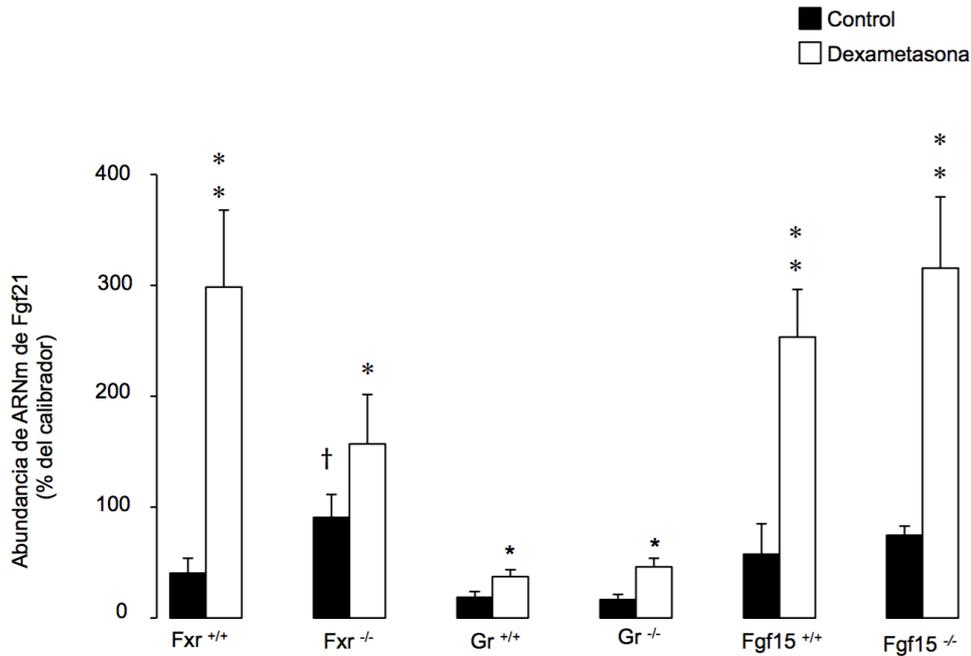


Fig-R18. Niveles de ARNm de Fgf21 determinados por RT-QPCR en hígado de ratones C57BL/6, *Fxr*^{-/-}, KO selectivamente para *Gr*^{-/-} intestinal y *Fgf15*^{-/-}, control y tratados con dexametasona (0.5mg/kg p.c.) durante 7 días. Los resultados se representan como porcentaje de abundancia respecto al calibrador para lo que se utilizó ARNm de hígado de ratón de la cepa de referencia o *wild-type* (WT). Cada muestra fue normalizada por su contenido en ARNm para Gapdh y los resultados se expresan como media±EEM (n=5-10 por grupo). *p<0.05, **p<0.01 en comparación con el grupo control, †p <0.05, en comparación con los ratones WT mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

4.2.3. Efecto de la DEX sobre los niveles y especies de ABs en suero de ratón

La determinación del perfil de diferentes especies moleculares de ABs en suero reveló que los ratones *Fxr*^{+/+} y *Fxr*^{-/-} presentaban una composición similar en términos de formas libres (α MC, β MC, UDC, CA, QDC y DC) y tauroconjugadas (T α MC, T β MC, TUDC, TC, TQDC y TDC) (**Fig-R19B** y **19C**). Sin embargo, la relación tauroconjugados/libres fue aproximadamente 2 en ratones *Fxr*^{+/+} (**Fig-R19B** y **19C**) y cerca de 5 en ratones *Fxr*^{-/-} (**Fig-R20B** y **20C**).

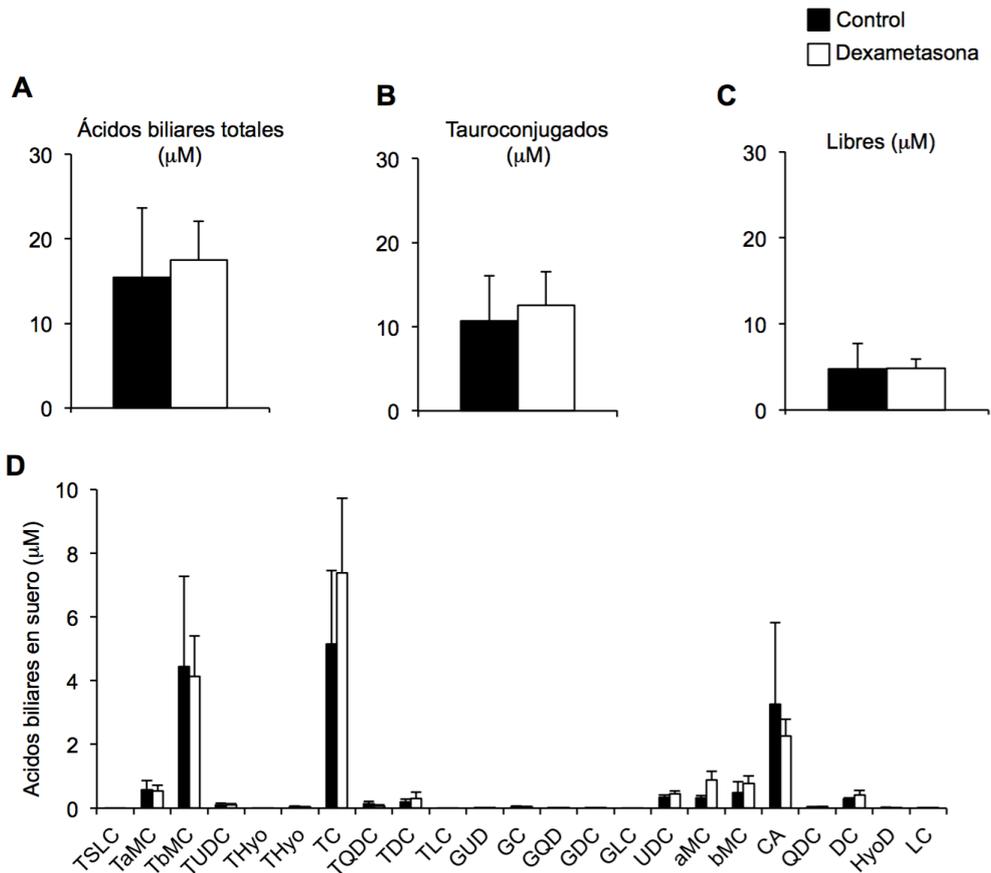


Fig-R19. Concentración de ácidos biliares totales (A), tauroconjugados (B), libres (C) y de las diferentes especies de ácidos biliares (D) en suero de ratones C57BL/6 *Fxr*^{+/+} control o tratados durante 7 días con 0.5 mg/kg p.c. de dexametasona. La determinación de ácidos biliares se llevó a cabo por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media±EEM de 8-10 animales en cada grupo. No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) al comparar ambos grupos mediante el test de la t de Student.

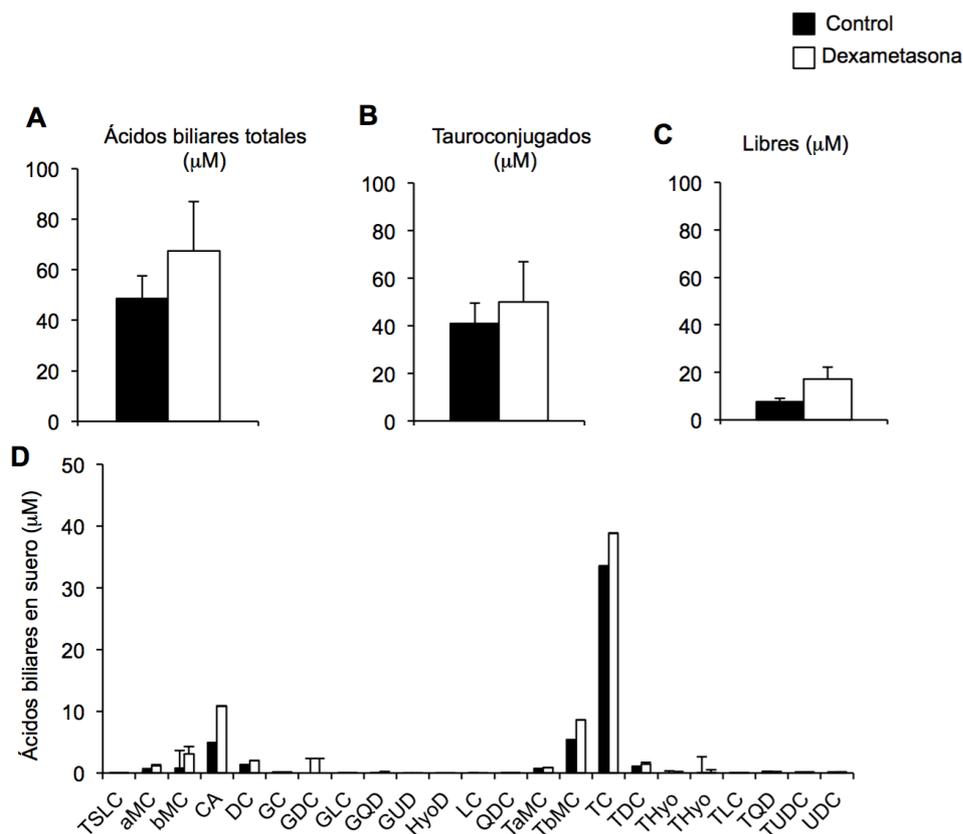


Fig-R20. Concentración de ácidos biliares totales (**A**), tauroconjugados (**B**), libres (**C**) y de las diferentes especies de ácidos biliares (**D**) en suero de ratones C57BL/6 *Fxr*^{-/-} control o tratados durante 7 días con 0.5 mg/kg p.c. de dexametasona. La determinación de ácidos biliares se llevó a cabo por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media±EEM de 8-10 animales en cada grupo. No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) al comparar ambos grupos mediante el test de la t de Student.

Además la concentración de ABs totales en el suero fue significativamente mayor en ratones *Fxr*^{-/-} (x3) comparados con los ratones de tipo silvestre del que derivan (**Fig-R20A**), lo que se relaciona con la sobreexpresión de Cyp7a1 (**Fig-R14**). Esta diferencia se debió principalmente a las formas tauroconjugadas (**Fig-R20B**), especialmente a TC (**Fig-R20D**), lo que no podría asociarse en principio a diferencias de expresión en la enzima conjugante Baat ya que no se encontraron diferencias significativas entre ratones *Fxr*^{+/+} y *Fxr*^{-/-}. En ambas cepas, el perfil y la concentración de ABs no se modificó significativamente después del tratamiento DEX (0.5 mg / kg p.c.) durante 7 días (**Fig-R19 y 20**).

