

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y
FARMACOLOGÍA**

**IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO DEFECTO GENÉTICO DEL
METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS BILIARES: DEFICIENCIA
DE LA ENZIMA ACOX2. BASES MOLECULARES,
FISIOPATOLOGÍA E IMPLICACIÓN EN EL DAÑO
HEPATOCELULAR IDIOPÁTICO**

**IDENTIFICATION OF A NEW GENETIC DEFECT IN BILE
ACIDS SYNTHESIS: ACOX2 PARTIAL DEFICIENCY.
MOLECULAR BASES, PATHOPHYSIOLOGY AND
IMPLICATION IN IDIOPATHIC HEPATOCELLULAR DISEASE**

Tesis Doctoral

Marta Alonso Peña

2019



En portada: Células de hepatoblastoma HepG2 transducidas con vectores adenovirales conteniendo la proteína fluorescente roja TdTomato y vectores lentivirales codificantes de la proteína fluorescente verde EGFP. Fotografía combinada, por solapamiento de las imágenes correspondientes a cada canal obtenidas por microscopía de fluorescencia.

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

**IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO DEFECTO GENÉTICO DEL
METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS BILIARES: DEFICIENCIA DE LA
ENZIMA ACOX2. BASES MOLECULARES, FISIOPATOLOGÍA E
IMPLICACIÓN EN EL DAÑO HEPATOCELULAR IDIOPÁTICO**

TESIS DOCTORAL

MARTA ALONSO PEÑA

2019

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO DEFECTO GENÉTICO DEL
METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS BILIARES: DEFICIENCIA DE LA
ENZIMA ACOX2. BASES MOLECULARES, FISIOPATOLOGÍA E
IMPLICACIÓN EN EL DAÑO HEPATOCELULAR IDIOPÁTICO**

Memoria que presenta **Dña. Marta Alonso Peña** para optar al Título de Doctor por la
Universidad de Salamanca

Salamanca, 16 de septiembre de 2019

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

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada "Identificación de un nuevo defecto genético del metabolismo de los ácidos biliares: deficiencia de la enzima ACOX2. Bases moleculares, fisiopatología e implicación en el daño hepatocelular idiopático" presentada por D^a. Marta Alonso Peña para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, el Dr. D. Oscar Briz Sánchez, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Fisiología y Farmacología, y la Dra. Dña. Elisa Héræez Aguilar, Profesora Ayudante Doctora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día diez de septiembre de dos mil diecinueve.

Fdo. José Juan García Marín

D^a. M^a ÁNGELES SERRANO GARCÍA, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOPATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada " Identificación de un nuevo defecto genético del metabolismo de los ácidos biliares: deficiencia de la enzima ACOX2. Bases moleculares, fisiopatología e implicación en el daño hepatocelular idiopático" presentada por D^a. Marta Alonso Peña para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. José Juan García Marín, Catedrático del Departamento de Fisiología y Farmacología, el Dr. D. Oscar Briz Sánchez, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Fisiología y Farmacología, y la Dra. Dña. Elisa Hérreaez Aguilar, Profesora Ayudante Doctora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día dos de septiembre de dos mil diecinueve.

Fdo. M^a Ángeles Serrano García

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, D. OSCAR BRIZ SÁNCHEZ, PROFESOR AYUDANTE DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, y DÑA. ELISA HÉRRAEZ AGUILAR, PROFESORA AYUDANTE DOCTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada " Identificación de un nuevo defecto genético del metabolismo de los ácidos biliares: deficiencia de la enzima ACOX2. Bases moleculares, fisiopatología e implicación en el daño hepatocelular idiopático" presentada por D^a. Marta Alonso Peña para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a diez de septiembre de dos mil diecinueve.

Fdo. José Juan García Marín

Fdo. Oscar Briz Sánchez

Fdo. Elisa Hérreaez Aguilar

La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de un Contrato de Investigación para la formación de personal universitario (FPU), del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (*BOE-A 2015-9456*).

El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido financiado en parte con cargo al CIBERehd (Instituto de Salud Carlos III) (EHD15PI05/2016), y a los siguientes Proyectos de Investigación:

Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Proyecto PI16/00598. “Quimiorresistencia del adenocarcinoma gástrico: Caracterización de su huella genética y superación mediante edición genómica programada basada en CRISPR/Cas9”. Investigador Principal: José Juan García Marín. Periodo: 2017-2019.

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

Ministerio de Economía y Empresa. Proyecto SAF2016-75197-R. “Desarrollo de un modelo predictivo de la falta de respuesta a la quimioterapia en pacientes con hepatoblastoma”. Investigador Principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2017-2019.

Asociación española Contra el Cáncer. Proyectos cáncer infantil y cáncer poco frecuentes. “Estudio multidisciplinar del colangiocarcinoma: diagnóstico, patogenia y nuevas terapias”. Investigador Responsable: Jesús María Bañales Asurmendi. Periodo: 2018-2020.

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

Maria J. Monte, **Marta Alonso-Peña**, Oscar Briz, Elisa Herraiz, Carmen Berasain, Josepmaria Argemi, Jesus Prieto, Jose J. G. Marin. ACOX2 deficiency: An inborn error

of bile acid synthesis identified in an adolescent with persistent hypertransaminasemia. *Journal of Hepatology* 66 (3) 581-588.

Marta Alonso-Peña, María J. Monte, Oscar Briz, Elisa Herráez, Carmen Berasain, Josep M. Argemi, Jesus Prieto, Jose J.G. Marín. Deficiencia hereditaria de ACOX2: un nuevo defecto genético en la síntesis de ácidos biliares. *Genética Médica* 4 20-22.

Elisa Lozano, Rocío I. R. Macias, María J. Monte, Maitane Asensio, Sofia Del Carmen, Laura Sanchez-Vicente, **Marta Alonso-Peña**, Ruba Al-Abdulla, Patricia Muñoz-Garrido, Letizia Satriano, Colm O'Rourke, Jesus M. Banales, Matias A. Avila, Maria L. Martinez-Chantar, Jesper Andersen, Oscar Briz, Jose J. G. Marin. Causes of hOCT1-dependent cholangiocarcinoma resistance to sorafenib and sensitization by tumor-selective gene therapy. *Hepatology*. En Prensa.

Marta Alonso-Peña, Anabel Sanchez-Martin, Paula Sanchon-Sanchez, Meraris Soto-Muñiz, Ricardo A. Espinosa-Escudero, Jose J.G. Marin. Somatic pharmacogenetics of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Cancer Drug Resistance*. En Prensa.

Marta Alonso-Peña, Ricardo A. Espinosa-Escudero, Meraris Soto-Muñiz, Paula Sanchon-Sanchez, Anabel Sanchez-Martin, Jose J.G. Marin. Role of transportome in pharmacogenomics of hepatocellular carcinoma and hepatobiliary cancer. *Pharmacogenomics* 20 (13) 957-970.

- En forma de *abstract* en las siguientes revistas:

Marta Alonso, María J. Monte, Oscar Briz, Elisa Herráez, Ruba Al-Abdulla, Josep Argemi, Jesús Prieto, José J. G. Marín (2016). Identificación de un defecto genético en la etapa peroxisomal de síntesis de ácidos biliares que ocasiona daño hepatocelular por acumulación de precursores tóxicos. *Gastroenterología y Hepatología*, **39**, 69.

María J. Monte, **Marta Alonso**, Oscar Briz, Elisa Herráez, Rocío I. R. Macías, María J. Pérez, Elisa Lozano, Ruba Al-Abdulla, Maitane Asensio, Francisco González-San Martín, Silvia Jiménez, Beatriz Castaño, Josep Argemi, Jesús Prieto, José J. G. Marín (2016). Identification of a new inborn error in the peroxisomal steps of bile acid

synthesis resulting in accumulation of toxic bile acid intermediates and hepatocellular damage. *Journal of Hepatology*, **64** (Suppl.), s301.

Silvia di Giacomo, Laura Sánchez-Vicente, A. di Sotto, María J. Monte, Marta R. Romero, Maitane Asensio, **Marta Alonso-Peña**, Faten Al-Aqib, G. Mazzanti, José J. G. Marín, Oscar Briz (2017). Nuevos agentes quimiosensibilizantes del carcinoma hepatocelular al sorafenib por bloqueo de las bombas ABC exportadoras de fármacos. *Gastroenterología y Hepatología*, **40**, 40.

Andreas Geier, Ruba Al-Abdulla, Rocío I. R. Macías, D. Bettinger, J. Weiss, H. Bantel, Daniel Jahn, Maitane Asensio, **Marta Alonso-Peña**, Faten Al-Aqil, José J. G. Marín (2017). The absence of OCT1 at the plasma membrane of tumor cells is associated with a worse response of hepatocellular carcinoma to sorafenib. *Journal of Hepatology*, **66** (Suppl.), s230.

Elisa Lozano, Maitane Asensio, Oscar Briz, Laura Pérez-Silva, Elisa Herráez, Marta R. Romero, María J. Pérez, Ruba Al-Abdulla, **Marta Alonso-Peña**, Ana Peleteiro-Vigil, Felipe Jiménez, María J. Monte, Luis Bujanda, Jesús .M. Bañales, José J.G. Marín (2018). Sensibilización del colangiocarcinoma a la quimioterapia por represión de las bombas exportadoras de fármacos ABCC3 y ABCG2 inducida por la sobreexpresión de SOX17. *Gastroenterología y Hepatología*, **41**, 44-45.

Marta Alonso-Peña, Heike M. Hermanns, Elisa Herráez, Oscar Briz, María J. Monte, Manuel Sánchez-Martín, Pablo Berrocal, Ignacio García-Tuñón, Ricardo A. Espinosa-Escudero, Jesús Prieto, Andreas Geier, José J.G. Marín (2019). Mecanismos implicados en la disminución de la expresión/función de la enzima Acil-CoA oxidasa 2 (ACOX2) que conduce a estrés oxidativo y estrés de retículo endoplásmico en los hepatocitos. *Gastroenterología y Hepatología*, **42**, 34.

Marta Alonso-Peña, Andreas Geier, Heike M. Hermanns (2019). Suppression of bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase gene expression by the interleukin-6-type cytokine Oncostatin M. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, **57**, e8.

Marta Alonso-Peña, Heike M. Hermanns, Elisa Herráez, Oscar Briz, María J. Monte, Manuel Sánchez-Martín, Pablo Berrocal, Ignacio García-Tuñón, Ricardo A. Espinosa-Escudero, Jesús Prieto, Andreas Geier, José J.G. Marín (2019). Genetic and pathophysiological factors leading to deficient acyl-CoA oxidase 2 (ACOX2) activity in hepatocytes, an alteration which causes oxidative and endoplasmic reticulum stress in liver cells. *Journal of Hepatology*, **70** (Suppl.), e579.

- Han sido presentados en los siguientes congresos:

IX Jornadas Científicas del CIBERehd. Barcelona, 2-3 Noviembre 2015. Rocío I. R. Macías, Elisa Lozano, María J. Monte, Oscar Briz, Maitane Asensio, **Marta Alonso**, Beatriz Castaño, Silvia Jiménez, Felipe Jiménez, Jesús M. Bañales, María A. Serrano, José J. G. Marín. “Desarrollo experimental de nuevas terapias vectorizadas para superar la quimiorresistencia del colangiocarcinoma”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Nacional.

XXXVIII REUNIÓN DE ACAD 2015. Salamanca, 16 y 17 de octubre 2015. Felipe Jiménez, Elisa Lozano, María J. Monte, Oscar Briz, Maitane Asensio, **Marta Alonso**, Elisa Herráez, Beatriz Castaño, Jesús M. Bañales, María A. Serrano, José J. G. Marín, Rocío I. R. Macías. “Desarrollo experimental de nuevas terapias vectorizadas para superar la quimiorresistencia del colangiocarcinoma”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Nacional.

XLI Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid, 17-19 de febrero 2016. **Marta Alonso**, María J. Monte, Oscar Briz, Elisa Herráez, Ruba Al-Abdulla, Josep M. Argemi, Jesús Prieto, José J. G. Marín. “Identificación de un defecto genético en la etapa peroxisomal de síntesis de ácidos biliares que ocasiona daño hepatocelular por acumulación de precursores tóxicos”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Nacional.

The International Liver Congress 2016. Barcelona, 13-17 de abril 2016. María J. Monte, **Marta Alonso**, Oscar Briz, Elisa Herráez, Rocío I. R. Macías, María J. Pérez, Elisa Lozano, Ruba Al-Abdulla, Maitane Asensio, Francisco Gonzalez-San Martín, Silvia Jiménez, Beatriz Castaño, Josep Argemi, Jesús Prieto, José J. G. Marín. “Identification of a new inborn error in the peroxisomal steps of bile acid synthesis resulting in

accumulation of toxic bile acid intermediates and hepatocellular damage”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Internacional.

XXVI REUNIÓN DE LA SOCIEDAD CASTELLANO-LEONESA DE HEPATOLOGÍA. Salamanca, 27-28 de Mayo de 2016. Oscar Briz, Felipe Jiménez, **Marta Alonso**, María J. Monte, Elisa Herráez, Josep M. Argemi, Jesús Prieto, José J.G. Marín. “Deficiencia de ACOX2: un nuevo defecto genético que interrumpe el metabolismo peroxisomal de los ácidos biliares y predispone al daño hepatocelular”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral. ÁMBITO: Regional.

XXIV International Bile Acid Meeting: Bile Acids in Health and Disease. Düsseldorf (Alemania), 17-18 de junio 2016. José J.G. Marín, María J. Monte, Marta Alonso, Oscar Briz, Elisa Herráez, Rocío I. R. Macías, María J. Pérez, Elisa Lozano, Ruba Al-Abdulla, Maitane Asensio, Francisco González San-Martín, Silvia Jiménez, Beatriz Castaño, Josep Argemi, Jesús Prieto. “ACOX2 deficiency: a new inborn error of bile acid biosynthesis causing persistent hypertransaminasemia”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. 1st Poster Prize. ÁMBITO: Internacional.

XXXIX Congreso de la SEBBM. Salamanca, 5-7 de septiembre 2016. Ruba Ab-Abdulla, Rocío I. R. Macías, Elisa Lozano, Oscar Briz, **Marta Alonso**, Beatriz Castaño, Francisco González-San Martín, Jesús M. Bañales, Luis Bujanda, José J. G. Marín. “Bases moleculares de la quimiorresistencia en el cáncer gástrico: papel del transportoma”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Nacional.

7Th European Club for Liver Cell Biology Meeting (ECLCB-7). Ascot (Reino Unido), 6-8 de octubre 2016. **Marta Alonso-Peña**, Elisa Herráez, María J. Monte, Oscar Briz, Josep Argemi, Jesús Prieto, José J. G. Marín. “Identification of a novel inborn error in bile acid biosynthesis due to the lack of ACOX2 activity in hepatocyte peroxisomes”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral. ÁMBITO: Internacional.

XLII Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid, 15-17 de febrero 2017. Silvia di Giacomo, Laura Sánchez-Vicente, A. di Sotto, María J. Monte, Marta R. Romero, Maitane Asensio, **Marta Alonso-Peña**, Faten Al-Aqib, G. Mazzanti, José J. G. Marín, Oscar Briz. “Nuevos agentes quimiosensibilizantes del carcinoma hepatocelular al sorafenib por bloqueo de las bombas ABC exportadoras de fármacos”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Nacional.

The International Liver Congress 2017. Ámsterdam (Países bajos), 19-23 de abril de 2017. Andreas Geier, Ruba Al-Abdulla, Rocío I. R. Macías, D. Bettinger, J. Weiss, H. Bantel, Daniel Jahn, Maitane Asensio, **Marta Alonso-Peña**, Faten Al-Aqil, José J. G. Marín. “The absence of OCT1 at the plasma membrane of tumor cells is associated with a worse response of hepatocellular carcinoma to sorafenib”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Internacional.

XL SEBBM Congress: The annual congress of the SFBBM. Barcelona, 23-26 de octubre 2017. Ricardo Espinosa, Luis M. Osorio, Escarlata Fernández, Elisa Herráez, Elisa Lozano, Ruba Al-Abdulla, **Marta Alonso-Peña**, Oscar Briz, José J. G. Marín. “Substrate-selective transport of bile acid species by the organic anion transporting polypeptide isoforms OATP1A2 and OATP2B1”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Internacional.

43º Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid, 21-23 de febrero 2018. Elisa Lozano, Maitane Asensio, Oscar Briz, Laura Pérez-Silva, Elisa Herráez, Marta R. Romero, María J. Pérez, Ruba Al-Abdulla, **Marta Alonso-Peña**, Ana Peleteiro-Vigil, Felipe Jiménez, María J. Monte, Luis Bujanda, Jesús .M. Bañales, José J.G. Marín. “Sensibilización del colangiocarcinoma a la quimioterapia por represión de las bombas exportadoras de fármacos ABCC3 y ABCG2 inducida por la sobreexpresión de SOX17”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Nacional.

XXV International Bile Acid Meeting: Bile acids in health and disease 2018. Dublín (Irlanda), 6-7 de julio de 2018. Rocío I.R. Macías, Sonia Matilla, María C. Estiú, María A. Serrano, Elisa Herráez, **Marta Alonso**, Ruba Al-Abdulla, Ronald P. Oude Elferink, José J.G. Marín. “Does the placenta contribute to the enhanced risk of pruritus during maternal hypercholanemia?” TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Internacional.

41 Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Santander, 10-13 de septiembre 2018. **Marta Alonso-Peña**, Ruba Al-Abdulla, Elisa Lozano, Oscar Briz, Rocío I.R. Macías, María J. Monte, Maitane Asensio, María A. Serrano, Jesús M. Bañales, Matías A. Ávila, María Luz Martínez-Chantar, Colm J. O'Rourke, Andreas Geier, Jesper B. Andersen, José J.G. Marín. “Desregulación epigenética del

transportador OCT1 en el cáncer hepático: Utilidad como diana de terapia génica quimiosensibilizante”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Nacional.

XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas. Cádiz, 18-21 de septiembre 2018. Maitane Asensio, Elisa Lozano, Candela Cives-Losada, Juan Carrillo, Lorena Abete, Oscar Briz, Ruba Al-Abdulla, **Marta Alonso-Peña**, Laura Pérez-Silva, Carolina Armengol, José J.G. Marín, Rocío I.R. Macías. “Role of transportome in chemoresistance of hepatoblastoma”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Nacional.

XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas. Cádiz, 18-21 de septiembre 2018. Elisa Lozano, Rocío I.R. Macías, María J. Monte, Maitane Asensio, Sofía del Carmen, Laura Sánchez-Vicente, **Marta Alonso-Peña**, Ruba Al-Abdulla, Colm J. O'Rourke, Jesús M. Banales, Matías A. Ávila, María L. Martínez-Chantar, Andreas Geier, Jesper B. Andersen, Oscar Briz, José J.G. Marín. “Genetic and epigenetic events in the regulation of the expression of the organic cation transporter OCT1: role in chemoresistance of liver cancer to sorafenib”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Nacional.