Los ratones $Gr^{+/+}$ y $Gr^{-/-}$ presentaron similitud de perfiles tanto de especies moleculares (**Fig-R21D y 22D**), como en las concentraciones de ABs totales (**Fig-R21A y 22A**). El tratamiento con la dosis no hepatotóxica de DEX (0.5 mg/kg p.c.) no modificó ni las concentraciones de ABs ni las composiciones o proporciones entre las especies moleculares de ABs (**Fig-R21 y 22**).

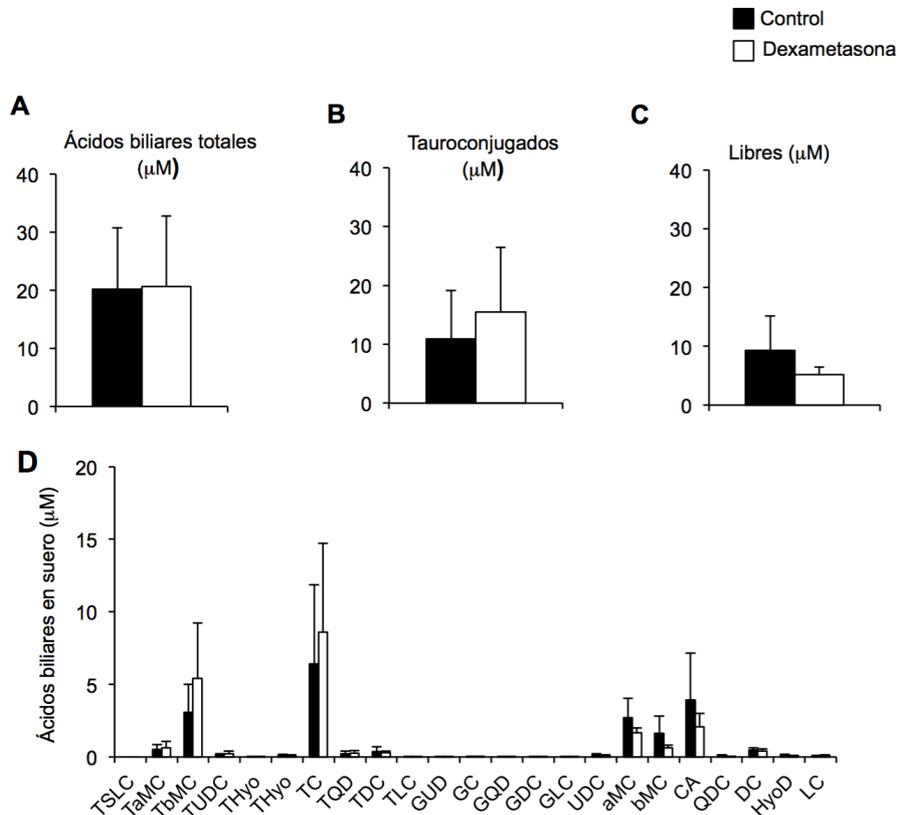


Fig-R21. Concentración de ácidos biliares totales (**A**), tauroconjugados (**B**), libres (**C**) y de las diferentes especies de ácidos biliares (**D**) en suero de ratones C57BL/6 $Gr^{+/+}$ control o tratados durante 7 días con 0.5 mg/kg p.c. de dexametasona. La determinación de ácidos biliares se llevó a cabo por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media±EEM de 8-10 animales en cada grupo. No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) al comparar ambos grupos mediante el test de la t de Student.

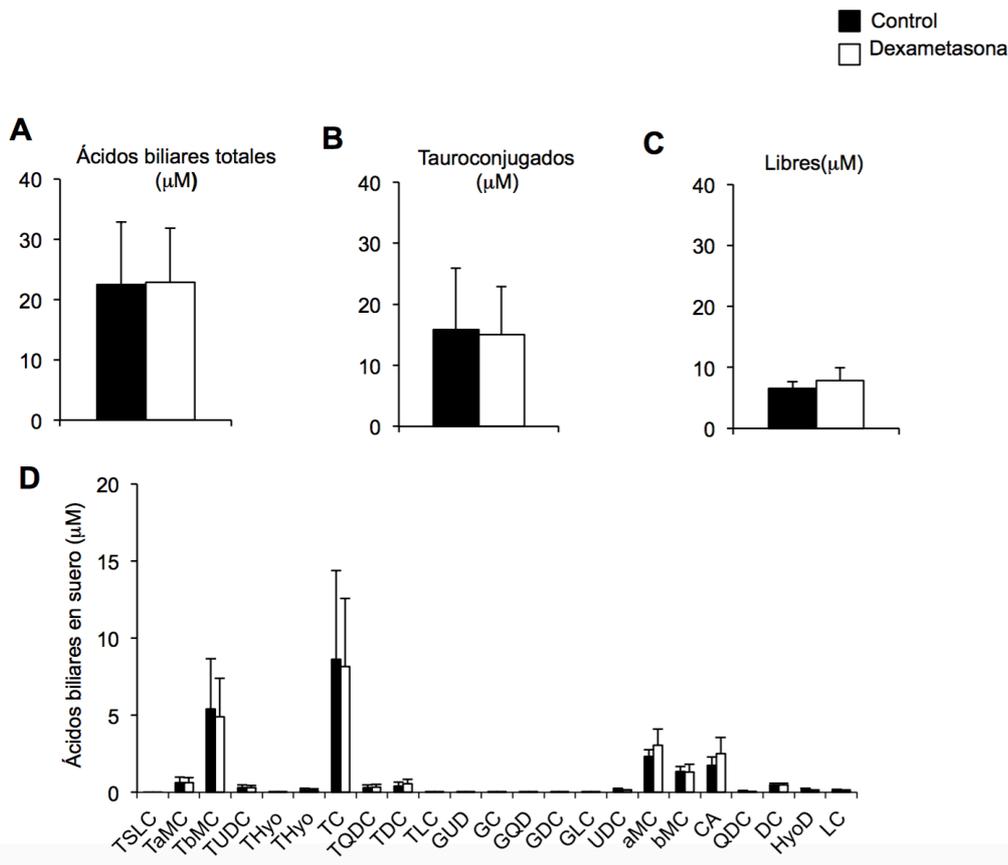


Fig-R22. Concentración de ácidos biliares totales (**A**), tauroconjugados (**B**), libres (**C**) y de las diferentes especies de ácidos biliares (**D**) en suero de ratones C57BL/6 *Gr*^{-/-} selectivamente para *Gr* intestinal control o tratados durante 7 días con 0.5 mg/kg p.c. de dexametasona. La determinación de ácidos biliares se llevó a cabo por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media±EEM de 8-10 animales en cada grupo. No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) al comparar ambos grupos mediante el test de la *t* de Student.

Sin embargo, la determinación del perfil de diferentes especies moleculares de ABs en suero reveló algunas diferencias entre los ratones *Fgf15*^{+/+} y *Fgf15*^{-/-}. Las especies moleculares TDC y DC fueron más abundantes en ratones *Fgf15*^{-/-} que en los ratones de tipo silvestre (**Fig-R23D** y **24D**). Esta diferencia podría ser debida a la relación existente entre la microbiota intestinal responsable de la génesis de especies secundarias de ABs, con la actividad de la vía de señalización Fxr/*Fgf15* (Wahlström *et al.*, 2017).

La relación de tauroconjugados/libres era aproximadamente 0.2 en ratones *Fgf15*^{+/+} (**Fig-R23B** y **23C**) y cerca de 0.7 en ratones *Fgf15*^{-/-} (**Fig-R24B** y **24C**). La concentración de ABs totales en el suero fue mayor en ratones *Fgf15*^{-/-} (x2)

comparados con la cepa silvestre (**Fig-R24A**), lo que se debía a la presencia tanto de formas tauroconjugadas como de formas no conjugadas (**Fig-R24B y 24C**). Estos resultados podrían deberse a la mayor expresión de Cyp7a1 que presentan los ratones *Fgf15*^{-/-} respecto de los *Fgf15*^{+/+} (**Fig-R14**).

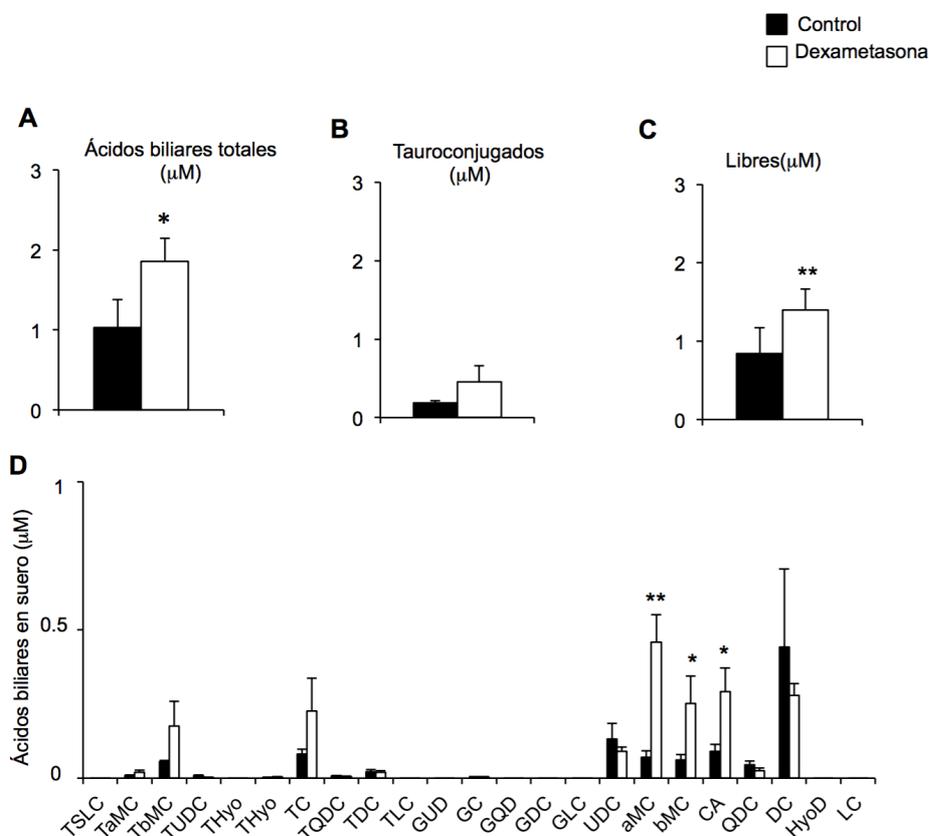


Fig-R23. Concentración de ácidos biliares totales (**A**), tauroconjugados (**B**), libres (**C**) y contenido de las diferentes especies de ácidos biliares (**D**) en suero de ratones C57BL/6 *Fgf15*^{+/+} control o tratados durante 7 días con 0.5 mg/kg p.c. de dexametasona. La determinación de ácidos biliares se llevó a cabo por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media \pm EEM de 8-10 animales en cada grupo. *p<0.05, **p<0.01 en comparación con el grupo control por el test de la t de student.