44º Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid, 20-22 de febrero 2019. **Marta Alonso-Peña**, Heike M. Hermanns, Elisa Herráez, Oscar Briz, María J. Monte, Manuel Sánchez-Martín, Pablo Berrocal, Ignacio García-Tuñón, Ricardo A. Espinosa-Escudero, Jesús Prieto, Andreas Geier, José J.G. Marín. “Mecanismos implicados en la disminución de la expresión/función de la enzima Acil-CoA oxidasa 2 (ACOX2) que conduce a estrés oxidativo y estrés de retículo endoplásmico en los hepatocitos”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Nacional.

German Association for the Study of the Liver (GASL) Annual Meeting 2019. Heidelberg (Alemania), 22-23 de febrero 2019. **Marta Alonso-Peña**, Andreas Geier, Heike M. Hermanns. “Suppression of bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase gene expression by the interleukin-6-type cytokine Oncostatin M”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Internacional.

The International Liver Congress 2019. Viena, 10-14 de abril 2019. **Marta Alonso-Peña**, Heike M. Hermanns, Elisa Herráez, Oscar Briz, María J. Monte, Manuel

Sánchez-Martín, Pablo Berrocal, Ignacio García-Tuñón, Ricardo A. Espinosa-Escudero, Jesús Prieto, Andreas Geier, José J.G. Marín. “Genetic and pathophysiological factors leading to deficient acyl-CoA oxidase 2 (ACOX2) activity in hepatocytes, an alteration which causes oxidative and endoplasmic reticulum stress in liver cells”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Internacional.

41 Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, 16-19 de julio 2019. María A. Serrano, **Marta Alonso-Peña**, Ricardo A. Espinosa-Escudero, Oscar Briz, Elisa Herráez, María J. Monte, Heike M. Hermanns, Manuel Sánchez-Martín, Pablo Berrocal, Ignacio García-Tuñón, Jesús Prieto, Andreas Geier, and José J.G. Marín. “Factors leading to deficient acyl-CoA oxidase 2 (ACOX2), an alteration which causes oxidative and endoplasmic reticulum stress in liver cells”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral. ÁMBITO: Nacional.

1ª Reunión de hepatología traslacional: Status Quo y nuevos horizontes en el estudio del hígado. San Sebastián, 3-5 de octubre 2019. Ricardo Espinosa-Escudero, **Marta Alonso-Peña**, Oscar Briz, Elisa Herráez, María J. Monte, Manuel Sánchez-Martín, Pablo Berrocal, Ignacio García-Tuñón, Jesús Prieto, José J.G. Marín. “Desarrollo de un modelo experimental in vivo en ratón de deficiencia parcial de Acil-CoA oxidasa 2 (ACOX2), que cursa con alteraciones en la síntesis de ácidos biliares”. TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. ÁMBITO: Nacional.

AGRADECIMIENTOS:

El trabajo contenido en estas páginas no habría sido posible sin la ayuda de muchas personas que, dentro o fuera del laboratorio, han aportado su granito de arena. Podría escribir tantas palabras de agradecimiento que duplicaría el tamaño de esta Tesis, pero seré breve.

A mis directores de Tesis:

Al Dr. José Juan García Marín, por darme la oportunidad de colaborar en un proyecto que me apasionó desde el principio y permitirme formar parte de este equipo; por las horas de diseño, discusión y enseñanza.

Al Dr. Oscar Briz Sánchez, por todo el trabajo de los últimos seis años dedicado a enseñarme el oficio de la investigación. Gracias por los momentos en los que nos hemos reído a pesar de la frustración.

A la Dra. Elisa Herráez Aguilar, por la labor ingente de pulir esta Tesis y a esta doctoranda. Por su honestidad y dedicación. Gracias por enseñarme, aconsejarme, animarme y confiar en mí.

Al resto de miembros del grupo:

A la Dra. M^a Ángeles Serrano por ser un ejemplo de saber estar, elegancia y amabilidad. Por su predisposición continua a mejorar las condiciones de trabajo y su dedicación a la Universidad de Salamanca.

A la Dra. M^a Jesús Monte, por su paciencia y su extraordinaria capacidad docente. Por enseñarme el trabajo con animales de experimentación, el arte de la extracción con cartucho y el análisis por HPLC-MS/MS.

A la Dra. Rocío Rodríguez Macías, por transmitirme en primer lugar el gusto por la fisiología. Por darme la oportunidad de empezar y por estar siempre disponible para cualquier consulta.

A la Dra. M^a José Pérez García, que generosamente atendió mis interminables preguntas sobre estrés de retículo, anticuerpos, estrés oxidativo y Western blot. Te echamos de menos.

A la Dra. Marta Rodríguez Romero, por su entusiasmo y buen humor. Gracias por guiarme en las primeras “visitas turísticas” al laboratorio.

A la Dra. Elisa Lozano, por su paciencia infinita, sus consejos, su ayuda desinteresada, y por ser un ejemplo de esfuerzo y buen hacer en el laboratorio.

A la Dra. Ruba Al-Abdulla, por todas las locuras, riñas, confidencias, desilusiones, alegrías y enseñanzas compartidas. Porque nosotras sabemos que aunque “nos enfademos con el mundo”, no hay nada que el chocolate no pueda solucionar.

A la Dra. Maitane Asensio – sí, lo hemos conseguido – que empieza y termina esta etapa conmigo. Gracias por estar; por compartir tantas comidas, cafés y meriendas; papeleos, quejas, clases, congresos y estancias; actuaciones, fiestas, videos de los sobrinos... y mucho más.

A Laura y Ana, que nos reemplazaron en la ardua tarea del café, por compartir gafe y desvaríos, hacer “piña”, y revolucionar el orden de este laboratorio.

A las últimas incorporaciones:

A “mi heredero”, Ricardo, que le ha tocado remar conmigo cuando apenas me quedaban fuerzas. Espero que en este tiempo hayas aprendido todo lo que no se debe de hacer y que tengas muchísimos éxitos. A Anabel, Paula y Meraris, conejillos de indias en mi primera labor como coordinadora y primeros *reviews*. A Candela, por acompañarme en el S09 y acordarse de todo lo que yo olvido; a Álvaro, asesor químico de esta Tesis Doctoral, y a Bea, siempre capaz de generar un aura de buen humor a su alrededor. Gracias por convertirnos en “familia numerosa”, por contagiar vuestro optimismo, y por todos los momentos compartidos dentro y fuera del horario de trabajo.

A las demás personas con las que he tenido el privilegio de trabajar estos años:

A la Dra. Faten Al-Aquil, y a nuestras investigadoras visitantes, la Dra. Lorena Abete, la Dra. Silvia Giacomo, y Annelis, que tuvieron que aprender nuestra jerga particular.

A nuestras técnicas, Narci y Emilia, por hacernos más fácil el trabajo día tras día. A M^a Isabel Hernández por su excelente trabajo en la secretaría; y a nuestras conserjes, por estar pendientes de las instalaciones, del correo, y de cualquier contratiempo. Al personal del Servicio de Experimentación Animal, del Servicio de Transgénesis y del Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.

Al Dr. Andreas Geier, la Dra. Heike Hermanns, el Dr. Daniel Jahn y al resto del equipo de la Universidad de Würzburg con los que tuve el enorme placer de trabajar durante mi estancia. Por su interés, su amabilidad y su ayuda. Y al resto de personas que me acompañaron en esa experiencia enriquecedora.

Y a todas las personas que han contribuido a despejarme la mente de la ciencia y la experimentación:

A mis chicas de Santander, Ichi, Paloma, Candela, Carla y Clara, con las que he crecido y vivido mil aventuras.

A los *Biotecs*, en especial a las que “sobrevivieron” a la etapa de postgrado, y los *Frayluses*, por hacer de los primeros años en Salamanca los más memorables de todos.

A mi familia bailonga; a Tess, Julio y Cris; a Soraya y Raúl... a todos ellos, que han sido amigos incondicionales durante esta etapa.

A Luis, que ha recorrido más kilómetros que *Willy Fog* en la vuelta al mundo para estar conmigo. Gracias por calmar mis nervios, por darme fuerza y confianza, por compartir tantos buenos momentos y por ayudarme y soportarme en los malos. Y a Toti y Lupe, por su cariño y apoyo.

A mis tíos “los divertidos” que, curiosamente, también son doctores. A mi familia de Salamanca, en especial a mis tíos María Jesús y Timi, que han estado nueve años haciéndome sentir como en casa domingo tras domingo. Al resto de mis tíos y primos, que no son pocos, y que siempre están ahí con una palabra de ánimo, un chascarrillo, o un fuerte abrazo.

A la familia que siempre me acoge como buena hija prodiga, a mis padres, mi abuela, mi hermana Nuria y a Ángel. A mi abuelo, que siempre está conmigo. Sois el pilar fundamental sobre el que se apoya este edificio, sin vosotros nada hubiera sido posible.

Finalmente, al último en llegar: a mi sobrino y ahijado, Héctor, que se ha convertido en el mayor motivo de alegría, en mi pequeño gran tesoro.

A todos, ¡Millones de gracias!

Dedicada a:

Mis padres, Juanjo e Inma, y mis abuelos, Sonia y Luis, que me enseñaron a afrontar los problemas con inteligencia, paciencia, trabajo y buen humor.

ABREVIATURAS

AB:	Ácido biliar.
ABC:	<i>ATP Binding Cassette.</i>
ACOX:	Acil-CoA oxidasa.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc:	Ácido desoxirribonucleico complementario.
AEDT:	Ácido etilendiaminotetraacético.
AINES:	Antiinflamatorios no esteroideos.
AKR:	<i>Aldo-Keto Reductase.</i>
AKT:	Proteínas quinasas B.
ALT:	Alanina-aminotransferasa.
AMACR:	α -Metilacil-CoA racemasa.
ANGPTL4:	<i>PPARG Angiopoietin Related Protein.</i>
APD:	Deficiencia Parcial de ACOX2.
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero.
ASBT:	<i>Apical Sodium-Bile Acid Transporter.</i>
AST:	Aspartato-aminotransferasa.
BAAT:	Ácido biliar-CoA: aminoácido N-aciltransferasa.
Bcl-2:	Familia de proteínas pro- y antiapoptóticas.
BCRP:	<i>Breast Cancer Resistance Protein.</i>
BRIC:	Colestasis intrahepática recurrente benigna.
BSA:	Albúmina sérica bovina.
BSEP:	<i>Bile Salt Export Pump.</i>
C24:	Esteroides de 24 átomos de carbono.
C27:	Esteroides de 27 átomos de carbono.
CA:	Ácido cólico.
CDCA:	Ácido quenodesoxicólico.
CHOP:	<i>C/EBP Homologous Protein.</i>
CoA:	Coenzima A.
Ct:	Ciclo umbral.
CTX:	Xantomatosis Cerebrotendinosa.
CYP:	Citocromo P450.
CYP7A1:	Colesterol 7 α -hidroxilasa.
DAPI:	4 ' 6-diamidino-2-fenilindol.
DCA:	Ácido desoxicólico.
DCFH-DA:	Diclorofluoresceína diacetato.

DILI:	<i>Drug Induced Liver Injury.</i>
DHCA:	Ácido 3 α , 7 α -dihidroxicolestanoico.
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium.</i>
DMSO:	Dimetil sulfóxido.
DR:	<i>Directed Repeat.</i>
dNTP:	Desoxinucleótido trifosfato.
EGFP:	Proteína verde fluorescente mejorada.
EEM:	Error estándar de la media.
ER:	<i>Everted Repeat.</i>
ERK:	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases.</i>
ERS:	Estrés de retículo endoplásmico.
FAD:	Flavín adenín dinucleótido.
FBS:	Suero bovino fetal.
FGF19:	<i>Fibroblast Growth Factor 19.</i>
FoxO1:	<i>Forkhead Box O1.</i>
FXR:	<i>Farnesoid X Receptor.</i>
GAPDH:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GCA:	Ácido glicocólico.
GCDCA:	Ácido glicoquenodesoxicólico
GDCA:	Ácido glicodesoxicólico.
GGT:	γ -Glutamyl transpeptidasa.
GRP78:	<i>Glucose-Regulated Protein 78.</i>
HNF4 α :	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 4α.</i>
HPLC-MS/MS:	Cromatografía líquida de alta presión acoplado a espectrometría de masas en tándem.
HPRT1:	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase.</i>
HSD:	<i>Hydroxysteroid Dehydrogenase.</i>
HSD17B4:	Gen codificante de la proteína D-bifuncional (DBP).
IBABP:	<i>Ileal Bile Acid-Binding Protein.</i>
iDILI:	DILI idiosincrásico.
IHH:	Hepatocitos humanos inmortalizados.
IL1 β :	Interleucina 1 β .
IL6:	Interleucina 6.
IR:	<i>Inverted Repeat.</i>
IRE1 α :	<i>Inositol-Requiring Enzyme-1α.</i>
JAK:	Janus quinasas.

JNK:	<i>c-Jun N-terminal Kinases.</i>
Kb:	Kilobase.
KDa:	Kilodalton.
KI:	<i>Knock-in.</i>
LCA:	Ácido litocólico.
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad.
LXR α :	<i>Liver X Receptor α.</i>
MAF:	<i>Minor allele frequency.</i>
MAPK:	<i>Mitogen-activated Protein Kinases.</i>
MCA:	Ácido muricólico.
MCS:	<i>Multi-cloning site.</i>
MDR3:	<i>Multidrug-Resistance Protein 3.</i>
MEM:	<i>Minimum Essential Medium.</i>
Mock:	Control transducido con vectores vacíos.
MOI:	Multiplicidad de infección.
MRP2:	<i>Multidrug resistance-associated protein 2.</i>
MTT:	Metil tetrazolio.
NAFL:	<i>Nonalcoholic Fatty Liver.</i>
NAFLD:	<i>Nonalcoholic Fatty Liver Disease.</i>
NASH:	<i>Nonalcoholic Steatohepatitis.</i>
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information.</i>
NTCP:	<i>Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide.</i>
OATP:	<i>Organic Anion-Transporting Polypeptide.</i>
OMIM:	<i>Online Mendelian Inheritance in Man.</i>
ORF:	<i>Open reading frame.</i>
OSM:	Oncostatina M.
OST:	<i>Organic Solute Transporters.</i>
PBS:	Tampón fosfato salino.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEI:	Polietilenimina.
PFIC:	Colestasis intrahepática familiar progresiva.
PGC-1 α :	<i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Coactivator 1α.</i>
PPAR:	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor.</i>
PXR:	<i>Pregnane X Receptor.</i>
qPCR:	PCR cuantitativa.
RT:	Transcripción reversa.

ROS:	Especies reactivas de oxígeno.
SCP2:	Gen codificante de la proteína transportadora de esteroides X (SCPx).
SD:	Desviación estándar.
SDS:	Dodecilsulfato sódico.
SHP:	<i>Small heterodimer partner.</i>
SNP:	Polimorfismo de nucleótido único.
SREBP1:	<i>Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1.</i>
STAT:	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription.</i>
TCA:	Ácido taurocólico.
TCDC:	Ácido tauroquenosodesoxicólico.
TDCA:	Ácido desoxicólico.
TLCA:	Ácido taurolitocólico.
TUDCA:	Ácido tauroursodesoxicólico.
TG:	Tapsigargina.
TGR5:	<i>G-protein-Coupled Bile Acid Receptor.</i>
THCA:	Ácido 3 α , 7 α , 12 α -trihidroxicolestanoico.
TNF α :	<i>Tumor Necrosis Factor α.</i>
UAF:	Unidades arbitrarias de fluorescencia.
UDCA:	Ácido ursodesoxicólico.
UPR:	<i>Unfolded Protein Response.</i>
UTR:	<i>Untranslated region.</i>
V1:	Variante de ACOX2 c.673C>T (p.R225W).
V5:	Etiqueta proteica derivada de las proteínas V y P del paramixovirus de simio.
VDR:	<i>Vitamin D Receptor.</i>
WB:	Western blot.
WT:	<i>Wild type.</i>
XBP1:	<i>X-box Binding Protein 1.</i>

ÍNDICE

1. OBJETIVOS	1
2. INTRODUCCIÓN	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
5. CONCLUSIONES	121
6. BIBLIOGRAFÍA	125
5. ENGLISH SUMMARY	145

1. OBJETIVOS

Los ácidos biliares juegan un papel determinante en la función digestiva y excretora del hígado, siendo indispensable su secreción activa hacia el espacio biliar para la generación del flujo de bilis por filtración osmótica. Además, los ácidos biliares son importantes señales integradoras implicadas en la regulación del metabolismo energético, la utilización de las grasas y los azúcares; y moléculas de modulación de los procesos inflamatorios y regenerativos del hígado.

Existe una gran variedad de patologías asociadas a fallos en el metabolismo de los ácidos biliares. Se trata, en la mayor parte de los casos, de afecciones muy graves y poco frecuentes, que afectan no sólo al tejido hepático, sino que suponen trastornos neurológicos, renales y endocrinos por acumulación de metabolitos intermediarios. La interrelación existente entre las rutas biosintéticas de los ácidos biliares, los ácidos grasos y las hormonas esteroideas, todas ellas moléculas derivadas del colesterol, y la importancia de todas estas moléculas en la fisiología y biología celular del ser humano, son probablemente la causa de la gran variedad y gravedad sintomatológica de este grupo de patologías, en las que el efecto detergente de los ácidos biliares, trascendental para el desarrollo de su función solubilizadora de grasas, constituye un importante agente de daño celular cuando se acumulan en los tejidos. El objeto de estudio de esta Tesis Doctoral parte de un caso clínico. Se trata de un paciente adolescente del Dr. Jesús Prieto Valtuille, especialista en Medicina Interna y en Hepatología de la Clínica Universidad de Navarra, que fue diagnosticado de episodios de colestasis intrahepática de causa desconocida. El signo clínico más importante fue la elevación de los niveles de transaminasas séricas mantenida a lo largo del tiempo tras un episodio de hepatotoxicidad severa que podría estar relacionada con un tratamiento con ibuprofeno y diclofenaco de un proceso inflamatorio debido a una lesión traumática de una rodilla. Tras descartar las patologías asociadas a daño hepático más comunes, el análisis genético permitió identificar en el genoma del paciente una mutación (c.673C>T) en homocigosis en la región codificante del gen *ACOX2*, cuyo producto es la acil-CoA oxidasa 2 (*ACOX2*), una enzima implicada en la síntesis *de novo* de ácidos biliares localizada en los peroxisomas de los hepatocitos.

La hipótesis de este proyecto es que un déficit funcional de la enzima peroxisomal *ACOX2* puede causar una deficiencia de ácidos biliares maduros y la acumulación de

metabolitos hepatotóxicos, comprometiendo, de esta manera, las capacidades detoxificantes y regenerativas del hígado. Esta alteración podría estar presente en otros casos de hipertransaminasemia persistente de causa no filiada, así como constituir un factor predisponente a la toxicidad por fármacos e incluso aumentar el riesgo oncogénico.

Con estos antecedentes, nos planteamos como **objetivo global** de esta Tesis Doctoral identificar las bases moleculares de este nuevo defecto congénito en el metabolismo de los ácidos biliares, definir los patrones de transmisión genética, estudiar los factores concomitantes que inducen su desarrollo, caracterizar su fisiopatología y evaluar su posible implicación en la sensibilidad hepática a fármacos de uso común (DILI) y en otras enfermedades hepáticas de etiología poco definida, como la esteatohepatitis no alcohólica o el hepatocarcinoma poco frecuente que aparece a veces sobre hígado sano.

Para alcanzarlo, nos propusimos los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1: Describir el cuadro clínico y sintomatológico del paciente con Deficiencia Parcial de ACOX2 (APD), identificar las bases genéticas y elaborar el árbol genealógico de la alteración encontrada.

Objetivo 2: Desarrollar un modelo *in vitro* de células con sobreexpresión de ACOX2 para la evaluación funcional de la variante alterada de esta enzima.

Objetivo 3: Hacer un estudio *in silico* para buscar posibles variantes de ACOX2 que pudiesen acarrear trastornos funcionales, y desarrollar modelos *in vitro* que permitan analizar esta posibilidad.

Objetivo 4: Evaluar los mecanismos etiológicos del daño inducido por antiinflamatorios no esteroideos (AINES) en los pacientes con APD.

Objetivo 5: Investigar los mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos implicados en la regulación de la actividad de ACOX2.

Objetivo 6: Obtener un modelo de la enfermedad en ratón, mediante las herramientas de edición génica CRISPR/Cas9, que reproduzca las características fenotípicas identificadas en el paciente de estudio.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. SISTEMA HEPATOBILIAR

El sistema biliar incluye el hígado, el sistema biliar ductal (dúctulos biliares o canales de Hering, ductos biliares intrahepáticos y extrahepáticos, el conducto hepático común, el conducto cístico y el conducto biliar común) y la vesícula biliar (Figura I1-A). Todos los vertebrados poseen un tracto biliar, pero no todos poseen vesícula biliar, cuya función es participar en la circulación enterohepática de la bilis, mediante el almacenamiento y concentración de los componentes de la bilis a través de la eliminación de agua e intercambio de electrolitos (Diamond, 1962).

El hígado desempeña múltiples funciones en el organismo, entre las que destacan:

- Metabolismo de hidratos de carbono: homeostasis de la glucosa, catabolismo de hexosas, gluconeogénesis, glucogenolisis y glucogenogénesis.
- Metabolismo de lípidos: síntesis y catabolismo de colesterol, producción de ácidos grasos y triglicéridos, síntesis y metabolismo de lipoproteínas plasmáticas, β -oxidación de ácidos grasos y producción de cuerpos cetónicos durante el ayuno.
- Metabolismo de proteínas: síntesis de proteínas plasmáticas, transformación del amonio en urea, catabolismo de bases púricas y pirimidínicas, interconversión de aminoácidos no esenciales.
- Producción de bilis: el hígado secreta la bilis al duodeno, donde desempeña un papel fundamental en la digestión de las grasas y absorción de nutrientes y vitaminas liposolubles, y en el drenaje de los productos de desecho del hígado.
- Síntesis de factores de coagulación como el fibrinógeno, factores III, V, VII, IX y XI y del grupo hemo.
- Almacén de múltiples sustancias como glucosa en forma de glucógeno, vitamina B12, hierro y cobre.
- Destoxificación y otras reacciones de biotransformación: es el responsable de la eliminación a bilis de un gran número de compuestos con estructuras químicas diferentes denominados compuestos colefílicos. Algunos de ellos son endógenos, como los ácidos biliares (ABs) y pigmentos biliares hemoderivados; mientras que otros muchos son xenobióticos.

Las células mayoritarias del parénquima hepático son los hepatocitos (Figura I1-B), que son los encargados de desempeñar la mayoría de las funciones metabólicas y destoxificantes atribuidas al hígado. Son células epiteliales que poseen una polaridad

muy marcada, distinguiéndose en la membrana plasmática tres regiones de distinta especificidad morfológica y funcional (Meier, 1988):

- Membrana sinusoidal: orientada hacia el polo sanguíneo (espacio de Disse), forma los espacios vasculares denominados sinusoides. Esta membrana está dotada de microvellosidades que elevan considerablemente la superficie de intercambio.
- Membrana lateral: es la membrana situada entre hepatocitos colindantes. Contiene estructuras celulares cuya función es mantener la conexión mecánica y funcional entre los hepatocitos adyacentes como las *tight junctions*, desmosomas y *gap junctions* (Meier, 1988).
- Membrana canalicular: es una invaginación de la superficie de la membrana plasmática del hepatocito, que al unirse a la del hepatocito adyacente, forma el canalículo biliar. Esta membrana también presenta numerosas microvellosidades hacia la luz canalicular.

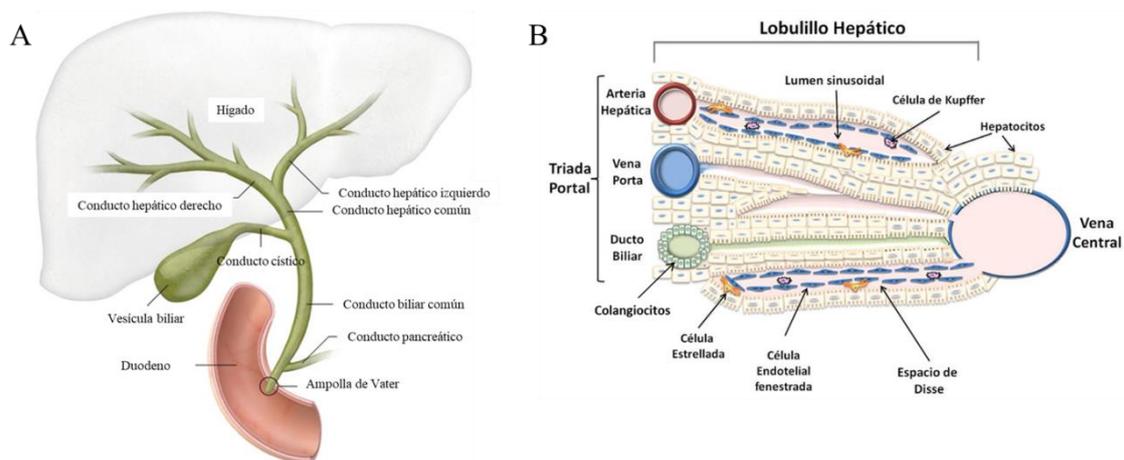


Figura II: Representación esquemática de los órganos que constituyen el sistema hepatobiliar (A). Representación del lobulillo hepático (B), donde se observan los distintos tipos celulares que conforman el órgano: hepatocitos, colangiocitos, células endoteliales fenestradas, células estelares o estrelladas y células de Kupffer (B. Delgado-Coello Coello, 2017).

Los canalículos biliares convergen en conductillos y éstos en conductos biliares contenidos en los espacios porta, que contienen también vasos linfáticos y paquetes nerviosos (Feldmann, 1986). Además de los hepatocitos, existe otro tipo de célula epitelial, los colangiocitos (Figura II-B), que representan una pequeña proporción del total de células hepáticas, pero que juegan un importante papel fisiológico, ya que forman parte del sistema biliar ductal (Gaudio *et al.*, 2009). Los colangiocitos pueden

llevar a cabo procesos de secreción y absorción de agua, electrolitos y otros solutos orgánicos de la bilis (Arias *et al.*, 2009), modificando su composición durante el tránsito de esta a través de los conductos biliares. Además, estas células tienen capacidad para actuar como células hepáticas progenitoras tras un daño hepático (Sell, 2001).

Por otro lado, en el hígado también existen: i) células endoteliales fenestradas, que recubren los sinusoides hepáticos y permiten un intercambio directo de partículas de tamaño medio, como lipoproteínas, entre la sangre y los hepatocitos; ii) células estelares o estrelladas, que almacenan vitamina A, sintetizan diferentes proteínas de la matriz extracelular y secretan factores de crecimiento, por lo que juegan un papel fundamental en los procesos de regeneración y fibrosis; iii) y células de Kupffer, macrófagos residentes en el hígado o histiocitos hepáticos encargados de la fagocitosis de bacterias y sustancias extrañas, así como de la producción de citoquinas y de las respuestas inflamatorias (Figura I1-B) (Michalopoulos *et al.*, 1997; Hall, 2016).

2.2. ÁCIDOS BILIARES

2.2.1. Síntesis de los ácidos biliares primarios

Los ABs son moléculas sintetizadas en los hepatocitos a partir de colesterol. En el ser humano, todos los ABs son ácidos colanoicos, es decir, esteroides de 24 átomos de carbono (C24) (Hofmann *et al.*, 2010). Los ABs primarios en humanos son el ácido cólico (ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colanoico, CA) y el ácido quenodesoxicólico (ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colanoico, CDCA) (Hofmann, 1977). El núcleo esteroide presenta cuatro anillos de carbono fusionados (anillo ciclopentanoperhidro-fenantreno), tres de ellos de 6 carbonos (anillos A, B y C) y el cuarto de 5 átomos de carbono (anillo D). La transformación del colesterol en ABs C24 conlleva la hidroxilación y saturación del doble enlace entre los carbonos 5 y 6, la epimerización del hidroxilo de la posición 3 y la rotura de la cadena lateral del colesterol mediante oxidación (Chiang, 2013). La síntesis de ABs requiere de la intervención de, al menos, 17 enzimas, distribuidas en distintos compartimentos celulares (citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisoma). En los seres humanos, se han descrito cuatro rutas implicadas en la síntesis de los ABs primarios CA y CDCA: la ruta clásica o neutra, la ruta alternativa o ácida, la ruta de Yamasaki y la ruta de 25-hidroxilación (Figura I2) (Russell, 2003). El orden exacto de las reacciones de síntesis de los ABs aún no se ha dilucidado completamente, debido a que muchos de los intermediarios de la ruta pueden ser

sustratos de más de una enzima. Asimismo, se sabe muy poco del transporte de los ABs y sus intermediarios entre los distintos compartimentos subcelulares involucrados en su síntesis.

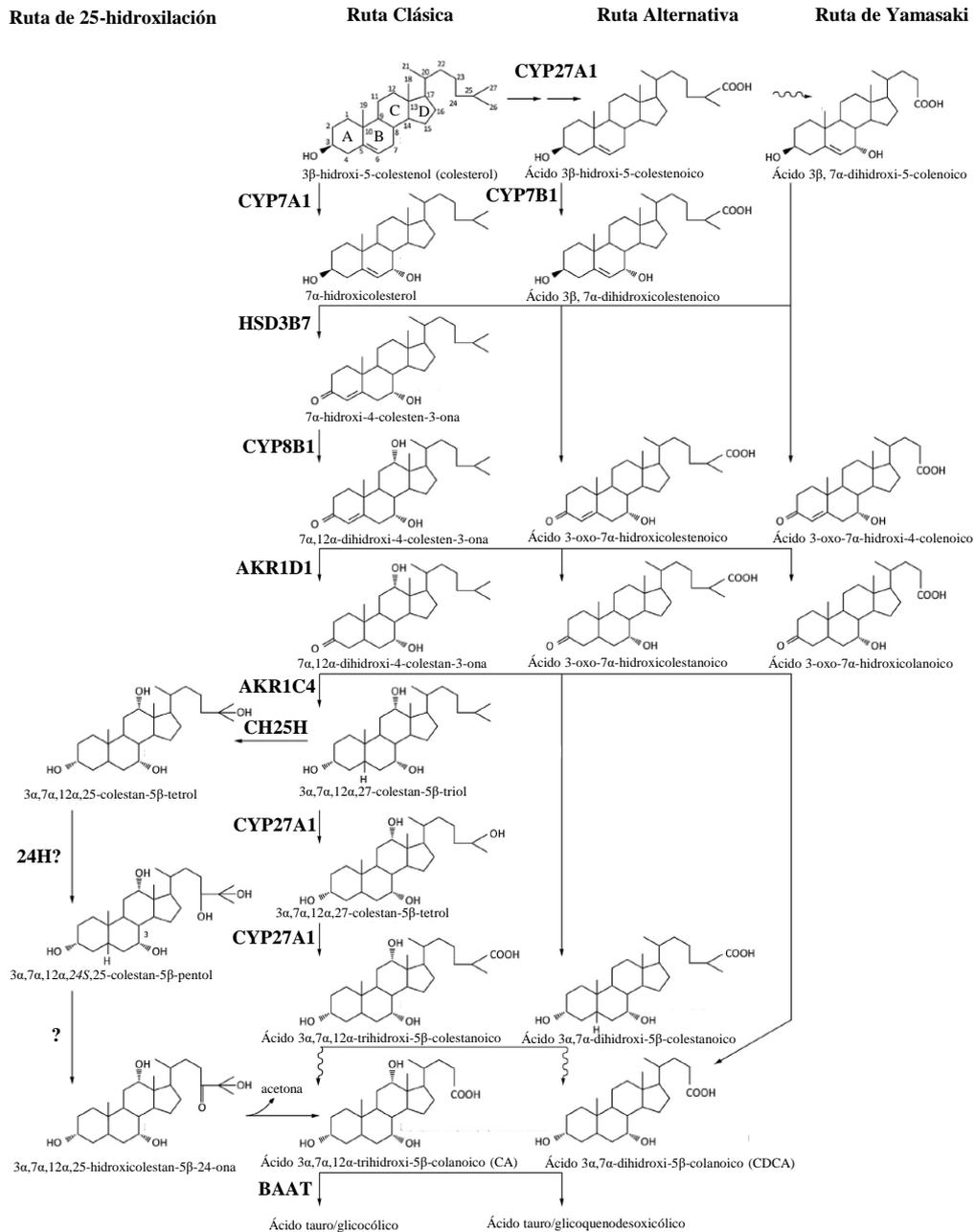


Figura I2: Esquema de las cuatro principales rutas de síntesis de los ácidos biliares (ABs) primarios descritas en el ser humano: ruta de 25-hidroxilación, ruta clásica o neutra, ruta alternativa o ácida y ruta de Yamasaki. Se representan las principales enzimas implicadas y las fórmulas estructurales de los intermediarios con su nombre químico (IUPAC). CYP7A1: Colesterol 7 α -hidroxilasa. CYP27A1: Esterol 27-hidroxilasa. CYP7B1: 25-hidroxicolesterol 7 α -hidroxilasa. HSD3B7: 3 β -hidroxi-D5-C27-esteroide oxidorreductasa. CYP8B1: Esterol 12 α -hidroxilasa. AKR1D1: D4-3-oxoesteroide-5 β -reductasa. AKR1C4: 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa. CH25H: Colesterol 25-hidroxilasa. 24H: esterol 24-hidroxilasa desconocida. BAAT: ácido biliar-CoA: aminoácido N-aciltransferasa. La flecha ondulante indica el acortamiento por β -oxidación en el peroxisoma, que se detalla en la figura I3. El símbolo de interrogación indica procesos enzimáticos desconocidos (Vaz *et al.*, 2017).

En la vía clásica, las modificaciones del núcleo esteroide preceden al acortamiento de la cadena lateral. El primer paso, considerado el limitante de la ruta de síntesis, consiste en la hidroxilación del colesterol en el carbono 7 de su núcleo esteroide para formar 7 α -hidroxicolesterol, catalizado por la enzima estero 7 α -hidroxilasa (CYP7A1). A continuación, la 3 β -hidroxi-D5-C27-esteroide oxidoreductasa (HSD3B7) convierte el 7 α -hidroxicolesterol en su forma 3-oxo-D4. En este punto, si el C12 es hidroxilado por la enzima estero 12-hidroxilasa (CYP8B1) se generará CA, mientras que si esta enzima no interviene, se genera CDCA. Todas estas reacciones iniciales ocurren en el retículo endoplásmico. Posteriormente, en el citosol, el grupo 3-oxo-D4 es reducido por la enzima D4-3-oxoesteroide-5 β -reductasa (AKR1D1) para generar un enlace sencillo, con el grupo hidruro del C5 en configuración β , y por la enzima 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (AKR1C4) para introducir el grupo hidroxilo en 3 α . La enzima estero 27-hidroxilasa (CYP27A1) añade un grupo carboxilo en C27, generando exclusivamente estereoisómeros 25*R* de los intermediarios ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colestanoico (DHCA) y ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colestanoico (THCA) en la mitocondria. A continuación, estos intermediarios tienen que ser activados para generar un tioéster unido a coenzima A (CoA), lo cual puede ocurrir gracias a la intervención de una de estas dos enzimas: la ácido biliar CoA ligasa (BACS), que se encuentra en el retículo endoplásmico, y la acil-CoA de cadena muy larga sintetasa (VLCS), que se localiza tanto en el retículo endoplásmico como en el peroxisoma. Los ABs C27 unidos a CoA son transportados al peroxisoma por el transportador ABCD3 (también denominado PMP70). En esta organela la cadena lateral se acorta mediante β -oxidación para generar los ABs C24 (Figura I3). En primer lugar, la enzima α -metilacil-CoA racemasa (AMACR) produce la racemización del grupo metilo del C25. Este paso es necesario, porque la primera enzima de la β -oxidación, la acil-CoA oxidasa 2 o acil-CoA de cadena ramificada oxidasa (ACOX2) sólo acepta como sustrato a los isómeros *S*, mientras que los intermediarios producidos anteriormente en la ruta son isómeros *R*. Tras la racemización, la ACOX2 cataliza la formación de 24-enoil-CoA del THCA y de DHCA. A continuación, se produce la hidratación y deshidrogenación llevadas a cabo por la proteína D-bifuncional (DBP). Esta enzima también es estereoespecífica y forma sólo los isómeros (24*R*)-OH, que son seguidamente deshidrogenados a 24-ceto-CoA-ésteres. Finalmente, la proteína transportadora de esteroides X (SCPx) es la responsable de la escisión tiolítica en propionil-CoA y ácidos cólico-CoA o quenodesoxicólico-CoA. El paso final en la síntesis de ABs es la conjugación/amidación de los ABs C24

con glicina o taurina. La reacción se lleva a cabo por la ácido biliar-CoA:aminoácido N-aciltransferasa (BAAT), que convierte el acil-CoA biliar en glico- o tauro-conjugados, liberando la molécula de CoA. La ruta clásica es la que más contribuye al *pool* total de ABs (Russell, 2003).

En la ruta alternativa, en primer lugar se genera un ácido carboxílico C27, posteriormente se dan las modificaciones del núcleo esteroideo y finalmente el acortamiento de la cadena lateral. El primer paso es catalizado por la enzima CYP27A1 y después la 7 α -hidroxilación es catalizada en el retículo endoplásmico por la enzima oxisterol-7 α -hidroxilasa (CYP7B1). El resto de las modificaciones son completadas por las enzimas de la ruta clásica. Esta ruta parece producir preferentemente CDCA y es la que más contribuye a la síntesis de ABs en los niños (Setchell *et al.*, 1988).

En la ruta de Yamasaki, el principal ABs generado también es el CDCA. Los primeros pasos de esta ruta coinciden con aquellos de la ruta alternativa, pero la oxidación de la cadena lateral y su acortamiento precede a la completa modificación del núcleo esteroide, generando intermediarios de ABs C24 con grupos 3 β -hidroxilo. Se desconoce la contribución de la ruta de Yamasaki al *pool* de ABs, pero parece que esta ruta es cuantitativamente importante durante la etapa fetal y neonatal (Setchell *et al.*, 1988; Nakagawa *et al.*, 1990).