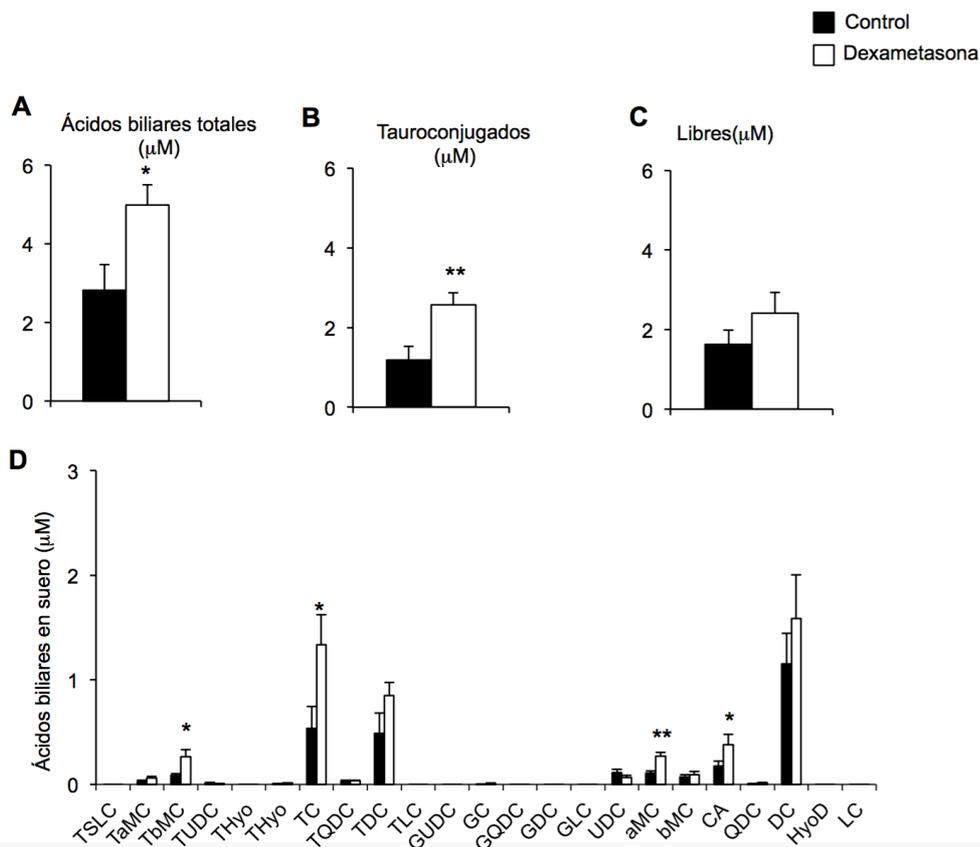


Fig-R24. Concentración de ácidos biliares totales (A), tauroconjugados (B), libres (C) y contenido de las diferentes especies de ácidos biliares (D) en suero de ratones C57BL/6 *Fgf15*^{-/-} control o tratados durante 7 días con 0.5 mg/kg p.c. de dexametasona. La determinación de ácidos biliares se llevó a cabo por HPLC-MS/MS. Los valores se expresan como media \pm EEM de 8-10 animales en cada grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ en comparación con el grupo control por el test de la t de student.

Tanto en ratones *Fgf15*^{-/-} como en su correspondiente cepa silvestre la concentración de ABs totales aumentó significativamente después del tratamiento con DEX (Fig-R23 y 24). En el caso de los ratones *Fgf15*^{+/+} se observó un aumento significativo de las formas libres pero no de las tauroconjugadas, lo que podría relacionarse con la disminución de la expresión de la enzima Baat, ya que los niveles de ARNm de Baat que encontramos en los ratones *Fgf15*^{-/-} tratados fue la mitad (57%) del de los ratones silvestres ($p < 0.05$). En el caso de los ratones *Fgf15*^{-/-} el aumento de ABs totales podrían ser un reflejo de la sobreexpresión de Cyp7a1 inducida por el tratamiento con DEX.

4.3. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LOS GENES IMPLICADOS EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ENTEROHEPÁTICA FXR/FGF19 EN CÉLULAS DE HEPATOMA DE ORIGEN HUMANO

Debido a que la activación de FXR por ABs induce el aumento de expresión de FGF19, (Miyata *et al.*, 2012) nos preguntamos si la disminución de los niveles de expresión de Fgf15 inducida por glucocorticoides en los modelos *in vivo* estaba mediada por su interacción directa con la vía de señalización de FXR.

Para responder a esta pregunta se utilizaron células Alexander de hepatoma humano que no expresan FXR ni CYP7A1 de manera endógena, pero que si expresan FGF19. Estas células se transfectaron con el vector vacío 3.1 o con vectores que contenían los plásmidos RXR y FXR.

Como se describió anteriormente (Rosales *et al.*, 2013), cuando las células Alexander se trataron con glucocorticoides, la expresión de BSEP se incrementó sólo en células transfectadas con FXR/RXR e incubadas con el agonista de FXR GW4064 (**Fig-R24A**).

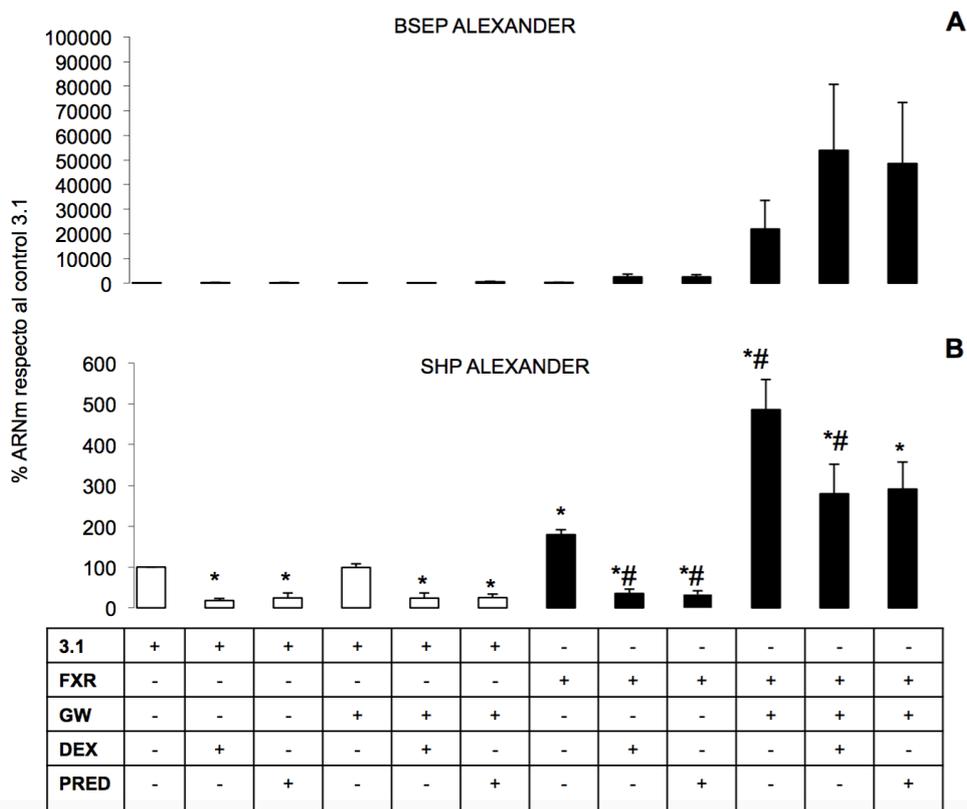


Fig-R24. Efecto de la DEX y la PRED en la expresión de BSEP (A) y SHP (B) en la línea celular Alexander de hepatoma humano transfectada con plásmidos conteniendo FXR/RXR 24 horas antes de añadir al medio de cultivo 20 µM de los glucocorticoides. En algunos casos, se incubaron con 1 µM del agonista de FXR GW4064 durante 24 horas tras añadir los glucocorticoides. Los valores obtenidos mediante RT-QPCR son media±EEM del porcentaje respecto del control 3.1 (células transfectadas con el vector vacío). *p<0.05 comparadas con el grupo control 3.1 y #p<0.05 comparada con su control (DMSO) mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

En estas condiciones experimentales, el tratamiento con el agonista de FXR GW4064 fue capaz de inducir la sobreexpresión de FGF19 (Fig-R25). Sin embargo, los glucocorticoides, tanto DEX como PRED, redujeron su expresión tanto en condiciones basales como cuando FXR fue estimulado por GW4064 (Fig-R25). Esto no se debió a cambios en la expresión de FXR (Fig-R26B). De manera similar a lo que ocurría con FGF19, los glucocorticoides inhibían el efecto estimulador inducido por GW4064 en la regulación de SHP (Fig-R24B). Esta represión de la expresión de SHP, también se observó en las células transfectadas con el vector vacío 3.1.