Finalmente, la ruta de 25-hidroxilación se ha descrito como otra vía de síntesis de ABs C24, que se inicia tras las modificaciones del núcleo esteroideo y que es independiente del acortamiento por β -oxidación. Aunque aún no se ha caracterizado completamente, la ruta comienza con la enzima citosólica 25-hidroxilasa (CH25H), que genera 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colestano-25-tetrol. Este es posteriormente hidroxilado en C24, dando lugar a un 24 S -pentol, que es deshidrogenado a un 24-oxo-tetrol (Shefer *et al.*, 1976) y finalmente se escinde en CA y acetona (Salen *et al.*, 1979). La acumulación del intermediario 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colestano-25-tetrol en los fluidos biológicos de pacientes con Xantomatosis Cerebrotendinosa (CTX) (Salen *et al.*, 1979) sugiere que la 24-hidroxilación puede ser catalizada por CYP27A1 (apartado 1.4.5.2).

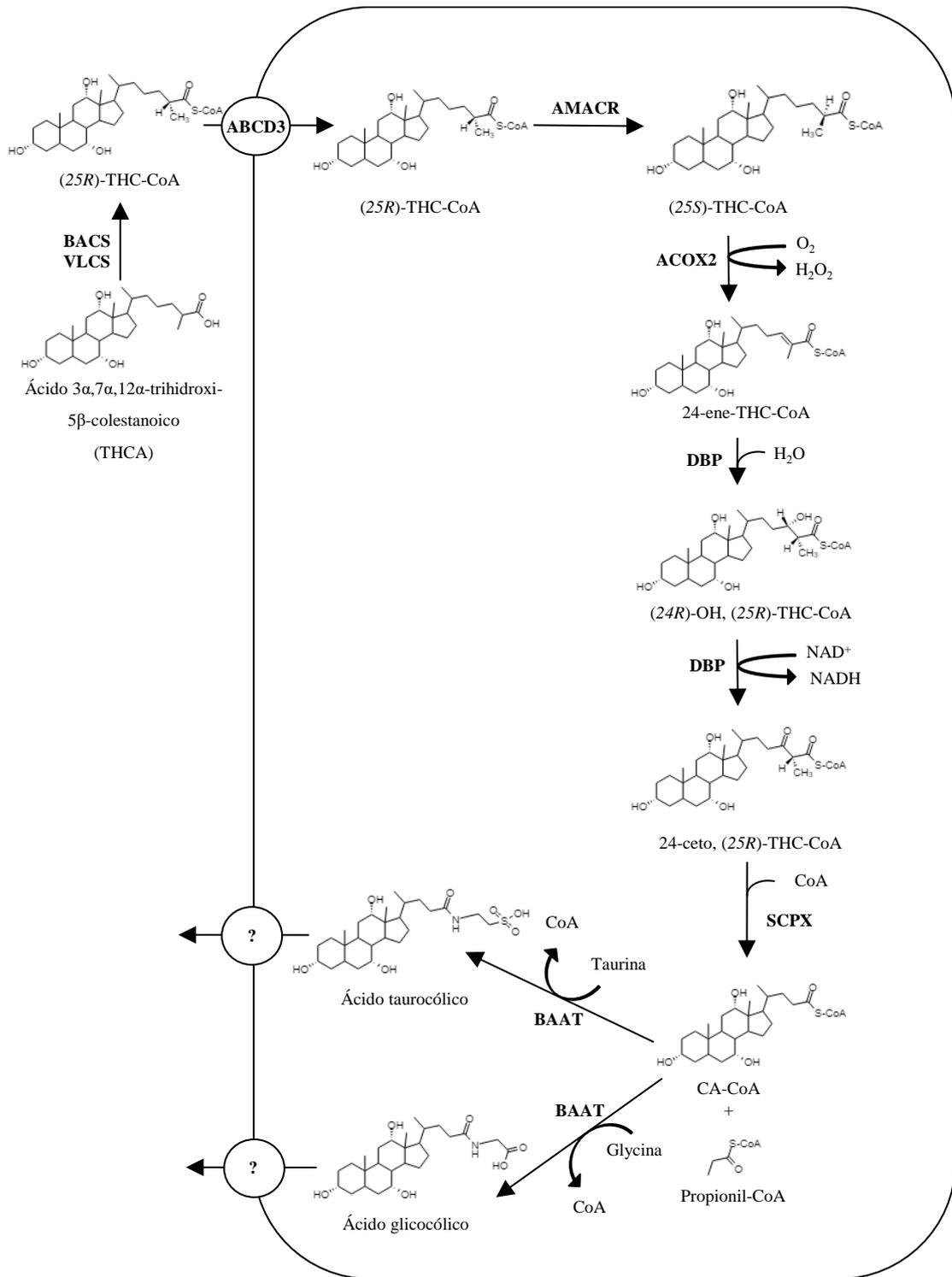


Figura I3: Reacciones de acortamiento del ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colestanoico (THCA) por β -oxidación durante la síntesis del ácido cólico (CA) en el peroxisoma. Se representan las principales enzimas implicadas y las fórmulas estructurales de los intermediarios. El símbolo de interrogación indica procesos desconocidos. THC: trihidroxicolestanoico. VLCS: acil-CoA de cadena muy larga sintetasa. BACS: ácido biliar-CoA ligasa. ABCD3: proteína ABC, subfamilia D, miembro 3. AMACR: α -metilacil-CoA racemasa. ACOX2: acil-coA oxidasa 2. DBP: proteína D-bifuncional. SCPX: proteína transportadora de esteroides X. BAAT: ácido biliar-CoA: aminoácido N-aciltransferasa (Vaz *et al.*, 2017).

2.2.2. Transformación bacteriana de los ácidos biliares

La flora microbiana del intestino grueso afecta de forma importante al metabolismo de los ABs y viceversa, la bilis y los ABs previenen el sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (Inagaki *et al.*, 2006).

Entre las modificaciones estructurales que tienen lugar en el intestino grueso se encuentran:

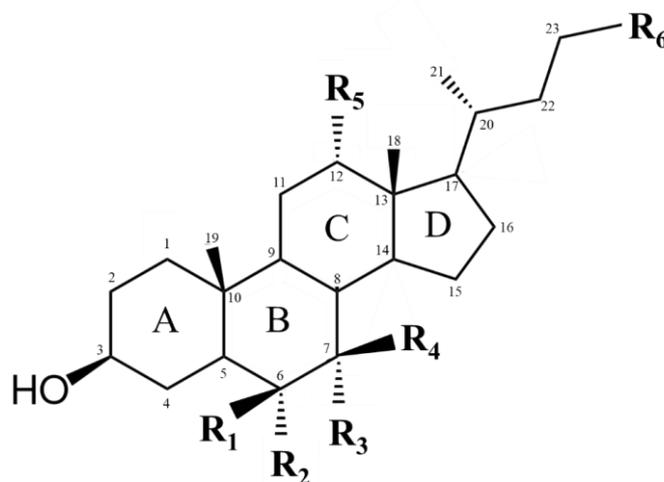
- La desconjugación para liberar los residuos de glicina o taurina de la posición C24 del AB.
- La oxidación de grupos hidroxilo en las posiciones C3, C7 y C12 y la $7\alpha/7\beta$ -deshidroxilación, llevada a cabo por hidroxisteroide deshidrogenasas, expresadas en varias cepas bacterianas (Setchell *et al.*, 1983).

La 7α -deshidroxilación de CA y CDCA, para generar los ABs secundarios ácido desoxicólico (DCA) y ácido litocólico (LCA), representa la biotransformación más importante cuantitativamente en el colon humano, ya que estos ABs secundarios son las especies predominantes en las heces humanas (Setchell *et al.*, 1983). La reacción de deshidroxilación parece restringirse a ABs libres, implicando una interacción funcional entre las actividades de desconjugación y deshidroxilación en el intestino grueso (Ridlon *et al.*, 2006).

2.2.3. Estructura y propiedades

Como se ha comentado anteriormente, los ABs primarios en el ser humano, CA y CDCA, tienen como base un anillo ciclopentanoperhidro-fenantreno unido a una cadena lateral que compone una molécula C24. Una característica estructural común a todos los ABs y al colesterol es la presencia de 3 grupos metilo, situados en las posiciones C10, C13 y C20, y la cadena lateral unida al anillo D en la posición C17. Por otro lado, en los ABs primarios el grupo hidroxilo de C3 se encuentra en configuración α , mientras que el grupo hidruro del C5 se encuentra en β , generando una configuración en *cis* a lo largo del plano de los anillos fusionados A y B (Figura I4). En el CA, los tres grupos hidroxilo y el carboxilo de la cadena lateral se sitúan hacia el mismo lado del esqueleto carbonado, generando una cara hidrofílica que se opone a una cara marcadamente hidrofóbica. Así, los ABs son moléculas anfipáticas con propiedades detergentes (Chiang, 2013). Los ABs CDCA, DCA y LCA mantienen esta estructura, pero el menor

número de grupos hidroxilo determina un mayor carácter hidrofóbico de estas moléculas.



Hidrofobicidad		R ₁ (β)	R ₂ (α)	R ₃ (α)	R ₄ (β)	R ₅ (α)	R ₆
	UDCA	H	H	H	OH	H	COOH
	CA	H	H	OH	H	OH	COOH
	β-MCA	OH	H	H	OH	H	COOH
	α-MCA	OH	H	OH	H	H	COOH
	CDCA	H	H	OH	H	H	COOH
	DCA	H	H	H	H	OH	COOH
	THCA	H	H	OH	H	OH	CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH
	DHCA	H	H	OH	H	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH
	LCA	H	H	H	H	H	COOH

Figura 14. Estructura de los ácidos biliares (ABs). El ácido cólico (CA) y el ácido quenodesoxicólico (CDCA) son ABs primarios en humanos, mientras que el ácido desoxicólico (DCA) y el ácido litocólico (LCA) son ABs secundarios. Los ABs, 3α,7α,12α-trihidroxi-5β-colestanoico (THCA) y 3α,7α-dihidroxi-5β-colestanoico (DHCA) son intermediarios de la síntesis de CA y CDCA, respectivamente. El ácido ursodesoxicólico (UDCA) es un AB primario predominante en el oso, mientras que los ácidos α-, β-, γ- y ω-muricólicos (α-, β-, γ-, ω-MCA) son ABs primarios en ratón. Los grupos hidroxilo en orientación α se localizan por debajo del núcleo esteroide y son axiales con respecto al plano de este. Los grupos hidroxilo en orientación β se localizan por encima del núcleo esteroide y son ecuatoriales al mismo. Los ABs se han ordenado en la tabla de menor a mayor hidrofobicidad, de acuerdo con las predicciones de coeficiente de reparto de octanol/agua del software ChemDraw y bibliografía (Szekeres *et al.*, 2014; Suga *et al.*, 2017).

En contraposición con los ABs C24, en otras especies como aves, peces, anfibios y reptiles, hay un predominio de ABs en los que se preserve el esqueleto esteroide de 27

átomos de carbono (C27) del colesterol (Hofmann *et al.*, 2010). En la mayoría de los mamíferos la cadena lateral sufre un acortamiento de 8 a 5 carbonos durante el proceso de síntesis. No obstante, existe cierta heterogeneidad incluso entre los mamíferos: caballos y cebras producen ABs C27; los osos producen mayoritariamente ácido ursodesoxicólico (UDCA); los ratones sintetizan además de CA y CDCA ácidos muricólicos; y la bilis de rinocerontes, elefantes y manatíes presenta alcoholes biliares C27 en lugar de ABs C24 (Sharma *et al.*, 2018).

Por tanto, el número de grupos hidroxilo, de dobles enlaces, la conversión de los grupos carboxilo en alcoholes y la longitud de la cadena lateral determinan las características fisicoquímicas de la molécula de AB, como el valor de pKa, la hidrofobicidad y su capacidad detergente, así como su papel fisiológico y su toxicidad (Hofmann *et al.*, 1984). La mayoría de ABs primarios se conjugan con glicina o taurina y forman sales biliares a pH fisiológico, aumentando su hidrofiliidad y solubilidad (Chiang, 2013).

2.2.4. Funciones de los ácidos biliares

Los papeles fisiológicos que desempeñan los ABs son muy diversos (Marin *et al.*, 2015). En el hígado, su secreción genera el flujo biliar dependiente de los ABs por su efecto osmótico en la luz canalicular. Además, estimulan la contracción canalicular, que colabora en el bombeo de la bilis hacia los conductos colectores del sistema biliar, inducen la secreción de lípidos biliares, principalmente fosfolípidos y colesterol, y modulan la biosíntesis de colesterol, ya que un aumento de la síntesis de estas moléculas origina un aumento de la utilización de colesterol como molécula precursora. El flujo de ABs a través del hepatocito también determina la cantidad de los receptores de membrana para las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

En la bilis, los ABs forman micelas que transportan sustancias hidrofóbicas, como el colesterol y las protoporfirinas, y actúan como tampones para el Ca^{2+} . A nivel intestinal, estas micelas permiten emulsionar las grasas y vitaminas liposolubles (A, D, E y K) de la dieta para su absorción. También activan lipasas intestinales, modulan la actividad de proteasas, la motilidad intestinal, la colonización bacteriana, la secreción de hormonas gastrointestinales como la colecistoquinina e inducen la secreción de agua y electrolitos (Izokura *et al.*, 1991).

Finalmente, los ABs juegan un papel importante como moléculas de señalización celular, como ligandos del receptor de AB acoplado a proteína G (TGR5, *G-protein-Coupled Bile Acid Receptor*) (Kawamata *et al.*, 2003) y de los receptores nucleares FXR (*Farnesoid X Receptor*) (Makishima *et al.*, 1999; Parks *et al.*, 1999), PXR (*Pregnane X Receptor*) (Xie *et al.*, 2001) y el receptor de vitamina D (VDR, *Vitamin D Receptor*) (Makishima *et al.*, 2002), participando de esta manera en el control de la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en su síntesis, metabolismo y transporte (apartado 1.2.6). Además, los ABs son factores integradores del metabolismo que participan en el control de la utilización de las grasas, los azúcares y el metabolismo energético (Lefebvre *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009) y son capaces de activar la proliferación de las células estelares hepáticas (Sommerfeld *et al.*, 2009) y la respuesta inflamatoria mediada por la actuación de las células de Kupffer (Miyake *et al.*, 2000).

2.2.5. Circulación enterohepática

La eficiente reabsorción de ABs en el íleon resulta en una acumulación de ABs en el organismo (3-5 g), a la que se conoce como *pool* de ABs, que circula entre el intestino y el hígado en la denominada circulación enterohepática (Hofmann, 1976; Hofmann, 1977). La conservación del *pool* de ABs dentro de la circulación enterohepática requiere la acción coordinada de varias proteínas transportadoras, expresadas en las membranas canalicular y basolateral de los hepatocitos y en las membranas apical y basal de los ileocitos. Este sistema es altamente eficiente, ya que a diario se pierden solamente unos 50-500 mg de ABs, es decir, menos del 5% del *pool* total, a pesar de que el ciclo se lleva a cabo unas 6-10 veces al día (3-4 veces por comida).

Los ABs recién sintetizados y los que retornan desde el intestino durante el transcurso de la circulación enterohepática son secretados activamente por los hepatocitos hacia el lumen canalicular por acción de la bomba exportadora de sales biliares (BSEP, *Bile Salt Export Pump*) (Trauner *et al.*, 2003). La secreción activa de ABs proporciona una importante fuerza impulsora para la formación de bilis y, por tanto, es crucial para la eliminación hepática de compuestos endógenos potencialmente tóxicos y xenobióticos a través de la vía hepatobiliar. Además, la secreción de ABs impulsa la secreción de fosfolípidos y colesterol a la bilis, que también depende de la actividad de bombas transportadoras: la proteína de resistencia a múltiples fármacos 3 (MDR3, *Multidrug-Resistance Protein 3*) en el caso de los fosfolípidos, y el heterodímero ABCG5/ABCG8,

para el transporte de colesterol (Elferink *et al.*, 2002). La secreción conjunta de ABs, fosfolípidos y colesterol permite la formación de micelas mixtas en la bilis, que son determinantes para la protección del sistema biliar de las acciones detergentes provocadas por las altas concentraciones de ABs (Smit *et al.*, 1993). La bilis primaria, que contiene ABs y lípidos en el rango milimolar de concentración, es almacenada en la vesícula biliar, donde se concentra por absorción de agua, y es descargada dentro del lumen intestinal tras la ingestión de una comida rica en grasa mediante la contracción de la vesícula biliar inducida por la colecistoquinina.

En el lumen del intestino delgado, los ABs actúan como detergentes para solubilizar y facilitar la absorción de grasas y vitaminas liposolubles de la dieta (Hofmann *et al.*, 2008). Debido a su valor de pKa relativamente bajo, la absorción pasiva de los ABs conjugados es mínima y sus concentraciones intraluminales permanecen elevadas a lo largo del intestino delgado. Los ABs son reabsorbidos de forma activa por acción de sistemas transportadores específicos en el íleon terminal, como el cotransportador apical de ABs dependiente de sodio (ASBT, *Apical Sodium-Bile Acid Transporter*) y el transportador pasivo de solutos orgánicos heterodimérico OST α /OST β (*Organic Solute Transporters α/β*), localizado en la membrana basolateral en contacto con la sangre (Dawson *et al.*, 2015). El transporte transcelular entre las dos membranas del ileocito es llevado a cabo por la proteína citosólica intestinal de unión a ABs (IBABP, *Ileal Bile Acid-Binding Protein*) (Gong *et al.*, 1994). Los ABs que escapan a la reabsorción y entran en el colon pueden ser convertidos en ABs secundarios, que gracias a su creciente hidrofobicidad y pKa pueden ser absorbidos pasivamente para entrar en el *pool* de ABs o ser eliminados a través de las heces. La mezcla de ABs primarios y secundarios que se reabsorbe en el intestino regresa al hígado a través del sistema portal. Después, los ABs son tomados de la sangre portal por los hepatocitos a través del polipéptido cotransportador de ácido taurocólico y Na⁺ (NTCP, *Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide*), que tiene una especificidad de sustrato limitada a los ABs conjugados (Hagenbuch *et al.*, 2004a), o por sistemas independientes de Na⁺, representados por miembros de la familia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP, *Organic Anion-Transporting Polypeptide*) (Hagenbuch *et al.*, 2004b). Tras su captación y, si se requiere, reconjugación, los ABs deben ser transportados al polo canalicular de los hepatocitos para ser secretados de nuevo a la bilis, lo que completa su circulación enterohepática.

2.2.6. Regulación del metabolismo de los ácidos biliares

La conversión del colesterol en 7-hidroxicolesterol, primer paso de la ruta clásica de síntesis de ABs (apartado 1.2.1), es considerada la reacción limitante de esta ruta biosintética. Por ello, la regulación de la síntesis de ABs se ha equiparado tradicionalmente a la regulación de la enzima que cataliza este primer paso, CYP7A1. Así, los mecanismos de control transcripcional de CYP7A1 se han estudiado extensamente, si bien su regulación post-transcripcional está pobremente caracterizada. A continuación, se describirán los principales procesos implicados, algunos de los cuales también participan en el control del transporte y circulación de los ABs.