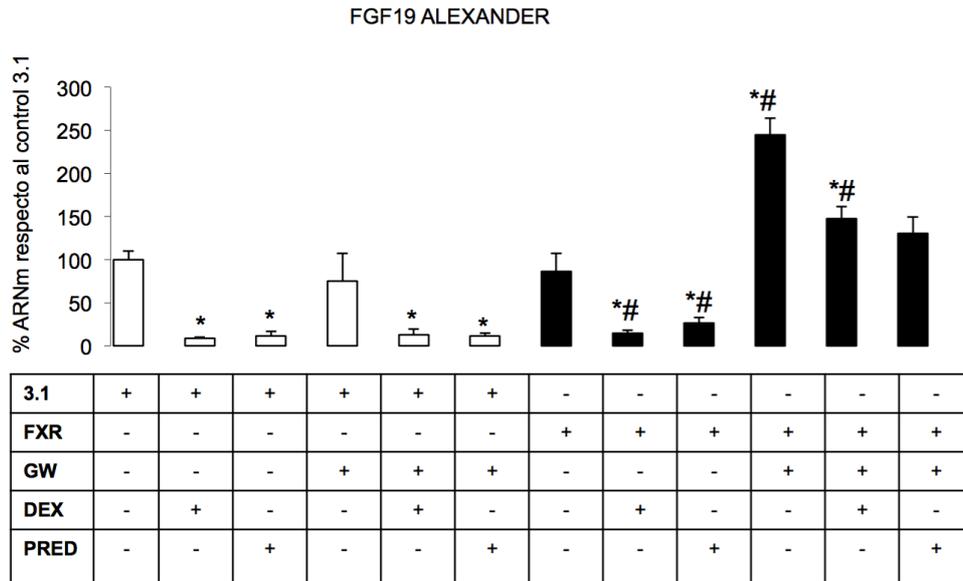


Fig-R25. Efecto de la DEX y la PRED en la expresión de FGF19 en la línea celular Alexander de hepatoma humano transfectada con plásmidos conteniendo FXR/RXR 24 horas antes de añadir al medio de cultivo 20 μ M de los glucocorticoides. En algunos casos, se incubaron con 1 μ M del agonista de FXR GW4064 durante 24 horas tras añadir los glucocorticoides. Los valores obtenidos mediante RT-QPCR son media \pm EEM del porcentaje respecto del control 3.1 (células transfectadas con el vector vacío). * p <0.05 comparadas con el grupo control 3.1 y # p <0.05 comparada con su control (DMSO) mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Por el contrario, los glucocorticoides estimularon la expresión de CYP27A1, de una manera independiente de FXR (**Fig-R 26A**).

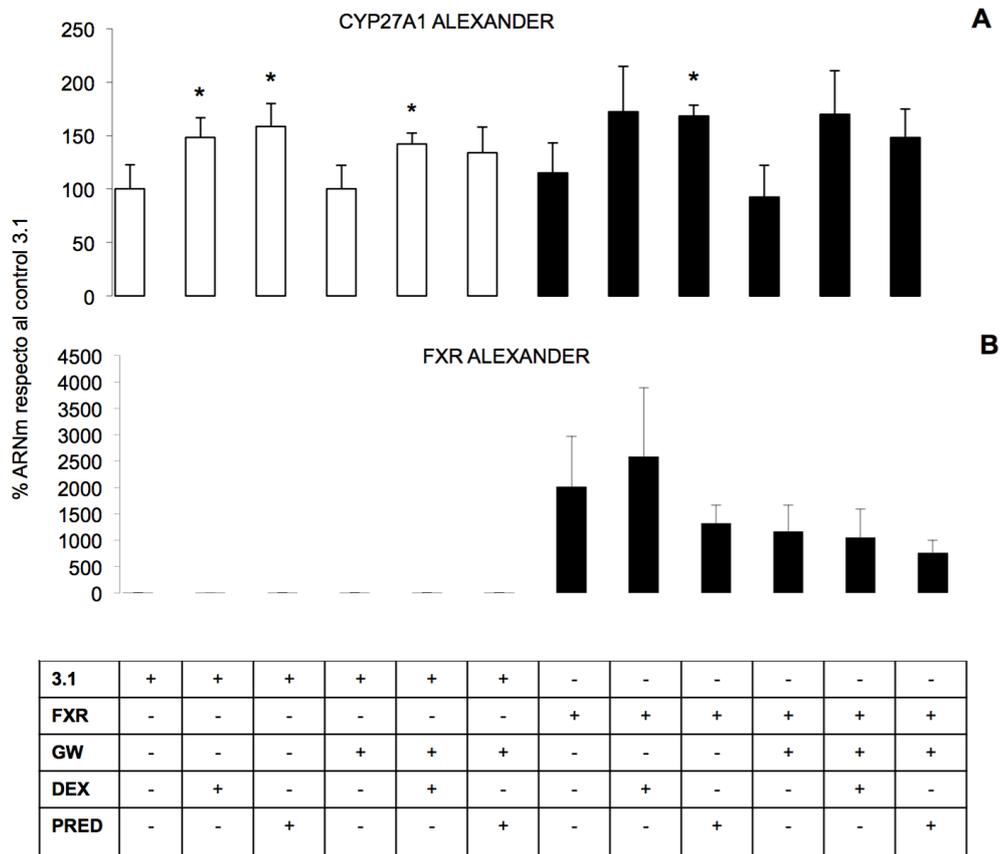


Fig-R26. Efecto de la DEX y la PRED en la expresión de CYP27A1 **(A)** y FXR **(B)** en la línea celular Alexander de hepatoma humano transfectada con plásmidos conteniendo FXR/RXR 24 horas antes de añadir al medio de cultivo 20 μ M de los glucocorticoides. En algunos casos, se incubaron con 1 μ M del agonista de FXR GW4064 durante 24 horas tras añadir los glucocorticoides. Los valores obtenidos mediante RT-QPCR son media \pm EEM del porcentaje respecto del control 3.1 (células transfectadas con el vector vacío). * p <0.05 comparadas con el grupo control 3.1 mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Cuando las células Alexander fueron incubadas con MFS, un antagonista del receptor GR, se observó una reducción en los niveles de ARNm de FGF19 de manera dependiente **(Fig-R27A)** e independiente de FXR **(Fig-R28)**.

En estas condiciones experimentales, se reprimió la expresión de ARNm de PCK1 un gen diana directa de GR **(Fig-R27B)**. Cuando las células se trataron con DEX y MFS simultáneamente, se observó una reducción similar en FGF19 a la encontrada de manera individual para cada una de estos dos fármacos **(Fig-R27)**.

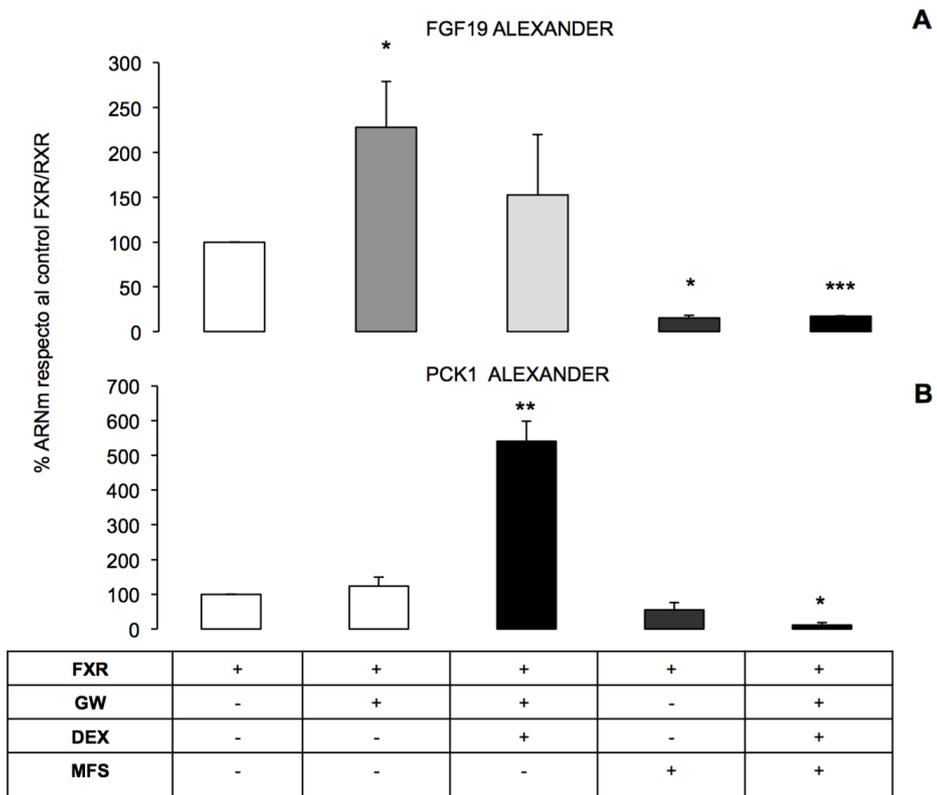


Fig-R27. Efecto de la DEX y la MFS en la expresión de FGF19 (**A**) y PCK1 (**B**) en la línea celular Alexander de hepatoma humano transfectada con plásmidos conteniendo FXR/RXR 24 horas antes de añadir al medio de cultivo 20 μ M de los glucocorticoides. En algunos casos, las células se incubaron con 1 μ M de GW4064 y 40 μ M de MFS durante 24 horas tras añadir los glucocorticoides. Los valores obtenidos mediante RT-QPCR son media \pm EEM del porcentaje respecto del control de las células transfectas FXR/RXR. * p <0.05, ** p <0.01 y *** p <0.001 comparadas con el grupo control de las células transfectadas FXR/RXR mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