2.2.6.1. El receptor nuclear FXR

Los ABs son capaces de regular su propia síntesis mediante retroalimentación negativa. Este proceso está mediado principalmente por el receptor nuclear FXR (Willson *et al.*, 2001). Los ABs son agonistas de FXR con habilidad diferencial según las especies moleculares (CDCA>LCA>DCA>CA). Al unirse a este receptor nuclear los ABs son capaces de activarlo y reclutar coactivadores que desplazan a los correpresores, induciendo la expresión de aquellos genes que presentan en su promotor las secuencias o elementos de respuesta a FXR. Algunos, sin embargo, son reprimidos en respuesta a la activación de FXR. Es el caso de *CYP7A1* cuya inhibición se da por mecanismos indirectos (Figura I5):

- Ruta FXR/SHP/FTF: cuando FXR es activado, dimeriza con RXR α (*Retinoid X Receptor α*) y se une al promotor del gen *NR0B2*, aumentando la transcripción del receptor nuclear huérfano SHP (*Small Heterodimer Partner*). SHP forma un heterodímero con el factor de transcripción de α -fetoproteína (FTF, *α -Fetoprotein Transcription Factor*) que es capaz de inhibir la transactivación del promotor de *CYP7A1* mediada por el receptor nuclear LXR α (*Liver X Receptor α*) en humanos o LRH-1 (*Liver Related Homologue-1*) en ratones, resultando en la inhibición de su transcripción (Goodwin *et al.*, 2000). Paralelamente, SHP puede interactuar con el factor nuclear de hepatocitos 4 α (HNF4 α , *Hepatocyte Nuclear Factor α*), bloqueando su interacción con el coactivador PGC-1 α (*Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Coactivator 1 α*) y provocando la inhibición de la expresión tanto de *CYP7A1* como de *CYP8B1* (Zhang *et al.*, 2001; del Castillo-Olivares *et al.*, 2004).

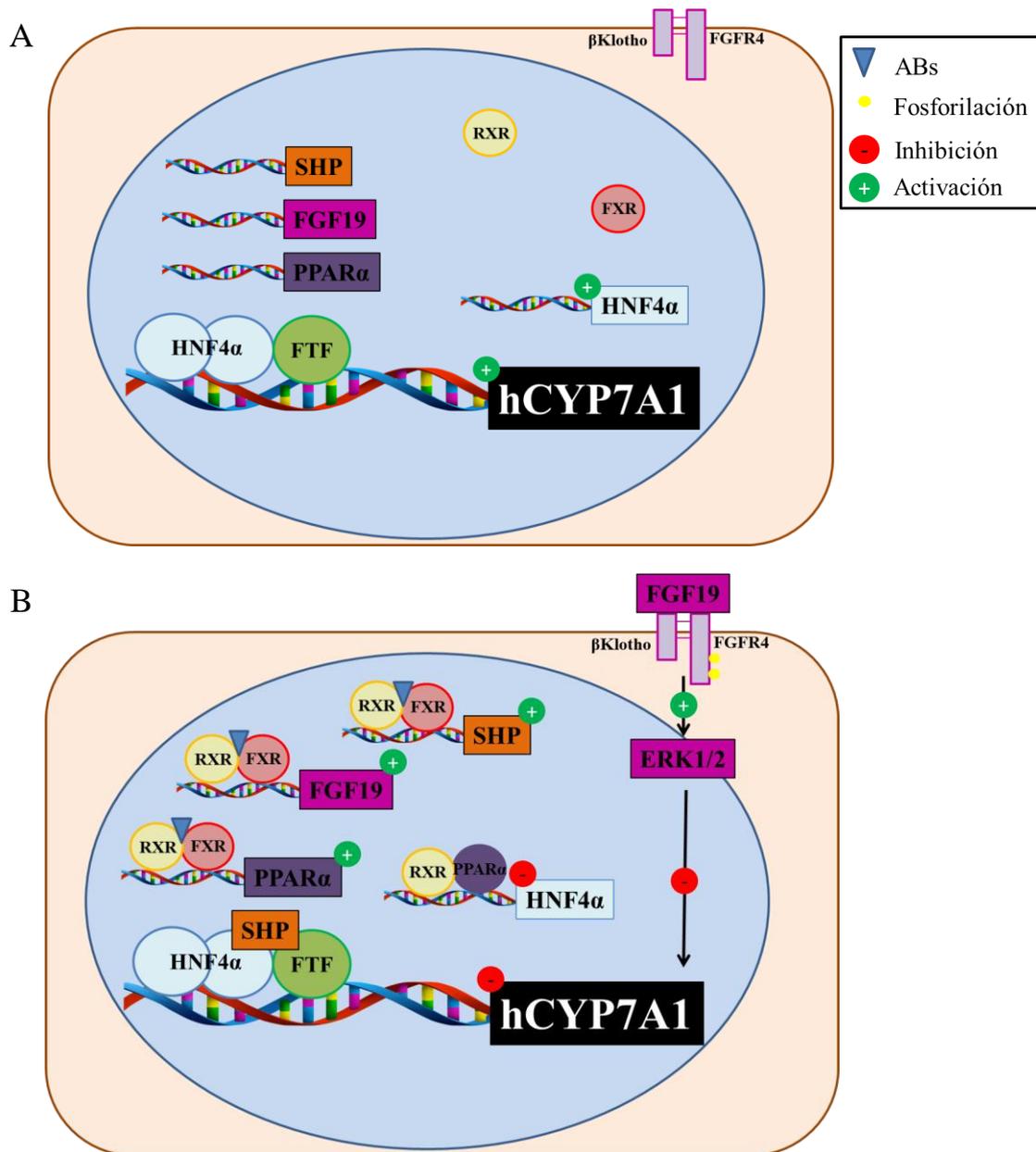


Figura 15: Representación esquemática de las tres rutas de inhibición indirecta de la transcripción de *CYP7A1* humana por el receptor nuclear FXR. Cuando los niveles de ácidos biliares (ABs) son bajos, la transcripción de *CYP7A1* se encuentra activada (A). En cambio, altos niveles de ABs activan FXR, que dimeriza con RXR uniéndose a las regiones de reconocimiento de los promotores de SHP, FGF19 y PPAR α . SHP se une a los factores de transcripción del promotor de *CYP7A1*, PPAR α inhibe la expresión de estos factores y FGF19 se une a su receptor *FGFR4*, activando la ruta de señalización de ERK1/2. Todos estos procesos resultan en una inhibición de la expresión de *CYP7A1* (B).

- Ruta FXR/FGF19/FGFR4: los agonistas de FXR son capaces de inducir la secreción de una hormona intestinal, el factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19, *Fibroblast Growth Factor 19*), cuyo ortólogo en ratones es Fgf15 que, al unirse a su receptor FGFR4 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 4*) e interactuar con β -klotho, activa una cascada de señalización mediada por la ruta de MAPK/ERK1/2 (*Mitogen-activated Protein Kinases/Extracellular*

Signal-Regulated Kinases) en los hepatocitos humanos (Song *et al.*, 2009). Esta vía, a través de un efector final desconocido, inhibe la expresión de *CYP7A1* (Holt *et al.*, 2003). Recientemente se ha descrito, en roedores, que algunos ABs conjugados (TCA, TDCA, TUDCA, GCA y GDCA) pueden actuar como agonistas del receptor de esfingosina-1-fosfato 2, activando la ruta de señalización de Erk1/2 (Nagahashi *et al.*, 2015). Además, en hepatocitos humanos en cultivo primario, se ha demostrado que los ABs inducen la síntesis y secreción de FGF19, paralela a la activación de FGFR4, observándose también una disminución de la expresión de *CYP7A1*, poniendo de manifiesto la existencia de un mecanismo autocrino o paracrino de regulación por FGF19 en el hígado.

- Ruta FXR/PPAR α : Los ABs, a través de la activación de FXR (Pineda Torra *et al.*, 2003), son capaces de inducir la transcripción de PPAR α (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α*) el cual, mediante una disminución de la expresión de HNF4 α (Marrapodi *et al.*, 2000), inhibe la transcripción de *CYP7A1*. También se ha descrito que PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ*) participa en la regulación de la expresión de *CYP27A1* en los macrófagos (Quinn *et al.*, 2005).

Por otro lado, FXR juega un papel muy importante en la regulación de la circulación enterohepática (apartado 1.2.5). FXR induce la expresión hepática de BSEP en la membrana canalicular (Ananthanarayanan *et al.*, 2001), de OST α /OST β en la membrana sinusoidal (Boyer *et al.*, 2006) e inhibe la expresión de NTCP de forma dependiente de SHP (Denson *et al.*, 2001). Además, se ha descrito que FXR induce la expresión de Asbt en ratones, aunque esto no ocurre en humanos (Li *et al.*, 2005a).

2.2.6.2. Otros receptores nucleares

Existen varios mecanismos independientes de FXR por los cuales los ABs pueden inhibir la expresión de *CYP7A1* (Figura I6). El AB secundario LCA es agonista de otros receptores nucleares: PXR y VDR. Ambos son capaces de unirse a una secuencia de respuesta a ABs (BARE-I) en el promotor de *CYP7A1* humano. PXR interacciona con HNF4 α , inhibiendo el reclutamiento de PGC-1 α en el promotor de *CYP7A1* (Li *et al.*, 2005b). En el caso de VDR, se han descrito varios mecanismos de inhibición de la expresión de *CYP7A1*: puede interactuar con HNF4 α , como en el caso de PXR,

compitiendo con él tanto por la unión a la secuencia de reconocimiento como por los coactivadores, como por ejemplo PGC-1 α , del que evita su reclutamiento. VDR puede además reclutar correpresores en el promotor de *CYP7A1*, y puede activar la ruta de ERK1/2, lo que inhibiría la transcripción de *CYP7A1* (Han *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha propuesto que VDR es capaz de inhibir la expresión de SHP, provocando un aumento de la expresión de *CYP7A1* (Chow *et al.*, 2014). Además, existen varios receptores nucleares cuyos agonistas no son los ABs y que también se han asociado con la regulación de la expresión de *CYP7A1*. En el promotor de todos los ortólogos del gen *CYP7A1* existe una secuencia DR4 de reconocimiento del receptor nuclear LXR, cuyos agonistas son oxisteroles, los cuales al activar LXR α son capaces de activar la transcripción de *CYP7A1*, que los utiliza como sustrato (Janowski *et al.*, 1996; Lehmann *et al.*, 1997). Sin embargo, el promotor del gen *CYP7A1* humano carece de esta secuencia consenso DR4, por lo que no responde a la activación por LXR α (Chiang *et al.*, 2001).

Por otro lado, el promotor murino de *Cyp7a1* presenta dos regiones PPRE de reconocimiento de Ppara (*site I* y *site II*), por lo que es capaz de responder también a los niveles de ácidos grasos, agonistas de este receptor nuclear (Cheema *et al.*, 2000). No obstante, una de estas regiones de respuesta a Ppara (*site I*) está solapada con la región de respuesta a Lxr α , de forma que ambos receptores nucleares pueden formar un heterodímero que antagoniza el efecto estimulador de la expresión de *Cyp7a1* que tendrían por separado (Gbaguidi *et al.*, 2004). El promotor del gen *CYP7A1* humano carece de una de las secuencias consenso de respuesta a PPAR α (*site I*), por lo que existe controversia en cuanto al papel de PPAR α en el control transcripcional de *CYP7A1*: algunos autores describen una estimulación de la actividad transcripcional de *CYP7A1* poco significativa tras la unión de PPAR α a la región *site II* (Cheema *et al.*, 2000) y demuestran que en humanos también puede formarse el heterodímero LXR α :PPAR α , uniéndose al sitio de reconocimiento parcial que ambos comparten (*site I*), aunque con menor afinidad que en el promotor de ratón (Gbaguidi *et al.*, 2004); por el contrario, otros concluyen que la activación de PPAR α no resulta en su unión a la región *site II*, y que en cambio provoca una inhibición de la expresión de *CYP7A1* por mecanismos indirectos (Marrapodi *et al.*, 2000), como se ha descrito en el apartado 1.2.6.1.

Finalmente, se ha descrito que el receptor constitutivo de androstano (CAR, *Constitutive Androstane Receptor*) puede unirse a una secuencia del promotor de *CYP7A1* y competir con HNF4 α por los co-activadores PGC-1 α y GRIP-1 (*Glucocorticoid Receptor Interacting Protein-1*), dando lugar a la inhibición de la transcripción de *CYP7A1* (Miao *et al.*, 2006) (Figura I6).

2.2.6.3. Mecanismos independientes de receptores nucleares

Además de los elementos de respuesta a receptores nucleares, a través de los cuales los productos y sustratos de la ruta pueden regular la actividad de *CYP7A1*, existen mecanismos generales de regulación que también controlan la expresión de esta enzima, como los mediados por p53 (Maeda *et al.*, 2002), encargada del control del ciclo celular, o Rev-erba (Duez *et al.*, 2008), que participa en los ritmos circadianos.

La insulina y el glucagón regulan la glucemia, pero también son integradores metabólicos que controlan multitud de procesos. Así, concentraciones fisiológicas de insulina inhiben FoxO1 (*Forkhead Box O1*), que funciona como un represor de HNF4 α y PGC-1 α , y por lo tanto aumenta la tasa transcripcional de *CYP7A1*, mientras que dosis altas de insulina activan el factor de transcripción SREBP-1c (*Steroid Response Element Binding Protein-1c*), que inhibe la transactivación del promotor de *CYP7A1* por HNF4 α (Li *et al.*, 2006b). Por el contrario, el glucagón y el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) inhiben la expresión de *CYP7A1* a través de la activación de la proteína quinasa A (PKA), que fosforila HNF4 α evitando su unión al ADN (Song *et al.*, 2006). Además, los ABs participan en la regulación del metabolismo de la glucosa a través de TGR5 (Thomas *et al.*, 2008) (Figura I6).

Por otra parte, los ABs más hidrofóbicos son potentes agentes inflamatorios que si se acumulan pueden dañar el hígado, el intestino y otros tejidos. TGR5 es un receptor de membrana altamente expresado en monocitos y macrófagos, como las células de Kupffer. Su activación por ABs (TLCA>LCA>DCA>CDCA>CA) resulta en un aumento intracelular de AMPC, que provoca en los macrófagos una disminución de su actividad fagocítica y de la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*) y distintas interleucinas (IL1 β , IL6 e IL8) (Kawamata *et al.*, 2003).

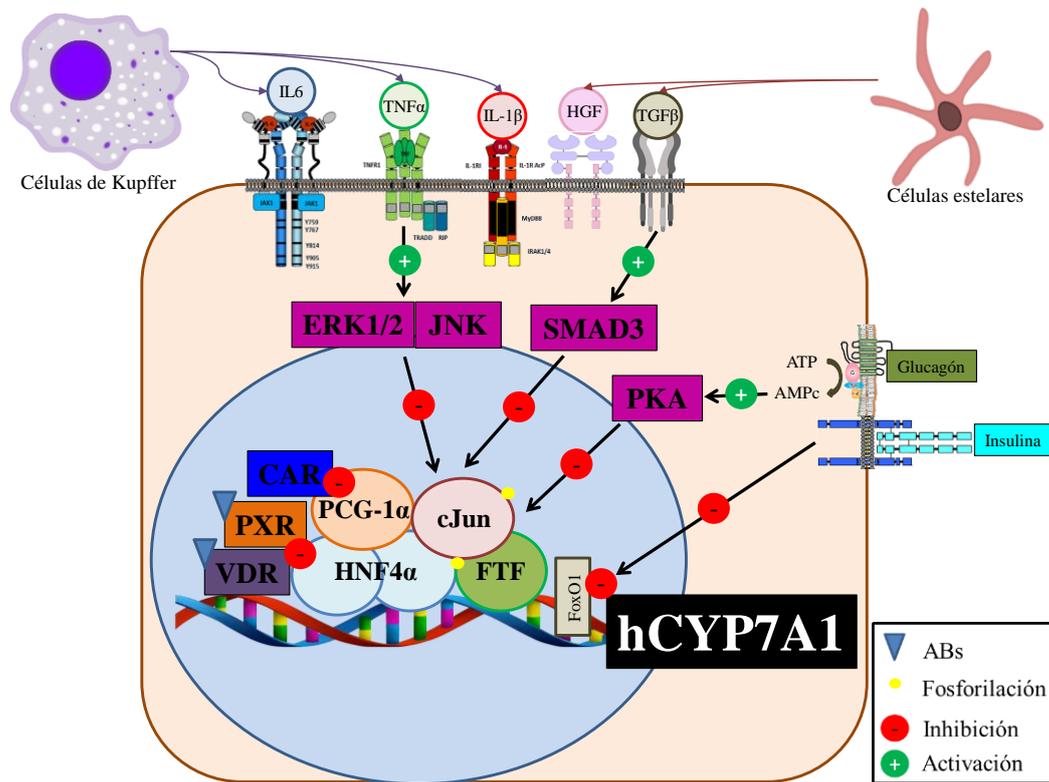


Figura I6: Representación esquemática de los mecanismos de regulación de la transcripción de *CYP7A1* humana, independientes del receptor nuclear FXR. Diferentes citoquinas y factores ($\text{TNF}\alpha$; interleucinas IL6 e IL1 β ; HGF; TGF β) secretados por las células de Kupffer y las células estelares hepáticas pueden ser reconocidas por receptores de membrana, activando cascadas de señalización que resultan en la inhibición de la transcripción de *CYP7A1*. Los receptores nucleares PXR y VDR pueden ser activados por los ácidos biliares (ABs), inhibiendo la interacción de los factores de transcripción con el promotor de *CYP7A1*. Este mismo mecanismo es el que sigue el receptor nuclear CAR para inhibir la expresión de *CYP7A1*. En condiciones fisiológicas, el glucagón, mediante la unión a su receptor y la activación de la proteína quinasa A (PKA), reduce la expresión de *CYP7A1*, mientras que la insulina inhibe FoxO1, activando la expresión de *CYP7A1*.

Las citoquinas son además capaces de regular la expresión de *CYP7A1*. El $\text{TNF}\alpha$ y la IL1 β son capaces de activar sus receptores de membrana en los hepatocitos, activando las cascadas de señalización MAPK/JNK (*Mitogen-Activated Protein Kinases/c-Jun N-terminal Kinases*). JNK fosforila los factores de transcripción cJun y HNF4 α , provocando la inhibición de la transcripción de *CYP7A1* (Li *et al.*, 2006a). Otra citoquina, HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), producida por las células estelares hepáticas, es capaz de inducir SHP y cJun, así como las rutas de ERK1/2 y JNK, inhibiendo rápidamente la transcripción de *CYP7A1* (Song *et al.*, 2007). En esta interacción entre los distintos tipos celulares hepáticos, también TGF β -1 (*Transforming Growth Factor β 1*) juega un papel importante. Es secretado por las células de Kupffer y activa su receptor en las células estelares, que secretan aún más TGF β -1 uniéndose a su receptor y activando la ruta de SMAD3 en los hepatocitos, que en última instancia

también resulta en una inhibición de la transcripción de *CYP7A1* (Li *et al.*, 2007) (Figura I6).