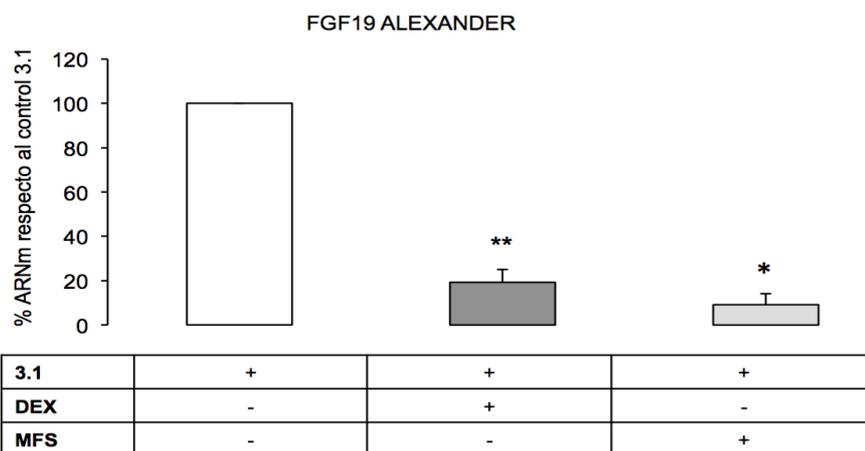


Fig-R28. Efecto de la DEX y la MFS en la expresión de FGF19 en la línea celular Alexander de hepatoma humano transfectada con vector vacío 3.1 (carente de ORF de FXR), 24 horas antes de añadir al medio de cultivo 20 μ M de los glucocorticoides. En algunos casos, las células se incubaron con 40 μ M de MFS durante 24 horas más tras añadir los glucocorticoides. Los valores obtenidos mediante RT-QPCR son la media \pm EEM del porcentaje respecto del control 3.1 (DMSO). * p <0.05, ** p <0.01 comparadas con el grupo control 3.1 mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Por otra parte, en un estudio realizado en nuestro grupo de investigación por la alumna Dña. Cristina Pizarro Sánchez, cuando se sometieron células de adenocarcinoma de colon humano que tampoco expresan FXR, pero que además carecen del receptor GR, a las mismas condiciones experimentales que las Alexander, se observó un perfil de inducción de FGF19 diferente al encontrado en las células de hepatoma (Pizarro C, 2015). Así, en ausencia de cambios de expresión de FXR y tras haber confirmado su activación a través del análisis del aumento de expresión de IBABP, se observó que el tratamiento con glucocorticoides era capaz de incrementar, no de disminuir, los niveles de ARNm de FGF19 sólo en las células transfectadas e incubadas simultáneamente con GW4064. Estos resultados en conjunto sugieren la existencia de un papel importante, ya sea de manera directa por interacción con FXR o con su vía de señalización o indirecta, a través del receptor GR, de los glucocorticoides en la regulación de la expresión de FGF19.

4.4. DISCUSIÓN GENERAL

A pesar de que el efecto de los glucocorticoides sobre la homeostasis de los ABs ha despertado un gran interés desde los años 70, cuando se describió por primera vez el efecto del cortisol sobre los ritmos circadianos de Cyp7a1 en ratas adrenalectomizadas (Mitropoulos *et al.*, 1976), el fenómeno en todas sus facetas sólo se ha descifrado parcialmente. Desde el primer artículo, en el que se describió dicha relación, hasta la actualidad han aparecido una amplia gama de trabajos utilizando diferentes modelos experimentales y estudios en humanos que apuntan a que los glucocorticoides pueden desempeñar un papel en la regulación de la síntesis, transporte y metabolismo de los ABs (para una revisión ver Rose *et al.*, 2013). Sin embargo, existen bastantes discrepancias entre estos trabajos en cuanto a los cambios que se producen en la homeostasis de los ABs en respuesta al tratamiento con glucocorticoides. Así, mientras unos autores describen un efecto global colestático (Rose *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012), otros indican la existencia de un efecto global colerético en el caso de los tratamientos prolongados (Out *et al.*, 2014; Mabuchi *et al.*, 2003).

En nuestro grupo de investigación habíamos encontrado dos tipos de evidencias de la existencia de una relación entre los glucocorticoides y la expresión del regulador clave en el metabolismo de los ABs, el FXR, puesto que describimos cambios en su expresión y en la de sus genes diana (Rosales *et al.*, 2013). Por una parte el tratamiento de ratas con DEX era capaz de inducir no sólo cambios en los niveles de ABs séricos y en su patrón de conjugación, sino también de disminuir la capacidad de secretarlos a bilis, lo que podría ser el reflejo de una reducción en la expresión de genes dianas de Fxr, como Cyp7a1, Baat y Ntcp, respectivamente. Por otra parte, en estudios preliminares *in vitro*, habíamos encontrado evidencias de que la ruta de señalización enterohepática regida por el tandem FXR/FGF19 podría verse alterada en respuesta a la presión farmacológica que supone el tratamiento con glucocorticoides (Pizarro, 2015).

El control de la expresión de FGF19/Fgf15 es una cuestión de interés y actualidad por sus implicaciones, no solo en el metabolismo de los ABs, sino también en el de otros lípidos y de la glucosa, además de por su posible papel en procesos patológicos como son la colestasis, diversas enfermedades inflamatorias intestinales y la hepatocarcinogénesis (para una revisión ver Uriarte *et al.*, 2017).

Aunque en condiciones fisiológicas, la expresión ileal de FGF19/Fgf15 se encuentra bajo el control de FXR/Fxr, otros NRs, como son VDR, Diet1 y PXR, pueden condicionar su expresión (Miyata *et al.*, 2012). Este último NR puede activarse por unión a DEX y modificar la expresión de sus genes dianas (Mörk *et al.*, 2016). Esto es relevante en nuestro caso, puesto que algunos autores han sugerido la posibilidad de que PXR pueda regular la expresión hepática de FGF19/Fgf15 en células tumorales o en procesos colestáticos (Wistuba *et al.*, 2007). Sin embargo, en nuestro estudio hemos encontrado evidencias de que los glucocorticoides pueden estimular la expresión de FGF19/Fgf15 por un mecanismo diferente a la activación de PXR. Esta afirmación se basa en que en nuestros modelos experimentales *in vivo*, ni la expresión de PXR ni la de un gen diana típico como es el *ABCC2* se vieron afectadas por el tratamiento con DEX.

Por otra parte, hemos observado que tanto en ratones *Fxr*^{-/-} (Fu *et al.*, 2016; Stroeve *et al.*, 2010) como en *Gr*^{-/-}, la expresión ileal de *Fgf15* mostró una cierta dependencia del receptor correspondiente noqueado, pero a la vez dicha expresión se reducía aún más después del tratamiento con glucocorticoides. Esta observación es una de las aportaciones más novedosas de este estudio.

El análisis *in silico* de la secuencia del promotor FGF19 (NC_000011) revela la presencia de tres GRE simples: dos GRE correspondientes a la secuencia consenso TGTTC y otro GRE que presenta la secuencia GGTACA, que pese a ser solo la mitad de la secuencia asignada para un ER, puede desempeñar un papel importante en su regulación (Del Monaco *et al.*, 1997). En este momento, con los datos disponibles, solo se puede especular sobre los posibles mecanismos reguladores de la expresión de FGF19 por glucocorticoides. Podríamos hipotetizar que o bien el GR activado por los glucocorticoides, se une directamente a un GRE y puede reducir la expresión de un gen diana, en este caso FGF19, por un mecanismo de represión clásica (Nixon *et al.*, 2013), o bien a través del complejo ASCOM (Kim *et al.*, 2009), que ha sido descrito como elemento iniciador de la activación de algunos genes diana de FXR en cooperación con GR, en células hepáticas (Ananthanarayanan *et al.*, 2011), el cual podría verse modificado tras la unión del glucocorticoide al GR ocasionando una reducción en la expresión de FGF19/Fgf15.

Este mecanismo estaría de acuerdo con los resultados que hemos encontrado en el presente estudio, puesto que el tratamiento con glucocorticoides puede inhibir la expresión de FGF19/Fgf15, lo que no se debe a una reducción en la expresión de FXR/Fxr. Es más, se produce en ausencia de expresión de este NR. Por otra parte, los resultados sugieren que podría tratarse de un mecanismo que presenta un componente independiente del GR/Gr.

Pese al marcado descenso de los niveles de expresión de FGF19/Fgf15 que observamos tras el tratamiento con glucocorticoides, resultó sorprendente el no detectar una sobreexpresión de CYP7A1/Cyp7a1, ya que como cabría esperar, los principales mecanismos de control de la expresión de esta enzima incluye la activación del receptor de FGF19/Fgf15, es decir FGFR4 formando un heterodímero con β -Klotho, lo que reprime la expresión de la enzima. Esta represión también puede producirse a nivel puramente hepático al activarse FXR y desencadenar la transcripción de SHP que inhibe la activación del promotor de CYP7A1/Cyp7a1 (Inagaki *et al.*, 2005; Angelin *et al.*, 2005). Así pues, inesperadamente, en ausencia de cambios en la expresión hepática de los receptores nucleares y de membrana y de los factores de transcripción implicados, el tratamiento con glucocorticoides o no modificó la expresión de CYP7A1/Cyp7a1, o la redujo. Además, esta represión es independiente de FXR/Fxr. No se puede descartar una intervención del GR/Gr hepático en esta modulación, puesto que los modelos utilizados en este trabajo eran o bien KO selectivos para el Gr intestinal, lo que dejaba el Gr hepático intacto, o bien fueron silenciados químicamente con MFS lo que suponía una inhibición parcial de la actividad del Gr hepático.

El análisis *in silico* de la secuencia del promotor de CYP7A1 (NM_000780.3) identifica dos sitios con la secuencia consenso ATTACA, necesaria para la unión de GR. Como se ha comentado anteriormente, podríamos hipotetizar que el GR/Gr activado por los glucocorticoides, se une directamente a uno o a los dos GRE simples y puede reducir la expresión del gen diana CYP7A1/Cyp7a1, por un mecanismo de represión clásica. Por otra parte, tampoco se puede descartar que en el caso del promotor de CYP7A1/Cyp7a1 también esté ocurriendo un mecanismo de "tethering", donde el GR/Gr en forma monomérica no interacciona con el DNA, sino que a través de su LBD se puede unir a otros factores de transcripción (Ray *et al.* Prefontaine.,1994), como son SHP/Shp, LRH-1/Lrh-1 y HNF4 α /Hnf4 α , bloqueando su unión al complejo transcripcional.

Curiosamente hemos encontrado, que la ausencia total de expresión de Fgf15 permite la sobreexpresión de Cyp7a1 en respuesta al tratamiento con DEX. Para poder explicar estos resultados, debemos primero analizar lo que sucede con la expresión ileal de Asbt en estas condiciones. Se ha descrito que el tratamiento prolongado con BUD induce la expresión de ASBT ileal en voluntarios sanos (Jung *et al.*, 2004). En nuestro estudio en ratones, hemos observado que el tratamiento con glucocorticoides reduce la expresión intestinal de Fgf15 a la par que estimula la expresión de Asbt (Sinha *et al.*, 2008), a través de un mecanismo dependiente tanto de Fxr (para una revisión ver Kosters et Karpen, 2008), como de Gr (Nowiki *et al.*, 1997). Sin embargo, en los ratones *Fgf15^{-/-}*, el tratamiento con DEX provocó una marcada reducción de la expresión de Asbt. Esta reducción probablemente se traduce en un descenso de la capacidad de captación intestinal de ABs en los animales tratados. Estos eventos junto con la ausencia en ratones *Fgf15^{-/-}* del control inhibitorio ejercido por Fgf15 tendrían como consecuencia la sobreexpresión hepática de Cyp7a1, lo que podría explicar el marcado aumento de ABs que encontramos en el suero de los ratones *Fgf15^{-/-}* tratados con DEX.

Pese a la marcada disfunción de la vía de señalización enterohepática que relaciona Fxr, Fgf15 y Cyp7a1, encontramos que en respuesta al tratamiento con glucocorticoides, se modificaron los niveles hepáticos de Fgf21, un péptido con acciones antagonistas a las de Fgf15. El cambio consistió en modificación de la expresión de Fgf21 en sentido inverso al de Fgf15. Recientemente los factores tanto FGF19 como FGF21 están atrayendo un especial interés por parte de los investigadores de varios campos de la bioquímica y la fisiología metabólica debido a que parte de sus funciones emulan a los del tandem insulina/glucagón en los periodos ayuno/ingesta. Sin embargo, hasta ahora no se han identificado los elementos de la ruta de señalización que interrelacionan al trío FXR, FGF19 y FGF21, de manera que puedan interactuar entre si y que puedan verse afectados por elevados niveles de glucocorticoides, ya sea por tratamiento prolongado con estos compuestos o por hipersecreción patológica, como en el caso de pacientes con síndrome de Cushing. Existen pocos estudios sobre los niveles de FGF19 y FGF21 en el plasma de estos pacientes, sin embargo, parece que presentan alteraciones en los niveles de estas dos hormonas, aunque todavía no se ha podido establecer una relación con los niveles elevados de cortisol presentes en su

organismo (Durovcová *et al.*, 2010), los cuales además presentan una correlación positiva con los niveles séricos de ABs (Lu *et al.*, 2012; Van Zaane *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta todos los resultados discutidos aquí parece evidente, el importante papel, tanto directo, mediante la interacción con la vía de señalización de FXR, como indirecto, por su propia vía de señalización, del receptor GR y los glucocorticoides en la regulación de la expresión de FGF19. Esta interacción puede ser clave en el bloqueo de la comunicación enterohepática que protege, gracias a la represión de CYP7A1 y la consecuente reducción de la síntesis *de novo* ABs, de las acciones tóxicas causadas por la acumulación de estos esteroides en el organismo. Esta disfunción en los sistemas de control de la homeostasis de los ABs podría ser responsable del desarrollo de los efectos adversos a nivel hepático que frecuentemente se asocian a la hipersecreción endógena de glucocorticoides o al tratamiento crónico con ellos.

Por tanto, los resultados de este trabajo aportan luz sobre la relación entre el intestino y el hígado en el control de la homeostasis de ABs, pero deja abiertas nuevas preguntas, que deberán ser abordadas en estudios posteriores, relativas a la identificación de los mecanismos por los cuales la expresión y la actividad de los genes involucrados pueden verse afectados por los glucocorticoides. Un mejor conocimiento de los elementos que intervienen y sus interrelaciones sería de gran utilidad no solo por lo que supondría en el avance del conocimiento de la bioquímica, la fisiología y la patología hepática, sino también porque permitiría sentar las bases para desarrollar nuevas estrategias farmacológicas encaminadas a mantener la eficacia terapéutica de los glucocorticoides pero reduciendo el riesgo de aparición de efectos hepáticos adversos.

5- CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Conclusión primera: La dexametasona administrada intraperitonealmente a ratas o ratones a dosis iguales o superiores a 1 mg/kg p.c/día durante 7 días ocasiona hepatotoxicidad como lo indica la elevación en suero de la actividad de las transaminasas ALT y AST, la hipercolanemia y la hepatomegalia.

Conclusión segunda: A dosis no hepatotóxicas, el tratamiento de ratas y ratones con dexametasona, prednisolona o budesonida causa una reducción en la expresión ileal del péptido FGF19/Fgf15, sin que esto se deba a un descenso en la expresión de FXR/Fxr

Conclusión tercera: Se ha identificado al receptor nuclear GR/Gr como un nuevo regulador de la expresión de FGF19/Fgf15. Además, el mecanismo a través del cual los glucocorticoides inhiben la expresión intestinal de FGF19/Fgf15 presenta componentes todavía no identificados que son independientes tanto de FXR/Fxr como de GR/Gr, PXR/Pxr y sus genes diana.

Conclusión cuarta: El tratamiento con glucocorticoides estimula expresión de Asbt ileal en ratones por un mecanismo dependiente de Fxr y Gr y que requiere la intervención de Fgf15.

Conclusión quinta: Pese al marcado descenso de los niveles de expresión intestinal de Fgf15 que ocasiona el tratamiento con dexametasona la expresión hepática de Cyp7a1 no solo no aumenta, como era de esperar, sino que disminuye por un mecanismo independiente de Fxr, aún a dosis del glucocorticoide que no causan toxicidad hepática.

Conclusión sexta: La expresión hepática de Fgf21, que ejerce funciones antagonistas a las de Fgf15, aumenta en respuesta al tratamiento con dexametasona de manera dosis-dependiente e inversa a los cambios que ocasiona dicho glucocorticoide en la expresión intestinal de Fgf15.

La conclusión global: A dosis no hepatotóxicas, los glucocorticoides reducen la expresión hepática de Cyp7a1, y por tanto la síntesis *de novo* de ácidos biliares a partir del colesterol. Este efecto directo sobre el hígado puede superar el potente control de la expresión de Cyp7a1 que ejerce el Fgf15 de origen intestinal, el cual está regulado a su vez de manera independiente y en sentido opuesto por Fxr y Gr.

Por tanto, los glucocorticoides interfieren con la regulación de la síntesis hepática de ácidos biliares, de forma directa sobre el hepatocito y de forma indirecta a través de la interconexión intestino-hígado mediada por FGF19/15 alterando el control que ejerce FXR sobre la homeostasis de los ácidos biliares, lo que puede contribuir a la aparición de alteraciones en la función hepatobiliar en pacientes con tratamientos prolongados con glucocorticoides o con síndrome de Cushing

6- BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

Akita H., Suzuki H., Ito K., Kinoshita S., Sato N., Takikawa H., Sugiyama Y., (2001) Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta*. 1511(1): 7-16.

Ananthanarayanan M., Li Y., Surapureddi S., Balasubramanian N., Ahn J., Goldstein JA., Suchy FJ., (2011) Histone H3K4 trimethylation by MLL3 as part of ASCOM complex is critical for NR activation of bile acid transporter genes and is downregulated in cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 300(5): G771-81.

Ananthanarayanan M., Balasubramanian N., Makishima M., Mangelsdorf DJ., Suchy FJ., (2001) Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem*. 276(31): 28857-28865.

Angelin B., (2005) Telling the liver (not) to make bile acids: a new voice from the gut?. *Cell Metab*. 2(4): 209-10.

Aranda A., Pascual A., (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*. 81(3):1269-1304.

Arrese M., Karpen SJ., (2002) HNF-1 alpha: have bile acid transport genes found their "master"?. *J Hepatol*. 36(1):142-5.

Barbier O., Torra IP., Sirvent, A., Claudel T., Blanquart C., Duran-Sandoval D., Kuipers F., Kosykh V., Fruchart JC., Staels B., (2003) FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology*. 124, 1926-1940.

Beck IM., Vanden Berghe W., Vermeulen L., Yamamoto KR., Haegeman G., De Bosscher K., (2009) Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr Rev*. 30(7): 830-882.

Bishop-Bailey D., Walsh DT., Warner TD., (2004) Expression and activation of the farnesoid X receptor in the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(10): 3668-3673.

Blumberg B., Evans RM., (1998) Orphan nuclear receptors-new ligands and new possibilities. *Genes Dev*. 12(20): 3149-3155.

Bodin K., Lindbom U., Diczfalusy U., (2005) Novel pathways of bile acid metabolism involving CYP3A4. *Biochim Biophys Acta*. 1687, 84-93.

Chawla A., Repa JJ., Evans RM., Mangelsdorf DJ., (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*. 294(5548):1866-1870.

Chiang JY., (2002) Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev*. 23(4): 443-463.

Chrousos GP., Kino T., (2005) Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci STKE*. 2005(304): pe48.

Combettes L., Berthon B., Claret M., (1992) Taurolithocholate-induced Ca²⁺ release is inhibited by phorbol esters in isolated hepatocytes. *Biochem J*. 287 (Pt 3): 891-896.

Costarelli V., Sanders TA., (2002) Plasma deoxycholic acid concentration is elevated in postmenopausal women with newly diagnosed breast cancer. *Eur J Clin Nutr*. 56(9): 925-927.

Costanza LS., (2011) Fisiología (4a ed) Barcelona: Elsevier España.

Craddock AL., Love MW., Daniel RW., Kirby LC., Walters HC., Wong MH., Dawson PA., (1998) Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol*. 274(1 Pt 1): G157-169.

Cristina PS., (2015) Papel de los glucocorticoides en la vía de señalización mediada por FGF19, trabajo de Fin de Grado. Facultad de Farmacia.

Cui YJ., Aleksunes LM., Tanaka Y., Goedken MJ., Klaassen CD., (2009) Compensatory induction of liver efflux transporters in response to ANIT-induced liver injury is impaired in FXR-null mice. *Toxicol Sci*. 110(1): 47-60.

Davies TH., Ning YM., Sanchez ER., (2002) A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J Biol Chem*. 277(7): 4597-4600.

Dawson PA., Hubbert M., Haywood J., Craddock AL., Zerangue N., Christian WV., Ballatori N., (2005) The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem*. 280(8): 6960-6968.

Dekaney CM., von Allmen DC., Garrison AP., Rigby RJ., Lund PK., Henning SJ., Helmrath MA., (2008) Bacterial-dependent up-regulation of intestinal bile acid binding protein and transport is FXR-mediated following ileo-cecal resection. *Surgery*. 144 (2): 174-81.

Del Monaco M., Covello SP., Kennedy SH., Gilinger G., Litwack G., Uitto J., (1997) Identification of novel glucocorticoid-response elements in human elastin promoter and demonstration of nucleotide sequence specificity of the receptor binding. *J Invest Dermatol*. 108(6): 938-42.