Todos estos sistemas de regulación son fundamentales para entender el papel de los ABs en la fisiopatología hepática.

2.3. MECANISMOS DE DAÑO INDUCIDO POR ÁCIDOS BILIARES

Debido a sus propiedades químicas (apartado 1.2.3), la acumulación intrahepática de ABs puede provocar graves daños a nivel celular y orgánico. Además, debido a sus funciones como moléculas señalizadoras (apartado 1.2.4), participan en los procesos inflamatorios (Li *et al.*, 2017). Como se comentará a continuación, algunos ABs son capaces de generar estrés oxidativo (Perez *et al.*, 2009) y estrés de retículo endoplásmico (Adachi *et al.*, 2014) y, a través de estos y otros mecanismos, activar los procesos de muerte celular (Fickert *et al.*, 2017). Estos eventos son responsables, en muchos casos, de la implicación de los ABs en distintas patologías (apartado 1.4).

2.3.1. Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas que contienen algún átomo de oxígeno en su estructura. Muchas de ellas son radicales libres, con electrones desapareados en su orbital más externo, por lo que son moléculas inestables y muy reactivas que tienden a donar o recibir electrones para estabilizarse. Las ROS se generan en la célula como resultado de la reducción parcial del oxígeno, el principal aceptor de electrones en las reacciones del metabolismo aeróbico. La mitocondria es considerada la principal fuente de ROS, ya que es donde se localiza la cadena transportadora de electrones (Bartosz, 2009), aunque las ROS también pueden generarse en otros orgánulos, como el retículo endoplásmico, los lisosomas y los peroxisomas (Nauseef, 2008). Así, las principales ROS producidas a nivel celular son el radical superóxido (O_2^-), que a su vez puede reaccionar con el óxido nítrico (NO), generando especies reactivas de nitrógeno (RNOS), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se genera principalmente en los peroxisomas, y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), que es el agente biológico oxidante más potente que se conoce y que se produce a partir del H_2O_2 .

A bajas concentraciones, las ROS juegan un papel fundamental en procesos de señalización celular y de regulación de la expresión génica (Bartosz, 2009). Para poder mantener los niveles de ROS dentro de los parámetros fisiológicos, las células cuentan

con un gran número de mecanismos de defensa antioxidante que limitan su acumulación, incluyendo moléculas de bajo peso molecular como el ácido ascórbico, la vitamina E o el glutatión reducido, y sistemas enzimáticos como tiorredoxina, la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Deavall *et al.*, 2012). Sin embargo, en respuesta a determinados estímulos, como la exposición a compuestos tóxicos endógenos como los ABs (Perez *et al.*, 2009), o xenobióticos como el paracetamol (Cover *et al.*, 2005), la radiación, o como resultado de distintos procesos patológicos, puede producirse un incremento en la generación de ROS que supera la capacidad reguladora de los sistemas antioxidantes, dando lugar a una situación de estrés oxidativo. Este desequilibrio entre los sistemas prooxidantes y antioxidantes hace que se acumulen ROS que interactúan con distintos componentes celulares, como el ADN, las proteínas y los lípidos de las membranas celulares (Avery, 2011), dañándolos gravemente. Si la situación se prolonga en el tiempo, los daños acumulados conducen a la activación de la apoptosis y finalmente a la muerte celular (apartado 1.3.3).

2.3.2. Estrés de retículo endoplásmico

Los hepatocitos poseen un retículo endoplásmico muy desarrollado, ya que el desempeño de sus funciones implica la síntesis de multitud de proteínas. Por ello, la respuesta al estrés de retículo endoplásmico (ERS) es un mecanismo importante en la fisiopatología hepática. La *Unfolded Protein Response* (UPR) es una ruta de señalización activada por la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, dirigida a regular y recuperar la homeostasis proteica en la célula. En estos casos, la función de la UPR es aumentar la síntesis de chaperonas que ayuden al plegamiento de las proteínas, potenciar el sistema de degradación ERAD (*ER-Associated Protein Degradation*) y la autofagia (apartado 1.3.3), y disminuir la tasa transcripcional para evitar la síntesis de más polipéptidos (Ron *et al.*, 2007). No obstante, la UPR puede activarse tanto por aumento de la carga de proteínas, como por la depleción de las reservas de Ca^{2+} o por la disminución de los niveles de glucosa, y se ha descrito que los ABs son capaces de activar esta ruta (Adachi *et al.*, 2014). Además, cuando el ERS se mantiene a lo largo del tiempo, puede dar lugar a una cascada de eventos que conducen a la muerte celular, como la acumulación intracelular de lípidos, la activación de la apoptosis o la formación del inflamosoma (Rao *et al.*, 2004) (apartado 1.3.3).

Cuando se produce ERS, se activan tres sensores transmembrana embebidos en el retículo endoplásmico por la rotura de su unión con la chaperona GRP78/BIP (*Glucose-Regulated Protein 78*) (Bertolotti *et al.*, 2000). La liberación de los tres sensores da lugar a la activación de los tres “brazos” de la UPR (Figura I7):

- *Activating Transcription Factor-6* (ATF6): tras su liberación, se transloca al aparato de Golgi, donde se genera el factor de transcripción activo por escisión proteolítica. ATF6 activa la transcripción de genes cuyo promotor presenta elementos de respuesta al ERS (ERSE), como chaperonas (GRP78) y proteínas del ERAD como EDEM (*Mannosidase Like Protein*). Induce además la expresión de CHOP (*C/EBP Homologous Protein*) tras su unión a elementos de respuesta a AMPc (CRE) (Shen *et al.*, 2002).
- *Inositol-Requiring Enzyme-1 α* (IRE1 α): tras su liberación, se agrupa y activa por autofosforilación. Es una endorribonucleasa que activa XBP1 (*X-box Binding Protein 1*) mediante *splicing* atípico de su ARNm. A partir del ARNm generado (XBP1-S) se traduce un factor de transcripción que se une a elementos ERSE (Kaplowitz *et al.*, 2006).
- *Protein Kinase Double-stranded RNA-dependent-like ER Kinase* (PERK): al liberarse de GRP78, se agrupa y activa por autofosforilación, activando eIF2 α (*Eukaryotic Translation Initiation Factor-2 α subunit*). Este factor provoca una inhibición global de la síntesis de proteínas, si bien aumenta específicamente la transcripción de ATF4 (*Activating Transcription Factor-4*), que es capaz de unirse a los elementos de respuesta CRE (DuRose *et al.*, 2009).

Cuando la activación de estos mecanismos no consigue una disminución del ERS, se da una respuesta patológica. La sobreexpresión de CHOP favorece el estrés oxidativo y la inflamación y resulta en una activación de las rutas pro-apoptóticas por inhibición de la transcripción de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y activación de otras pro-apoptóticas como Bim (Urrea *et al.*, 2013) (apartado 1.3.3). Por otro lado, la sobreactivación de IRE1 α puede provocar un aumento de la autofagia, la resistencia a la insulina, la activación del inflamósoma, la apoptosis y piroptosis (Urano *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2003; Lerner *et al.*, 2012) (apartado 1.3.3). La disminución global de la transcripción mediada por PERK puede promover la inflamación mediante NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) (Deng *et al.*, 2004). En general, la inducción de muerte celular por ERS es el resultado de la interacción de múltiples vías de señalización. Actualmente, se trabaja

con el concepto de “UPRsoma”, por el cual los sensores descritos actúan como andamiaje donde se producen modificaciones postraduccionales y unen cofactores que regulan finamente e integran la información de las distintas vías para determinar el destino celular (Hetz *et al.*, 2018).

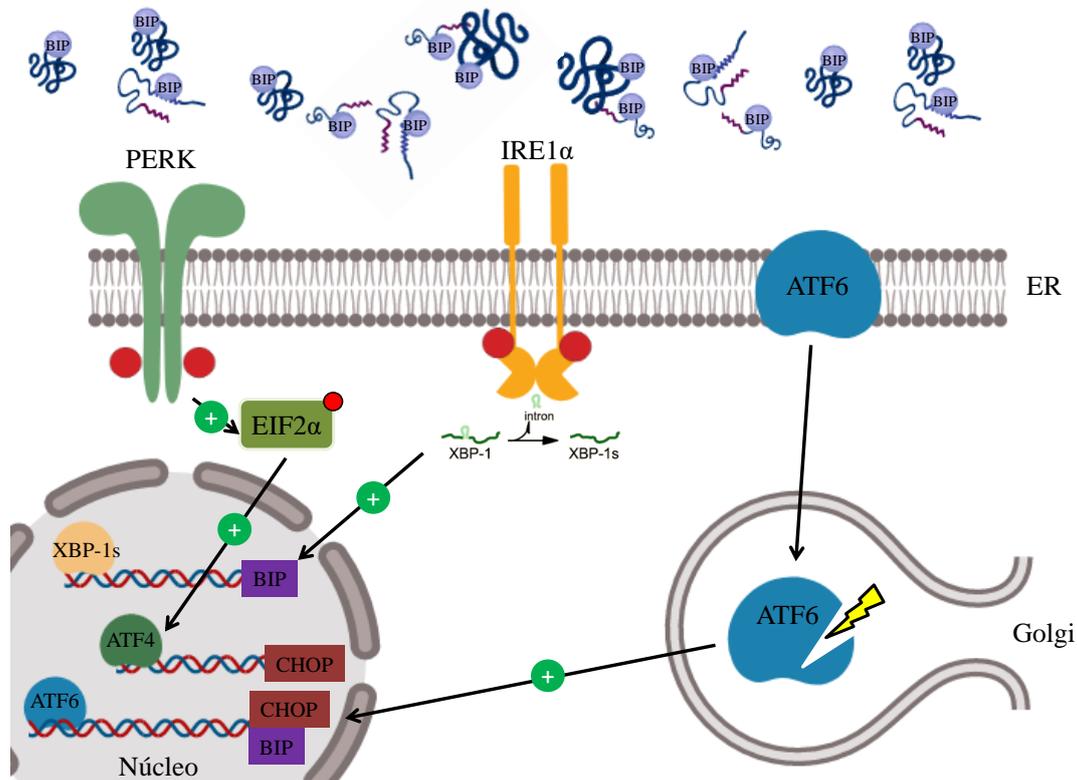


Figura 17: Representación de los primeros eventos tras la activación de la *Unfolded Protein Response* (UPR). Al aumentar la carga de proteínas en el retículo endoplásmico (ER), la chaperona GRP78/BIP se une a los polipéptidos, liberando los receptores anclados a la membrana ATF6, IRE1α y PERK. ATF6 se transloca al aparato de Golgi, sufriendo una escisión proteolítica que lo activa, permitiendo que aumente la transcripción de genes como BIP y CHOP, entre otros. IRE1α se autofosforila, activando su acción endorribonucleasa y permitiendo el *splicing* atípico de XBP1, dando lugar al factor de transcripción activo, que participa en la regulación de BIP, entre otros. PERK se activa mediante autofosforilación, lo que permite la activación por fosforilación de eIF2α, que en general disminuye la transcripción, pero aumenta específicamente la de ATF4.

2.3.3. Muerte celular

Como se ha comentado anteriormente, la activación del estrés oxidativo y del estrés de retículo por los ABs puede desembocar en la activación de distintas vías de muerte celular, que varían en sus características bioquímicas y morfológicas, pero que también determinan las posteriores consecuencias a nivel sistémico.

Entre los distintos mecanismos de muerte celular, la necrosis es el único proceso de muerte celular no regulado e independiente de energía en el que la célula es una víctima pasiva. Morfológicamente se caracteriza por una fragmentación del núcleo y lisis celular, que libera al espacio extracelular todo su contenido, actuando como señal quimiotáctica para la activación de los macrófagos y las células dendríticas del tejido (Elmore, 2007).

En contraposición, la apoptosis es un mecanismo de muerte celular programado, en el que la célula integra señales extracelulares e intracelulares y activa una cascada de señalización compleja, dependiente de energía, que resulta en la transformación de la célula en cuerpos apoptóticos que pueden ser rápidamente fagocitados por los macrófagos del tejido. Esto hace que se considere a la apoptosis una muerte “limpia”, sin apenas activación de la respuesta inmune. Así, morfológicamente se distingue de la necrosis por la reducción paulatina del tamaño celular, por el mantenimiento de la integridad de las membranas y por un desmantelamiento ordenado de todas las estructuras celulares (reordenación de orgánulos, condensación de la cromatina y posterior fragmentación del ADN, *blebbing* de la membrana celular...). Además, bioquímicamente la apoptosis depende de la activación de unas cisteína proteasas denominadas caspasas. Clásicamente, se han descrito dos vías típicas de iniciación de la apoptosis:

- Ruta extrínseca: depende de la activación de los receptores de muerte. La activación de estos receptores por sus ligandos provoca el reclutamiento de varias proteínas, lo que resulta en la autoactivación de la procaspasa 8. Los ABs pueden unirse a receptores de muerte celular Fas, activando esta ruta (Faubion *et al.*, 1999).
- Ruta intrínseca: en este caso, existen multitud de señales iniciadoras que no dependen de receptores específicos. En cualquier caso, todos estos estímulos resultan en cambios en la membrana mitocondrial interna, generándose un poro de permeabilidad transitoria en la membrana mitocondrial. Esto permite la liberación al citoplasma de distintos elementos que forman el “apoptosoma”, lo que resultará en la activación de la procaspasa 9. Los ABs, a través de la generación de ROS (apartado 1.3.1), son capaces de activar esta ruta.

En este punto, ambas rutas pueden potenciarse o inhibirse por diferentes mecanismos. El más estudiado implica a la familia de proteínas BCL-2, que engloba más de 25 genes

que codifican para proteínas pro-apópticas (como Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, y Bik) y anti-apópticas (como Bcl-2, Bcl-x y Bcl-XL). Si las señales iniciadoras progresan, ambas rutas convergen en las vías de ejecución, en las cuales las caspasas iniciadoras (8 y 9) activan las caspasas ejecutoras (3, 6 y 7), responsables de los cambios morfológicos descritos (Elmore, 2007).

Se han descrito otros mecanismos de muerte celular con características intermedias entre los dos anteriores. La necroptosis, aunque morfológicamente se parece a la necrosis, difiere sustancialmente de ella en que es un mecanismo activo y regulado de muerte celular. Los estímulos que activan la ruta extrínseca de la apoptosis son capaces de activar los mecanismos de necroptosis si las caspasas se encuentran inactivadas, por ejemplo, por inhibidores virales de caspasas (Tait *et al.*, 2014). La muerte celular independiente de caspasas es inducida por aquellos factores proapoptóticos que provocan la formación de un poro de permeabilidad transitoria en la membrana mitocondrial y que, en presencia de caspasas, provocarían la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Tait *et al.*, 2014). Por último, la piroptosis es un tipo de muerte celular programada mediada por caspasas, como ocurre en el caso de la apoptosis, pero dependiente de inflamación. La piroptosis está mediada por la caspasa 5, que se activa por acción del “inflamósoma”. Además, esta caspasa participa en la activación de citoquinas proinflamatorias como IL1 β e IL18. Asimismo, es capaz de inducir la apertura de poros en la membrana plasmática, de manera que las células que sufren piroptosis se hinchan y mueren por lisis osmótica, como ocurre en los procesos necróticos (Tait *et al.*, 2014).

Por otro lado, la autofagia es un proceso altamente conservado, dependiente de lisosomas, en el que se produce la degradación y reciclaje de distintas estructuras, desde moléculas hasta orgánulos (Mizushima, 2011). Durante la autofagia, se generan unas vesículas denominadas autofagosomas, por elongación de pequeñas estructuras de membrana. Los autofagosomas maduros se fusionan con lisosomas, digiriendo el contenido y permitiendo el reciclaje de las macromoléculas para la formación de nuevas estructuras. La autofagia es frecuentemente considerada un mecanismo de supervivencia a estrés, que precede a los mecanismos de muerte celular, si bien existen algunas situaciones en las que se ha puesto de manifiesto que la autofagia puede mediar la muerte celular de forma independiente a otros procesos (Liu *et al.*, 2013).

2.4. PAPEL DE LOS ÁCIDOS BILIARES EN PATOLOGÍA HEPÁTICA

2.4.1. Colestasis y colelitiasis

La colestasis es una condición patológica caracterizada por una reducción o ausencia de la llegada de secreción biliar al duodeno, que puede deberse a defectos de los hepatocitos o colangiocitos (colestasis intrahepática) o a obstrucciones del flujo biliar a nivel de los conductos biliares (colestasis extrahepática) (Chiang, 2013). La principal consecuencia de la alteración del flujo biliar es la acumulación de constituyentes de la bilis potencialmente tóxicos, como los ABs, la cual conduce a un proceso de inflamación y fibrosis hepática que, si se prolonga en el tiempo, puede desembocar en cirrosis, cáncer y, en último término, fallo hepático.

La etiología de la colestasis y colelitiasis es diversa. La colestasis intrahepática puede deberse a defectos funcionales en el proceso de formación de la bilis, ya sea por defectos en la síntesis de ABs, defectos en las proteínas de transporte o alteraciones de los mecanismos de regulación de los mismos inducidos por fármacos, el embarazo o ciertas condiciones patológicas. En cuanto a la colestasis extrahepática, suele deberse a obstrucciones mecánicas debidas a cálculos biliares o a tumores locales. En la colelitiasis, la proporción de los distintos componentes de la bilis juega un papel muy importante. La correcta proporción de ABs, colesterol y fosfolípidos en bilis es crucial para mantener el colesterol en solución y prevenir la precipitación de cristales de este, el primer paso en la formación de cálculos biliares (Lo Sasso *et al.*, 2008; Portincasa *et al.*, 2009). Una proporción adecuada de ABs y fosfolípidos en la bilis protege frente a la aparición de cálculos, mientras que una concentración desproporcionadamente elevada de colesterol predispone a su formación (Chiang, 2013).

2.4.2. Esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD, *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) es actualmente la patología crónica hepática con mayor prevalencia. Asociado al llamado síndrome metabólico, el comienzo de esta patología es relativamente benigno y reversible, caracterizado por la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos o esteatosis hepática (NAFL, *Nonalcoholic Fatty Liver*). Sin embargo, la NAFL puede progresar a esteatohepatitis (NASH, *Nonalcoholic Steatohepatitis*), que se caracteriza por la aparición de inflamación, fibrosis y *ballooning* de los hepatocitos. No existe tratamiento curativo para estos trastornos, que en un 21-28% de los casos se agrava aún

más hasta la aparición de cirrosis, pudiendo desencadenar en última instancia la aparición de hepatocarcinoma (Fotbolcu *et al.*, 2016).