Durovcová V., Marek J., Hána V., Matoulek M., Zikán V., Haluzíková D., Kaválková P., Lacinová Z., Krsek M., Haluzík M., (2010) Plasma concentrations of fibroblast growth factors 21 and 19 in patients with Cushing's syndrome. *Physiol Res.* 59(3): 415-22.

El-Mir MY., Badia MD., Luengo N., Monte MJ., Marin JJ., (2001) Increased levels of typically fetal bile acid species in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Sci (Lond)*. 100(5): 499- 508.

Eloranta JJ., Meier PJ., Kullak-Ublick GA., (2005) Coordinate transcriptional regulation of transport and metabolism. *Methods Enzymol.* 400: 511-530.

Eloranta JJ., Jung D., Kullak-Ublick GA., (2006) The human Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide gene is activated by glucocorticoid receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha, and suppressed by bile acids via a small heterodimer partner-dependent mechanism. *Mol Endocrinol.* 20 (1): 65-79.

Erlinger S., (1982) Does Na⁺-K⁺-atpase have any role in bile secretion? *Am J Physiol.* 243(4): G243-247.

Evans WH., (1980) A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochim Biophys Acta.* 604(1): 27-64.

Fawcett., Don W., (1997) Tratado de histología. (12a ed). Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España S.A.U.

Fu T., Kim YC., Byun S., Kim DH., Seok S., Suino-Powell K., Xu HE., Kemper B., Kemper JK., (2016) FXR Primes the Liver for Intestinal FGF15 Signaling by Transient Induction of β -Klotho. *Mol Endocrinol.* 30(1): 92-103.

Gartner., Leslie P., Miatt., James L., (1998) Atlas color de histología. (2a ed) Madrid: Médica panamericana S.A.

Gerloff T., Stieger B., Hagenbuch B., Madon J., Landmann L., Roth J., Hofmann AF., Meier PJ., (1998) The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem.* 273(16):10046-10050.

Gosling JA., Harris PF., Humpherson JR., (1994) Anatomía humana. Textos y atlas en color. Tomos I y II. (2a ed) . Madrid: Mosby- Doyma.

Gong S., (2015) Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PLoS One.* 10(2): p.e 0117503.

Goodwin B., Jones SA., Price RR., Watson MA., McKee DD., Moore LB., Galardi C., Wilson JG., Lewis MC., Roth ME., Maloney PR., Willson TM., Kliewer SA., (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell*. 6(3): 517-526.

Grad I., Picard D., (2007) The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol*. 275(1-2): 2-12.

Grober J1., Zaghini I., Fujii H., Jones SA., Kliewer SA., Willson TM., Ono T., Besnard P., (1999) Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J Biol Chem*. 15; 274(42): 29749-54.

Grossman S., Porth CM., (2014) Fisiopatología alteraciones de la salud (9a ed.) España: Wolters Kluwer Helth.

Gumucio JJ., (1983) Functional and anatomic heterogeneity in the liver acinus: impact on transport. *Am J Physiol*. 244(6): G578-582.

Hagenbuch B., Meier PJ., (1994) Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest*. 93(3):1326- 1331.

Heidker RM., Caiozzi GC., Ricketts ML., (2015) Dietary procyanidins selectively modulate intestinal farnesoid X receptor-regulated gene expression to alter enterohepatic bile acid recirculation: elucidation of a novel mechanism to reduce triglyceridemia. *Mol Nutr Food Res*. 60(4): 727-36.

Hofmann AF., (1994) Intestinal absorption of bile acids and biliary constituents, The intestinal component of the enterohepatic circulation and the integrated system, New York: Johnson LR, Raven Press.

Houten SM., Watanabe M., Auwerx J., (2006) Endocrine functions of bile acids. *EMBO J*. 25(7):1419-1425.

Huang W., Ma K., Zhang J., Qatanani M., Cuvillier J., Liu J., Dong B., Huang X., Moore DD., (2006) Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science*. 312(5771): 233-236.

Huber RM., Murphy K., Miao B., Link JR., Cunningham MR., Rupar MJ., Gunyuzlu PL., Haws TF., Kassam A., Powell F., Hollis GF., Young PR., Mukherjee R., Burn TC., (2002) Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene*. 290(1-2): 35-43.

Hwang ST., Henning SJ., (2001) Ontogenic regulation of components of ileal bile acid absorption. *Exp Biol Med (Maywood)*. 226(7): 674-80.

Hwang ST., Henning SJ., (2000) Hormonal regulation of expression of ileal bile acid binding protein in suckling rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 278(6): R1555-63.

Hylemon PB., (1992) Hormonal regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase mRNA levels and transcriptional activity in primary rat hepatocyte cultures. *J Biol Chem.* 267(24): 16866-71.

Ikemoto S., Takahashi M., Tsunoda N., Maruyama K., Itakura H., Kawanaka K., Tabata I., Higuchi M., Tange T., Yamamoto TT., Ezaki O., (1997) Cholate inhibits high-fat diet-induced hyperglycemia and obesity with acyl-CoA synthetase mRNA decrease. *Am J Physiol.* 273(1 Pt 1): E37-45.

Inagaki T., (2005) Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* 2(4): 217-25.

Inagaki T., Choi M., Moschetta A., Peng L., Cummins CL., McDonald JG., Luo G., Jones SA., Goodwin B., Richardson JA., Gerard RD., Repa JJ., Mangelsdorf DJ., Kliewer SA., (2005) Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* 2(4): 217-225.

Jung D., Fantin AC., Scheurer U., Fried M., Kullak-Ublick GA., (2004) Human ileal bile acid transporter gene ASBT (SLC10A2) is transactivated by the glucocorticoid receptor. *Gut,* 53(1): 78-84.

Karpen SJ., (2002) Nuclear receptor regulation of hepatic function. *J Hepatol.* 36(6):832-850.

Kast HR., Goodwin B., Tarr PT., Jones SA., Anisfeld AM., Stoltz CM., Tontonoz P., Kliewer S., Willson TM., Edwards PA., (2002) 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.* 277(4): 2908-2915.

Kazgan N., (2014) Intestine-specific deletion of SIRT1 in mice impairs DCoH2-HNF-1alpha-FXR signaling and alters systemic bile acid homeostasis. *Gastroenterology.* 146(4): 1006-16.

Kim I., (2007) Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J Lipid Res.* 48(12): 2664-72.

Kim DH., Lee J., Lee B., Lee JW., (2009) ASCOM controls farnesoid X receptor transactivation through its associated histone H3 lysine 4 methyltransferase activity. *Mol Endocrinol.* 23(10):1556-62.

- Kino T., Manoli I., Kelkar S., Wang Y., Su YA., Chrousos GP., (2009) Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 381(4): 671-675.
- Klaassen CD., (1974) Bile flow and composition during bile acid depletion and administration. *Can J Physiol Pharmacol* 52(2): 334-348.
- Kliwer SA., Lehmann JM., Willson TM., (1999) Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science.* 284(5415): 757-760.
- Kliwer SA., Mangelsdorf DJ., (2015) Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway. *Dig Dis.* 33(3): 327-31.
- Kosters A., Karpen SJ., (2008) Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotica.* 38(7-8): 1043-71.
- Kosters A., Karpen SJ., (2010) The role of inflammation in cholestasis: clinical and basic aspects. *Semin Liver Dis.* 30(2): 186-94.
- Kong B., Wang L., Chiang JY., Zhang Y., Klaassen CD., Guo GL., (2012) Mechanism of tissue-specific farnesoid X receptor in suppressing the expression of genes in bile-acid synthesis in mice. *Hepatology.* 56(3):1034-43.
- Kullak-Ublick GA., Keppler D., Paumgartner G., Dombrowski F., (2001) 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.* 33(5): 1206-1216.
- Landrier JF1., Eloranta JJ., Vavricka SR., Kullak-Ublick GA., (2006) The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 290(3): G476-85.
- Leedham SJ., Brittan M., McDonald SA., Wright NA., (2005) Intestinal stem cells. *J Cell Mol Med.*9(1):11-24.
- Lefebvre P., Chinetti G., Fruchart JC., Staels B., (2006) Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest.* 116(3): 571-580.
- Lester R., (1983) Introduction. Bile acid metabolism in the newborn. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2(2): 335-336.
- Li J., Pircher PC., Schulman IG., Westin SK., (2005) Regulation of complement C3 expression by the bile acid receptor FXR. *J Biol Chem.* 280(9): 7427-34.

Lowe JS., Stevens A., (1999) *Histología humana*. (2a ed) Madrid: Harcourt Brace.

Lu TT., Makishima M., Repa JJ., Schoonjans K., Kerr TA., Auwerx J., Mangelsdorf DJ., (2000) Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell*. 6(3): 507-515.

Lu Y., Zhang Z., Xiong X., Wang X., Li J., Shi G., Yang J., Zhang X., Zhang H., Hong J., Xia X., Ning G., Li X., (2012) Glucocorticoids promote hepatic cholestasis in mice by inhibiting the transcriptional activity of the farnesoid X receptor. *Gastroenterology*. 143(6): 1630-1640.

Mabuchi M., Kawamura I., Fushimi M., Takeshita S., Takakura S., Hirosumi J., Mutoh S., (2003) Choleretic actions of insulin-like growth factor-I, prednisolone, and ursodeoxycholic acid in rats. *Dig Dis Sci*. 48(7): 1398-405.

Makishima M., Okamoto AY., Repa JJ., Tu H., Learned RM., Luk A., Hull MV., Lustig KD., Mangelsdorf DJ., Shan B., (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*. 284(5418): 1362-1365.

Malatesta M., Zancanaro C., Martin TE., Chan EK., Amalric F., Luhrmann R., Vogel P., Fakan S., (1994) Cytochemical and immunocytochemical characterization of nuclear bodies during hibernation. *Eur J Cell Biol*. 65(1): 82-93.

Mangelsdorf DJ., Evans RM., (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*. 83(6): 841-850.

Marin JJ., Barbero ER., Herrera MC., Tabernero A., Monte MJ., (1993) Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver. *Hepatology*. 18(5): 1182-1192.

Meier PJ., (1988) Transport polarity of hepatocytes. *Semin Liver Dis*. 8(4): 293-307. *Hepatology* 14(3): 551-566.

Mitropoulos K A ., Balasubramaniam S., (1976) The role of glucocorticoids in the regulation of the diurnal rhythm of hepatic beta-hydroxy-beta-methylglutaryl-coenzyme A reductase and cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *Biochem J*. 15; 160(1): 49-55.