En cuanto a su patogenia, durante mucho tiempo la hipótesis más aceptada ha sido la de “dos eventos” (*two hit*) (Day, 2002): la acumulación de grasa intrahepática (primer evento) provocaría un aumento del estrés oxidativo (segundo evento), que desencadenaría el resto de mecanismos fisiopatológicos. Si bien esta hipótesis sigue siendo válida, parece que existen más “eventos” que intervienen en el desarrollo de esta enfermedad. En este sentido, diversos estudios parecen indicar que existe un papel de los ABs en la etiopatogenia de la enfermedad. Así, se ha encontrado que en pacientes obesos con NAFLD, los niveles de ABs en suero se encuentran aumentados y que los ácidos grasos son capaces de inhibir la acción de SHP, produciéndose un aumento de la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de ABs (apartado 1.2.6.1) (Bechmann *et al.*, 2013). Por otro lado, la severidad de NASH se ha asociado con cambios específicos en la composición de los ABs en suero, encontrándose un aumento de las especies más hidrofílicas (CA y sus conjugados) tanto en suero como en el tejido hepático. Esto implica una menor activación del receptor nuclear FXR, lo que debido a su importancia en la regulación tanto de la síntesis como de la circulación enterohepática de los ABs (apartado 1.2.6.1), podría resultar en una acumulación intrahepática de ABs, contribuyendo a la patogenia de la NAFLD (Jahn *et al.*, 2018).

2.4.3. Daño hepático inducido por fármacos (DILI)

El daño hepático inducido por fármacos (DILI, *Drug Induced Liver Injury*), es un conjunto de respuestas hepáticas que ocurren tras la exposición a un compuesto químico, normalmente un fármaco. Actualmente, más de 350 fármacos se han asociado con el desarrollo de DILI (Kaliyaperumal *et al.*, 2018). El DILI más frecuente es asintomático y se caracteriza por una elevación moderada de las transaminasas séricas que se detectan en análisis rutinarios y que recupera la normalidad tras la retirada del fármaco. Sin embargo, el DILI se ha convertido en la primera causa de fallo hepático fulminante, definido como una disfunción hepática repentina y potencialmente mortal que cursa con coagulopatía y encefalopatía dentro de las 26 semanas posteriores al inicio de la enfermedad. Además, los fármacos pueden causar DILI de forma predecible y dosis-dependiente, conocido como DILI intrínseco, o de forma impredecible y no dependiente de la dosis, denominado DILI idiosincrásico (Fisher *et al.*, 2015).

La causa más común de DILI intrínseco es la intoxicación por paracetamol. Éste es metabolizado en el hepatocito, produciendo un metabolito altamente reactivo, la N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), que es reducida por el sistema del glutatión. No obstante, cuando se da una sobredosis de paracetamol y los sistemas antioxidantes celulares no son suficientes para reducir la NAPQI generada, esta se une a estructuras celulares, provocando su oxidación y resultando en una necrosis centrolobular. No obstante, la identificación de los mecanismos implicados hace que la intoxicación por paracetamol tenga un antídoto sencillo y efectivo: la acetilcisteína permite la regeneración de las reservas de glutatión, y con ello la destoxificación del NAPQI (Fisher *et al.*, 2015).

Por otro lado, la relativa predictibilidad que caracteriza el DILI intrínseco se encuentra totalmente ausente en el DILI idiosincrásico (iDILI), que se produce en un número reducido de pacientes que utilizan la misma dosis y durante el mismo tiempo que otros sujetos, sin que en estos últimos se dé una respuesta patológica. El uso de cientos de compuestos químicos con propiedades variables en combinación con factores interindividuales, tanto genéticos como de otra índole, como la edad o el sexo, es la causa de un amplio abanico de enfermedades integradas bajo el término de iDILI, lo que unido al bajo número de casos, ha dificultado enormemente el estudio de esta entidad nosológica. Se ha descrito una manifestación caracterizada por hipersensibilidad, que cursa con fiebre, erupción cutánea y granulomas y que se cree está mediada por el sistema inmune, si bien la mayoría de los casos se cree que son de naturaleza metabólica (Fisher *et al.*, 2015). Actualmente se siguen barajando varias hipótesis en torno a la etiopatogenia del iDILI, muchas de ellas centradas en la posible capacidad de ciertos fármacos en inducir una presentación antigénica y, por tanto, una respuesta inmune. Otras hipótesis se basan en la posible existencia de episodios inflamatorios moderados en el hígado que, en combinación con el tratamiento farmacológico, desencadenen el fallo hepático. También en la posibilidad de que los fármacos como el paracetamol generen hepatotoxicidad a las dosis habituales, que la mayoría de los individuos pueden compensar por los mecanismos de regeneración hepática (apartado 1.4.4), pero no aquellos susceptibles a iDILI. Finalmente, otros autores sugieren que los fármacos podrían interactuar a distintos niveles con las vías de señalización de supervivencia y apoptosis, otorgando un papel central a la

señalización por TNF α e IFN γ , lo que unificaría el resto de las hipótesis (Roth *et al.*, 2017).

En función del patrón bioquímico de daño hepático, el DILI se ha clasificado en DILI hepatocelular, colestático o mixto. Así, si el cálculo de la relación entre la elevación de los niveles séricos de alanina-aminotransferasa (ALT) y los de fosfatasa alcalina da un valor mayor que 5 se considera DILI hepatocelular, si es menor que 2 se considera DILI colestático y los valores intermedios definirían el DILI mixto. El análisis de la histología en biopsia hepática también se ha considerado un elemento importante para determinar la etiología del daño en iDILI (Fisher *et al.*, 2015).

Sin embargo, el diagnóstico de iDILI sigue siendo complejo, debido entre otros a la inespecificidad de los síntomas que pueden aparecer. Recientemente, se han desarrollado “sistemas de evaluación de la causalidad”, como el *Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) Scale*, en el que a partir de datos como la relación temporal entre la toma del fármaco y el desarrollo del daño hepático, exposición a otros fármacos, exclusión de etiologías alternativas, entre otros, se calcula una puntuación ponderada de la probabilidad de que el caso de estudio se trate efectivamente de un caso de iDILI (Kaliyaperumal *et al.*, 2018).

Por otro lado, en los últimos años se han desarrollado múltiples estudios farmacogenómicos que han permitido identificar factores genéticos que predisponen al iDILI. Entre ellos, destacan polimorfismos en los antígenos leucocitarios humanos, concentrados en la región de unión a proteínas, y que parecen estar implicados en el iDILI generado tras la exposición a más de 15 fármacos diferentes. Sin embargo, polimorfismos en las enzimas que participan en la detoxificación de fármacos, como las del citocromo P450 y las glucuronidasas, en proteínas de transporte, como MRP2, en citoquinas, como IL6, e incluso en receptores nucleares, como PPAR γ , se han asociado con iDILI provocado por distintos fármacos, entre ellos el diclofenaco (Daly *et al.*, 2009; Kaliyaperumal *et al.*, 2018).

2.4.4. Regeneración hepática

Una propiedad extraordinaria del hígado es la de su regeneración. En condiciones fisiológicas, el hígado es capaz de recuperar su tamaño, estructura y función tras un daño que puede ser de distinta etiología. Este proceso conlleva una serie de pasos bien

coordinados en los que primero se inducen factores pro-proliferativos que activan los hepatocitos quiescentes y los colangiocitos, que entran en ciclo celular, dividiéndose; las células de Kupffer, que secretan factores inflamatorios cuya señalización también induce la proliferación hepática; y las células estelares, que aumentan la síntesis de matriz extracelular. Todo ello resulta en la recuperación de la masa hepática perdida por el daño. El control de este circuito está mediado principalmente por citoquinas, factores de crecimiento y señales metabólicas (Bohm *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). Dentro de estas últimas, múltiples estudios han demostrado que los ABs son moléculas de señalización indispensables para el inicio del proceso regenerativo, a través de la activación de su receptor nuclear FXR tanto a nivel hepático como intestinal, otorgando también un papel relevante a la señalización por FGF19 (Ueda *et al.*, 2002; Columbano *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2006; Otao *et al.*, 2012).

No obstante, existen situaciones en las que los mecanismos regenerativos se encuentran sobrepasados, como en el fallo hepático fulminante o cuando existen daños crónicos graves en el hígado, tales como los generados por las infecciones con el virus de la hepatitis C, exceso de consumo de alcohol o la esteatosis hepática (apartado 1.4.2). En estos casos, los mediadores de los procesos regenerativos pueden desencadenar y agravar los procesos patológicos, aumentando la inflamación, la fibrosis y la progresión a cirrosis y carcinogénesis (Bataller *et al.*, 2005; Forbes *et al.*, 2016).

2.4.5. Enfermedades congénitas que alteran la homeostasis de los ácidos biliares

Entre el gran número de enfermedades congénitas que afectan al metabolismo de los ABs, se puede distinguir entre las enfermedades debidas a defectos en el transporte de los ABs maduros hacia los canalículos biliares y las enfermedades que afectan a su síntesis.

2.4.5.1. Defectos en el transporte de ácidos biliares

Los defectos en el transporte de los ABs se deben principalmente a la presencia de mutaciones que reducen la función de las proteínas que participan en su transporte a través de la membrana canalicular de los hepatocitos. En este sentido, existen dos grupos de enfermedades bien establecidas, caracterizadas por colestasis intrahepática que evoluciona rápidamente a cirrosis. Estas enfermedades hereditarias son raras y se han agrupado según su severidad en colestasis hepatocelular benigna (BRIC, *Benign*

Recurrent Intrahepatic Cholestasis) o grave (PFIC, *Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis*) (Jansen *et al.*, 2003). Ambas deficiencias se deben a mutaciones en los mismos genes, lo que da lugar a una subclasificación en tres grupos:

- PFIC tipo I (referencia 211600 de OMIM (OMIM®, 2019)): provocada por mutaciones en el gen *ATP8B1*, que codifica la ATPasa canalicular FIC1, responsable de mantener la distribución asimétrica de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y colesterol en la membrana canalicular, protegiéndola de los efectos detergentes de las altas concentraciones de sales biliares en el lumen canalicular. Esta enfermedad normalmente comienza con episodios que progresan a una colestasis crónica con fibrosis, cirrosis y fallo hepático en los primeros 20 años de vida. Los niños que sufren de PFIC tipo I presentan un retraso en el crecimiento, colestasis, prurito, diarrea y, ocasionalmente, pancreatitis. Los valores de γ -glutamil transpeptidasa (GGT) no suelen estar elevados, si bien los niveles de CDCA sí.
- PFIC tipo II (OMIM 601847): esta patología afecta a individuos con deficiencia de BSEP, lo que impide la salida a bilis de la mayoría de los ABs sintetizados en el hepatocito. Los primeros síntomas incluyen ictericia y la aparición de hepatitis de células gigantes. La enfermedad progresa rápidamente, requiriéndose el trasplante hepático antes de los 10 años. Los niveles de GGT se mantienen en valores normales, como en el caso anterior. La histología hepática de estos pacientes muestra una inflamación y fibrosis más severas que en el caso de PFIC tipo I.
- PFIC tipo III (OMIM 602347): se debe al déficit funcional de la proteína MDR3, implicada en el transporte de fosfolípidos a los canalículos biliares, Todo fosfatidil colina o lecitina. En contraposición con los dos tipos anteriores, las manifestaciones clínicas de PFCIII aparecen más tarde, la ictericia es menos evidente, los niveles de GGT en suero se encuentran aumentados y la histología hepática muestra proliferación de conductillos biliares y fibrosis.

También se han descrito alteraciones en la proteína MRP2, encargada de la secreción de ABs conjugados y bilirrubina, asociadas con el síndrome de Dubin-Johnson (OMIM 237500), una enfermedad caracterizada por hiperbilirrubinemia crónica, en la que los pacientes también tienen niveles séricos elevados de ABs y colestasis.

2.4.5.2. Deficiencias en la síntesis de ácidos biliares

Los defectos en la síntesis de ABs son enfermedades genéticas poco comunes y que afectan tanto a los procesos de modificación del núcleo esteroideo como a los de modificación de la cadena lateral y la amidación. Dentro de estas últimas destacan las enfermedades peroxisomales, provocadas por problemas en la biogénesis de los peroxisomas que suponen la ausencia o disminución del número de peroxisomas, o por defectos en enzimas específicas de las rutas biosintéticas que tienen lugar en este orgánulo (apartado 1.4.5.3).

En cuanto a los defectos congénitos que afectan a los primeros pasos de la síntesis de los ABs, implicados en la modificación del núcleo esteroide del colesterol, se han descrito deficiencias en las enzimas CYP7A1, HSD3B7, AKR1D1, CYP7B1 y CYP27A1.

La deficiencia de la enzima CYP7A1 no provoca una deficiencia total de ABs, ya que la ruta de síntesis alternativa puede seguir produciendo ABs primarios. Sin embargo, una característica común en estos pacientes es el desarrollo de hipercolesterolemia resistente al tratamiento con estatinas, con altos niveles de LDL. Además, algunos pacientes también presentan hipertrigliceridemia y un riesgo aumentando de sufrir cálculos biliares. Además, se cree que este defecto puede ser codominante, ya que los individuos heterocigotos presentan niveles elevados de colesterol y, por tanto, un mayor riesgo para el desarrollo de aterosclerosis o formación de cálculos biliares (Pullinger *et al.*, 2002). No obstante, en algunos sujetos portadores de mutaciones en *CYP7A1* se ha descrito el desarrollo de enfermedad hepática grave, caracterizada por colestasis, defectos en la síntesis de proteínas y otros metabolitos, hepatitis, fibrosis e incluso cirrosis con niveles normales de GGT (Setchell *et al.*, 1998; Ueki *et al.*, 2008). Estos pacientes fallecieron durante la infancia, mientras que otros con cuadros clínicos similares pudieron ser tratados con éxito mediante trasplante (Mizuochi *et al.*, 2011) y terapia de reemplazo con CDCA (Dai *et al.*, 2014).

La deficiencia en HSD3B7 (OMIM 607765) fue el primer defecto congénito descrito en la síntesis de ABs (Clayton *et al.*, 1987; Buchmann *et al.*, 1990), y se caracteriza clínicamente por colestasis neonatal, deficiencia de vitaminas liposolubles, esteatorrea y enfermedad hepática que responde favorablemente a las terapias de reemplazo con ABs

(Ichimiya *et al.*, 1991). Bioquímicamente, se produce la acumulación de ABs C24 en los que se mantiene el doble enlace en la posición D5.

Los pacientes con deficiencia de AKR1D1 (OMIM 235555) presentan una sintomatología equivalente a los pacientes con deficiencia de HSD3B7 (Gonzales *et al.*, 2004). Bioquímicamente, los ABs primarios se encuentran en baja concentración en plasma, donde se pueden detectar tauro- y glico-conjugados de los intermediarios ácido 7 α -hidroxi-3-oxo-4-colenoico y ácido 7 α ,12 α -dihidroxi-4-colenoico.

Por otro lado, se han encontrado mutaciones en *CYP7B1* en pacientes que sufren de un tipo de paraplejia espástica (SPG5A, OMIM 270800) (Tsaousidou *et al.*, 2008; Biancheri *et al.*, 2009; Arnoldi *et al.*, 2012), caracterizada por espasticidad progresiva de las extremidades inferiores debido a la degeneración de las neuronas motoras superiores. En ambas presentaciones, los ABs 3 β -hidroxi-D5 constituyen >90% de los ABs presentes en plasma, considerándose los principales agentes responsables de la toxicidad en el hígado y en otros tejidos (Mathis *et al.*, 1983).

Finalmente, la deficiencia de *CYP27A1* es la responsable de CTX (OMIM 213700). Esta condición se caracteriza por la aparición de depósitos de colesterol y colestanol en todo el cuerpo, particularmente grandes en el cerebro, los pulmones y los tendones de Aquiles. Los síntomas se desarrollan de manera secundaria a la ubicación de los depósitos xantomatosos, incluyendo disfunción neurológica progresiva y la aparición prematura de aterosclerosis y cataratas (Salen *et al.*, 1979). No obstante, el estudio de pacientes pediátricos ha demostrado la aparición temprana de signos de enfermedad hepática, como diarrea e ictericia colestática neonatal prolongada (Clayton *et al.*, 2002).

2.4.5.3. Trastornos peroxisomales

La falta de peroxisomas o la alteración en cualquiera de sus funciones normales es la base de los trastornos peroxisomales (PD), en los que hay uno más defectos en la síntesis de ABs y de plasmalógenos, y una acumulación excesiva de ácidos grasos de cadena muy larga, ácido fitánico, ácido pristánico, que pueden causar daños en las células nerviosas en desarrollo y en otros órganos (ojo, hígado, riñón y hueso) (Steinberg *et al.*, 2006; Waterham *et al.*, 2012). La incidencia de la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (X-ALD) (OMIM 300100), la PD más común, es de 1 en 15,000-17,000 hombres, mientras que la incidencia combinada de las otras PD es de 1

en 50,000. Todas las PD son autosómicas recesivas, excepto X-ALD, que está ligada a X recesiva (Aubourg *et al.*, 2013). Los PD se subdividen en tres subgrupos: trastornos de la biogénesis del peroxisoma (PBD), deficiencias de transportadores de sustratos peroxisomales y deficiencias de enzimas peroxisomales.

El grupo PBD incluye el síndrome de Zellweger (ZS; OMIM 214100), la adrenoleucodistrofia neonatal (NALD; OMIM 614885), la enfermedad Refsum infantil (IRD; OMIM 601539) y la condrodiasplasia punctata rizocólica tipo 1 (RCDP1; OMIM 215100). ZS, NALD e IRD son claramente distintos de RCDP1, y generalmente se conocen como trastornos del espectro de Zellweger (ZSD), siendo ZS el más grave y el IRD el menos grave (Aubourg *et al.*, 2013).

El grupo de deficiencias en transportadores de sustratos peroxisomales ha incluido clásicamente sólo una enfermedad, X-ALD (Valdez *et al.*, 1991; Wanders *et al.*, 2005; Steinberg *et al.*, 2006; Aubourg *et al.*, 2013), si bien recientemente se ha descrito la deficiencia de *ABCD3* (Ferdinandusse *et al.*, 2015).

En el grupo de las deficiencias enzimáticas peroxisomales se incluyen las que afectan a las enzimas acil-CoA oxidasa 1 (ACOX1; OMIM 264470), DBP, AMACR, SCPx, fitanoil-CoA hidroxilasa (enfermedad Refsum en adultos; OMIM 266500), acil-CoA-dihidroxiacetona fosfato aciltransferasa (RCDP2; OMIM 222765) y alquildihidroxiacetona fosfato sintasa (RCDP3; OMIM 600121), si bien recientemente se han descrito también afecciones en las enzimas BAAT y ACOX2, esta última objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. Entre las enfermedades peroxisomales provocadas por defectos en enzimas específicas de la β -oxidación, destacan por su efecto sobre el metabolismo de los ABs las siguientes patologías:

- Deficiencia de la enzima AMACR (OMIM 604489): se trata de una enfermedad peroxisomal rara, autosómica y recesiva, descrita en un grupo pequeño de pacientes y caracterizada por concentraciones elevadas en plasma de ácido pristánico y los intermediarios de la síntesis de ABs, DHCA y THCA, pero no de los ácidos grasos que sufren acortamiento a través de la β -oxidación en el peroxisoma, los cuales no son sustrato de esta enzima. Presenta un número variable de síntomas y signos clínicos, describiéndose dos presentaciones fenotípicas bien diferenciadas. La primera representación fenotípica identificada

es la que define como patología el Defecto de la enzima AMACR y se caracteriza por una neuropatía sensorial y motora degenerativa. Los dos pacientes diagnosticados diferían ligeramente en sus síntomas y signos clínicos: mientras que uno presentaba convulsiones, fallos visuales, migrañas, depresión y retinitis pigmentaria (degeneración progresiva de la retina), el otro tenía afectada principalmente la vía corticoespinal. La segunda representación fenotípica se ha definido como otra patología, con el nombre de “Defecto congénito en la síntesis de ácidos biliares 4”. Se ha descrito en varios niños y se manifiesta como una enfermedad hepática fulminante, caracterizada por coagulopatía, deficiencia de vitaminas liposolubles como las vitaminas E y D y colestasis media. El tratamiento con UDCA parece contrarrestar los efectos tan graves de esta representación, al interaccionar con la absorción del colesterol, así como con la reabsorción y síntesis de los ABs y permite a los pacientes continuar con una vida relativamente normal.