Miyata M., Hata T., Yamakawa H., Kagawa T., Yoshinari K., Yamazoe Y., (2012) Involvement of multiple elements in FXR-mediated transcriptional activation of FGF19. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 132(1-2): 41-7.

Miyata M., Hata T., Yamazoe Y., Yoshinari K., (2014) SREBP-2 negatively regulates FXR-dependent transcription of FGF19 in human intestinal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 443(2): 477-82.

Monte JM., Barbero ER., Villanueva GR., Serrano MA., Marin JJ., (1996) Role of rate-limiting enzymes of nucleotide metabolism in taurocholate-induced DNA synthesis inhibition. *J Hepatol.* 25(2): 191-199.

Monte MJ1, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. (2009) Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol.* 21;15(7): 804-16.

Nathanson MH., Boyer JL., (1991) Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology.*14(3):551-66.

Nixon M., Andrew R., Chapman KE., (2013) It takes two to tango: dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions. *Steroids.* 78(1): 59-68.

Novac N1., Heinzl T., (2004) Nuclear receptors: overview and classification. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 3(4):335-46.

Nowicki MJ., Shneider BL., Paul JM., Heubi JE., (1997) Glucocorticoids upregulate taurocholate transport by ileal brush-border membrane. *Am J Physiol.* 273(1 Pt 1): G197-203.

Oakley RH., Jewell CM., Yudt MR., Bofetiado DM., Cidlowski JA., (1999) The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem.* 274(39): 27857-27866.

Okuwaki M., Okuwaki M1., Takada T., Iwayanagi Y., Koh S., Kariya Y., Fujii H., Suzuki H., (2007) LXR alpha transactivates mouse organic solute transporter alpha and beta via IR-1 elements shared with FXR. *Pharm Res.* 24(2): 390-8.

Otte K., Kranz H., Kober I., Thompson P., Hoefler M., Haubold B., Rimmel B., Voss H., Kaiser C., Albers M., Cheruvallath Z., Jackson D., Casari G., Koegl M., Paabo S., Mous J., Kremoser C., Deuschle U., (2003) Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol Cell Biol.* 23(3): 864-872.

Out C., Dijkers A., Laskewitz A., Boverhof R., van der Ley C., Kema IP., Wolters H., Havinga R., Verkade HJ., Kuipers F., Tietge UJ., Groen AK., (2014) Prednisolone increases enterohepatic cycling of bile acids by induction of Asbt and promotes reverse cholesterol transport. *J Hepatol.* 61(2): 351-7.

Parks DJ., Blanchard SG., Bledsoe RK., Chandra G., Consler TG., Kliewer SA., Stimmel JB., Willson TM., Zavacki AM., Moore DD., Lehmann JM., (1999) Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science.* 284(5418): 1365-1368.

Patel R., Patel M., Tsai R., Lin V., Bookout AL., Zhang Y., Magomedova L., Li T., Chan JF., Budd C., Mangelsdorf DJ., Cummins CL., (2011) LXRbeta is required for glucocorticoid-induced hyperglycemia and hepatosteatosis in mice. *J Clin Invest*, 121(1): 431-41.

Pratt WB., Galigniana MD., Morishima Y., Murphy PJ., Galigniana MD., Morishima Y., Murphy PJ., (2004) Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem*. 40: 41-58.

Raju U., Levitz M., Javitt NB., (1990) Bile acids in human breast cyst fluid: the identification of lithocholic acid. *J Clin Endocrinol Metab*. 70(4):1030-1034.

Rappaport AM., (1973) The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Res*. 6(2):212-228.

Ray A., Prefontaine KE., (1994) Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18;91(2): 752-6.

Rembacz KP., Woudenberg J., Hoekstra M., Jonkers EZ., van den Heuvel FA., Buist-Homan M., Woudenberg-Vrenken TE., Rohacova J., Marin ML., Miranda MA., Moshage H., Stellaard F., Faber KN., (2010) Unconjugated bile salts shuttle through hepatocyte peroxisomes for taurine conjugation. *Hepatology*. 52(6): 2167-76.

Reue K., Lee JM., Vergnes L., (2013) Diet1 is a regulator of fibroblast growth factor 15/19-dependent bile acid synthesis. *Dig Dis*. 33(3): 307-13.

Ridlon JM., Kang DJ., Hylemon PB., (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*. 47(2): 241-259.

Ronald M., Evans RM., David J Mangelsdorf., (2014) Nuclear Receptors, RXR & the Big Bang. 157(1): 255–266.

Rosales R., Romero MR., Vaquero J., Monte MJ., Requena P., Martinez-Augustin O., Sanchez de Medina F., Marin JJ., (2013) FXR-dependent and -independent interaction of glucocorticoids with the regulatory pathways involved in the control of bile acid handling by the liver. *Biochem Pharmacol*. 85(6): 829-38.

Rose AJ., Berriel Díaz M., Reimann A., Klement J., Walcher T., Kronen-Herzig A., Strobel O., Werner J., Peters A., Kleyman A., Tuckermann JP., Vegiopoulos A., Herzig S., (2011) Molecular control of systemic bile acid homeostasis by the liver glucocorticoid receptor. *Cell Metab*. 6;14(1): 123-30.

Rose AJ., Herzig S., (2013) Metabolic control through glucocorticoid hormones: an update. *Mol Cell Endocrinol*. 5: 380(1-2): 65-78.

- Russell DW., (2003) The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annual review of biochemistry*. 72, 137-174.
- Savary I., Debras E., Dardevet D., Rambourdin F., Vasson MP., Obled C., Grizard J., (2001) Evidence for an alteration of plasma and liver proteins response to dexamethasone in aging rats. *Mech Ageing Dev*. 122(1): 105-20..
- Schacke H., Docke WD., Asadullah K., (2002) Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther*. 96(1): 23-43.
- Schmidt DR., Holmstrom SR., Fon Tacer K., Bookout AL., Kliewer SA., Mangelsdorf DJ., (2010) Regulation of bile acid synthesis by fat-soluble vitamins A and D. *J Biol Chem*. 285(19): 14486-94.
- Schote AB., Turner JD., Schiltz J., Muller CP., (2007) Nuclear receptors in human immune cells: expression and correlations. *Mol Immunol*. 44(6): 1436-1445.
- Semple RK., Chatterjee VK., O'Rahilly S., (2006) PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest*. 116(3): 581-589.
- Sinha J., Chen F., Miloh T., Burns RC., Yu Z., Shneider BL., (2008) beta-Klotho and FGF-15/19 inhibit the apical sodium-dependent bile acid transporter in enterocytes and cholangiocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 295(5): G996-G1003.
- Smirlis D., Muangmoonchai R., Edwards M., Phillips IR., Shephard EA., (2001) Orphan receptor promiscuity in the induction of cytochromes p450 by xenobiotics. *J Biol Chem*. 276(16): 12822-12826.
- Song KH., Li T., Owsley E., Strom S., Chiang JY., (2009) Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene expression. *Hepatology*. 49(1): 297-305.
- Sonoda J., Pei L., Evans RM., (2008) Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett*. 582(1): 2-9.
- Stroeve JH., Brufau G., Stellaard F., Gonzalez FJ., Staels B., Kuipers F., (2010) Intestinal FXR-mediated FGF15 production contributes to diurnal control of hepatic bile acid synthesis in mice. *Lab Invest*. 90(10): 1457-67.
- Tang W., Norlin M., Wikvall K., (2008) Glucocorticoid receptor-mediated upregulation of human CYP27A1, a potential anti-atherogenic enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 1781(11-12): 718-23.
- Thibodeau GA., Patton KT., (1995) Anatomía y fisiología. (2a ed). Madrid: Mosby-Doyma.

- Trauner M., Boyer JL., (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.* 83(2): 633-671.
- Uriarte I., Latasa MU., Carotti S., Fernandez-Barrena MG., Garcia-Irigoyen O., Elizalde M., Urtasun R., Vespasiani-Gentilucci U., Morini S., de Mingo A., Mari M., Corrales FJ., Prieto J., Berasain C., Avila MA., (2015) Ileal FGF15 contributes to fibrosis-associated hepatocellular carcinoma development. *Int J Cancer.* 136(10): 2469-75.
- Van Raalte DH., Ouwens DM., Diamant M., (2009) Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options? *Eur J Clin Invest.* 39(2): 81-93.15.
- Vlahcevic Z R., (1996) Regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase by different effectors. *Ital J Gastroenterol.* 28(6): 337-9.
- Vispute SG., Bu P., Le Y., Cheng X., (2017) Activation of GR but not PXR by dexamethasone attenuated acetaminophen hepatotoxicities via Fgf21 induction. *Toxicology.* 1;378: 95-106.
- Vergnes L., Lee JM., Chin RG., Auwerx J., Reue K., (2013) Diet1 functions in the FGF15/19 enterohepatic signaling axis to modulate bile acid and lipid levels. *Cell Metab.* 17(6): 916-28.
- Wahlström A., Kovatcheva-Datchary P., Ståhlman M., Khan MT., Bäckhed F., Marschall HU., (2016) Induction of farnesoid X receptor signaling in germ-free mice colonized with a human microbiota. *J Lipid Res.* 58(2): 412-419.
- Walters JR., Johnston IM., Nolan JD., Vassie C., Pruzanski ME., Shapiro DA., (2015) The response of patients with bile acid diarrhoea to the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid. *Aliment Pharmacol Ther.* 41(1): 54-64.
- Watanabe N., Tsukada N., Smith CR., Phillips MJ., (1991) Motility of bile canaliculi in the living animal: implications for bile flow. *J Cell Biol.* 113(5): 1069-1080.
- Wistuba, W., Gnewuch C., Liebisch G., Schmitz G., Langmann T., (2007) Lithocholic acid induction of the FGF19 promoter in intestinal cells is mediated by PXR. *World J Gastroenterol.* 13(31): 4230-5.
- Zhang M1., Chiang JY., (2001) Transcriptional regulation of the human sterol 12alpha-hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4alpha in mediating bile acid repression. *J Biol Chem.* 9;276(45): 41690-9.
- Zhou X., Cao L., Jiang C., Xie Y., Cheng X., Krausz KW., Qi Y., Sun L., Shah YM., Gonzalez FJ., Wang G., Hao H., (2014) PPARalpha-UGT axis activation represses intestinal FXR-FGF15 feedback signalling and exacerbates experimental colitis. *Nat Commun.* 5: 4573.