- Deficiencia de la enzima DBP (OMIM 261515): esta enfermedad es una de las enfermedades peroxisomales descritas más recientemente, aunque se ha comprobado que es una patología relativamente común y que ciertas patologías cuya etiología no estaba clara o que fueron diagnosticadas como alguna de las enfermedades peroxisomales más habituales se deben realmente a una deficiencia en la enzima DBP. Se presenta cuando se producen ciertas mutaciones en el gen codificante de la proteína DBP, tanto en homocigosis como en heterocigosis, y compromete seriamente la vida, ya que la esperanza de vida suele ser menor de 5 años. Debido a las dos actividades llevadas a cabo por la enzima DBP (hidratasa y deshidrogenasa), se han descrito tres tipos distintos de esta patología: tipo I, en la que se encuentran afectadas tanto la actividad hidratasa como deshidrogenasa; tipo II, en la que se encuentra afectada exclusivamente la región de la actividad hidratasa; y tipo III, en la que se encuentra afectada exclusivamente la región que lleva a cabo la deshidrogenación. Sin embargo, los síntomas y signos clínicos de estos tres tipos de deficiencia de la proteína DBP son similares entre sí y a otras enfermedades peroxisomales. Prácticamente todos los pacientes presentaban hipotonía neonatal, convulsiones y nulo desarrollo psicomotor. Otros signos frecuentes son distintos tipos de dismorfismo externo como microcefalia, hipertelorismo, retrognatia, frente alta, etc., y espasmos y fallos del sistema visual como

estrabismo, nistagmo e incapacidad para fijar la vista en objetos. Debido a su papel en el peroxisoma, cabría esperar una acumulación en sangre de ácidos grasos de 26 carbonos o más largos y ramificados, ácido fitánico y los precursores de los ABs, DHCA y THCA. Sin embargo, esto no ocurre en todos los casos, donde los intermediarios que menos frecuentemente se acumulan son el DHCA y THCA, lo cual parece estar relacionado con una mayor supervivencia de los pacientes afectados.

- Deficiencia de la enzima SCPx (OMIM 613724): se ha descrito exclusivamente en un paciente de 44 años que presentaba temblor cefálico por distonía cervical y torticolis espasmódica de forma cada vez más frecuente; al que también se le había diagnosticado, entre otros, hipogonadismo hipergonadotrópico y azoospermia, que en conjunto suponen una afectación de los órganos sexuales debido a fallos hormonales; afecciones en las vías sensoriales del sistema nervioso periférico y central, como movimientos oculares sacádicos patológicos, hiposmia e hipoacusia; y anomalías en la sustancia blanca y gris del tálamo y la región occipital. Además, se observó una acumulación ligeramente anormal de DHCA y THCA en plasma, mientras que había una acumulación clara de ácido pristánico y los niveles de ácidos grasos de cadena larga o ramificada eran normales.
- Deficiencia de la enzima BAAT (OMIM 607748) (Setchell *et al.*, 2013): un estudio en 10 pacientes pediátricos, pertenecientes a 7 familias, ha permitido caracterizar el principal signo clínico de esta enfermedad: deficiencia severa de vitaminas liposolubles, lo que provocó raquitismo en 4 de los 10 niños y fracturas óseas en 2 de ellos. A parte de esta característica común, la gravedad de la deficiencia era variable entre los distintos niños, complicándose en un caso hasta el desarrollo de fallo hepático que requirió el trasplante del paciente. Así mismo, se detectaron deficiencias en crecimiento de los niños más jóvenes y, aunque la colestasis no fue una característica común, sí se encontraron signos de fibrosis y una excesiva proliferación de conductillos biliares. Entre las características bioquímicas, se describió una ausencia total de ABs conjugados y una disminución del tamaño del pool de ABs, donde los ABs mayoritarios fueron el CA y el DCA. Además, en 7 de los 8 pacientes en los que se pudo realizar el estudio genético, se encontraron mutaciones en el gen *BAAT* en

homocigosis, mientras que sus familiares no afectados la presentaron en heterocigosis, indicando una herencia autosómica recesiva.

2.4.6. Los ácidos biliares como agentes farmacológicos en enfermedades hepáticas

Como se ha comentado en los apartados anteriores, los ABs se han implicado en diversidad de patologías hepáticas. Sin embargo, algunos de ellos también se han utilizado como tratamiento de estas mismas patologías. Así, el UDCA, marcadamente más hidrofílico que otros ABs (Perez *et al.*, 2009), es comercializado bajo el nombre de “Ursobilane” para la disolución de cálculos biliares y el tratamiento de la colangitis biliar primaria. En este sentido, el UDCA protege de los efectos tóxicos de los ABs más hidrófobos por su actividad antioxidante y anti-apoptótica, estimula la secreción biliar y participa en procesos de inmunomodulación, por lo que también se ha propuesto como tratamiento tras el trasplante de hígado, en enfermedades hepáticas poliquísticas, en NASH y en DILI (Marin *et al.*, 2015).

2.5. ACOX2: GEN, PROTEÍNA Y FUNCIÓN

El gen *ACOX2* (Genbank ID: 8309) se encuentra localizado en el brazo pequeño del cromosoma 3 (3p14.3) y codifica la enzima acil-CoA oxidasa 2 o *ACOX2*. Este gen tiene 15 exones, constituyendo el exón 1 y parte del exón 2 la región 5'UTR de regulación de la expresión génica. A partir del gen se forman un total de 14 variantes del ARNm por *splicing* alternativo, aunque hasta el momento se sabe que sólo tres de ellas codifican para proteínas, y se diferencian principalmente en la región 3' terminal. Además, se ha descrito una variante más corta de *ACOX2* cuya transcripción se inicia en el intrón 9 de la variante silvestre y contiene solamente los exones 10-15 de la variante completa. Su regulación transcripcional es sensible a estrógenos y su expresión se ha encontrado aumentada en cáncer de mama (Bjorklund *et al.*, 2015) y hepatocarcinoma (Hodo *et al.*, 2010).

La proteína *ACOX2* exclusivamente es funcional en la matriz del peroxisoma (Ferdinandusse *et al.*, 2018), adonde es transportada gracias a que contiene el péptido señal de localización microsomal PTS1 y es reconocido por la proteína PEX5 de la membrana peroxisomal. La acil-coA oxidasa *ACOX2* participa en la β -oxidación tanto de los ácidos grasos de cadena muy larga y ramificada, como de los intermediarios en la síntesis *de novo* de ABs (THCA y DHCA). De las tres acil-CoA oxidasas descritas en

humanos (ACOX1, ACOX2 y ACOX3), recientemente se ha demostrado que ACOX2 es la única que reconoce como sustrato los intermediarios THCA y DHCA (Ferdinandusse *et al.*, 2018) y, por tanto, la única que participa en la síntesis de ABs (apartado 1.2.1).

ACOX2 utiliza el flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor y en su forma activa se encuentra formando dímeros. La estructura de la enzima ortóloga a ACOX2 en la rata se ha estudiado por cristalografía de rayos X (Nakajima *et al.*, 2002), describiéndose tres dominios principales (Figura I8):

- Un dominio en α -hélice en el extremo N-terminal (*Acyl-Coenzyme A Oxidase N-terminal*, referencia PF14749 en la base de datos Pfam (Finn *et al.*, 2014)), formado por cinco α -hélices antiparalelas empaquetadas, que participan en la formación de la hendidura de unión al sustrato, y otras dos α -hélices que se extienden hacia el dominio C-terminal, cubriendo su superficie (Pedersen *et al.*, 2005).
- Un dominio intermedio plegado en forma de pseudobarril β (*Acyl-CoA Dehydrogenase, middle domain*, PF02770), que interconecta los otros dos y que participa en la interacción con el anillo de flavina del FAD (Kim *et al.*, 1993).
- Un dominio C-terminal catalítico con estructura en α -hélice (*Acyl-CoA Oxidase*, PF01756), constituido por nueve α -hélices y los bucles que las conectan. Cuatro α -hélices forman un grupo implicado en la interacción con el sustrato, mientras que otra las conecta con otro grupo de cuatro α -hélices que forma un entorno adecuado para que se lleve a cabo la reacción (Hayashi *et al.*, 1998).

Estos dominios se acomodan de manera que los dominios N-terminal y en barril β rotan respecto al dominio C-terminal, lo que proporciona una hendidura suficientemente grande para el sustrato. Sin embargo, esto provoca que el anillo de flavina del FAD se encuentre en el centro activo de la enzima, pero alejado del residuo catalítico del dominio C-terminal (Glu421), y que el residuo de pirimidina quede expuesto, lo que facilita su oxidación. Por ello, la enzima debe sufrir un cambio conformacional tras la unión del sustrato, pasando de una forma “abierta” a una “cerrada”. En la unión de FAD participan los dominios C-terminal y el dominio en barril β de las dos subunidades que conforman el homodímero. El dominio C-terminal también desempeña un papel fundamental tanto en la dimerización de la proteína como en la unión del sustrato, si bien varias de las α -hélices que constituyen el dominio N-terminal también están

implicadas en la unión a la enzima de los ácidos grasos de cadena ramificada o del THCA y DHCA (Figura I8).

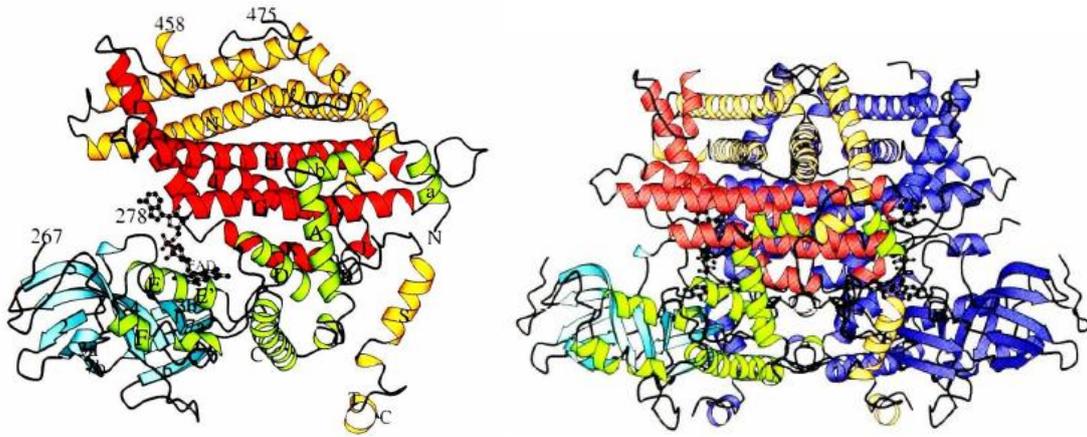


Figura I8: Estructura tridimensional de la proteína ACOX2 de rata, en forma de monómero (A) y de dímero (B), donde una subunidad se ha representado totalmente en azul, mientras que en la otra se sigue el esquema de colores del monómero: el dominio en barril β en azul claro, el dominio N-terminal en verde y el dominio C-terminal en rojo y amarillo. La molécula de FAD se ha representado mediante el modelo de bolas y barras (Nakajima *et al.*, 2002).

En cuanto al mecanismo catalítico de esta enzima, es idéntico al de otras oxidasas peroxisomales y mitocondriales: la reacción de oxidorreducción (el substrato se oxida, el FAD se reduce) se produce por la eliminación de un protón en α por el residuo catalítico, acoplado a la transferencia del grupo hidruro en la posición β del substrato al anillo de flavina del FAD (Nakajima *et al.*, 2002).

A diferencia de lo que ocurre con su ortóloga en rata, que sólo se encuentra en el hígado, la ACOX2 humana se expresa también en tejidos extrahepáticos, principalmente en el riñón, tiroides y ciertas partes del intestino delgado (Figura I9) (Baumgart *et al.*, 1996).

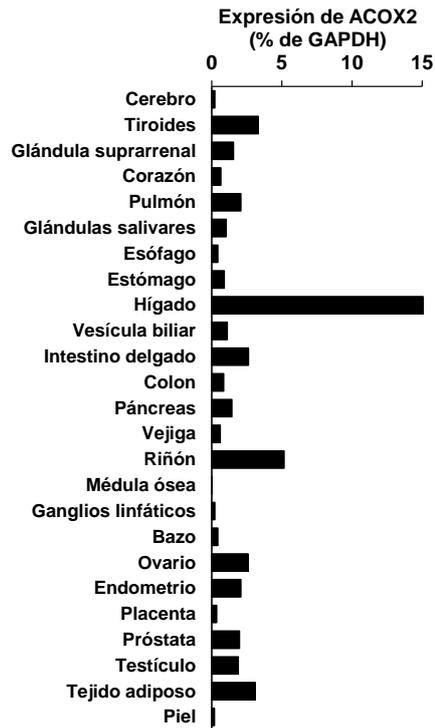


Figura I9: Perfil de expresión de ACOX2 en tejidos sanos obtenido de la base de datos NCBI. Los datos de RPKM (*reads per-kilo base per million mapped reads*) determinados mediante RNAseq se normalizaron por la expresión de GAPDH y son la media±SD de medidas obtenidas de 95 individuos diferentes. De acuerdo con la base de datos Protein Atlas (Protein-Atlas, 2019), en la silueta humana se destacan los órganos con alta expresión de la proteína ACOX2.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Muestras humanas

Las muestras de ADN, suero y orina del probando y su familia se obtuvieron en la Clínica Universidad de Navarra y el Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra (Pamplona). Los datos de los sujetos participantes en el estudio se trataron con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa basada en la Ley 15/99 (R.D. 994/99).

3.1.2. Animales

Los ratones de la cepa C57BL/6J portadores de la mutación c.673C>T en el gen *Acox2* murino, que produce la variante p.R225W de *Acox2*, fueron generados en el Servicio de Transgénesis de la Universidad de Salamanca por el equipo que dirige el Dr. Manuel Sánchez Martín, mediante manipulación genética de embriones de ratón utilizando la tecnología CRISPR/Cas9.

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

Los animales fueron manipulados según las especificaciones de la Comunidad Europea (86/609/EEC y 2003/65/EC) y la normativa española vigente para el uso y cuidado de animales utilizados en experimentación (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005). Los protocolos experimentales empleados durante la realización de este trabajo fueron aprobados por el Comité de Bioética para el uso de animales de laboratorio de la Universidad de Salamanca.

3.1.3. Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares de origen humano:

Alexander o PCL/PRF/5 (CRL 8024) de hepatoma, HepG2 (HB-8065) de hepatoblastoma y HEK-293T (CRL-11268), derivadas de las células HEK293 embrionarias de riñón, para la producción de vectores lentivirales; proporcionadas por la American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Barcelona).

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

HUH-6, de hepatoblastoma, cedida por la Dra. Carolina Armengol (Fundació Institut Investigació Germans Trias i Pujol, Badalona).

Además, se utilizaron 3 líneas celulares hepáticas con un nivel elevado de diferenciación:

IHH, de hepatocitos humanos inmortalizados (Schippers *et al.*, 1997), proporcionada por el Dr. Andreas Geier (Hospital Universitario de Würzburg, Alemania).

HepaRG, derivada de carcinoma hepatocelular sobre infección con hepatitis C (Gripon *et al.*, 2002), que se adquirió en la casa comercial Thermo Fisher (Madrid).

WIF-B9, línea híbrida obtenida de células Fao de hepatoma de rata y fibroblastos humanos WI-38 (Decaens *et al.*, 1996), proporcionada por la Dra. Doris Cassio (INSERM, París, Francia).

3.1.4. Bacterias

Se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli* proporcionada por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Las bacterias *E. coli* “One Shot Mach1 T1” competentes, de elevada eficacia de transformación, se compraron a Invitrogen (Thermo Fisher).

3.2. PRODUCTOS

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

- Abbot Laboratorios (Madrid): isofluorano (Forane®) y pentobarbital sódico (Nembutal N.R.).
- Abcam (Cambridge, Reino Unido): anticuerpo primario anti-PMP70 (ab211533).
- Air Liquide (Valladolid): CO₂ y N₂.
- AppliChem-Panreac (Madrid): ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetansulfónico (Hepes), ácido morfolino propansulfónico (MOPS), acetato sódico anhidro, agar, β -mercaptoetanol, formamida, glicina, y leche descremada liofilizada.
- Applied Biosystems (Thermo Fisher): “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit”, “SYBR® Select Master Mix” y “Taqman® Universal PCR Master Mix”.

- BD Biosciences (Madrid): fluido envolvente FACS Flow para citometría de flujo y colágeno tipo I de cola de rata.
- Biomers.net (Donau, Alemania): oligonucleótidos o *primers*.
- Bio-Rad (Madrid): acrilamida, membrana de nitrocelulosa, persulfato de amonio, rojo Ponceau, tampón Tris 0,5 M pH 6,8, tampón Tris 1,5 M pH 8,8, tetrametiletilendiamina (TEMED) y los marcadores de pesos moleculares para electroforesis de proteínas “Precision Plus Protein Dual Color™ Standards”, “PageRuler Plus Prestained Protein Ladder”, y “Prestained SDS-PAGE Standards, low range”.
- BioTools: ADN Taq polimerasa.
- Calbiochem (Merck Millipore, Barcelona): SB202190, inhibidor competitivo de p38; y SP600125, inhibidor selectivo de JNK.
- Cayman (Hamburgo, Alemania): U-0126, inhibidor selectivo de MEK1 y MEK2.
- Cell Signaling Technology (Leiden, Países Bajos): anticuerpo anti-CHOP (2895), anticuerpo secundario anti-biotina (7075P5), anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (7076S), anticuerpo anti-STAT3 (9139) y anti-pY705-STAT3 (9138).
- Dako (Agilent, Barcelona): medio de montaje para fluorescencia.
- Fermentas (Thermo Fisher): T4 polinucleótido quinasa.
- GE Healthcare (Barcelona): algunas enzimas de restricción, “illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit”, “illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, “illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit” y reactivos de detección ECL (“Enhanced ChemioLuminiscence”), que incluyen los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa y los reactivos de detección 1 y 2.
- Invitrogen (Thermo Fisher): anticuerpo anti-ACOX2 (PA5-50297), anticuerpo anti-V5 (R960-25), anticuerpo anti-V5 conjugado con DyLight 650 (MA5-15253-D650), anticuerpo anti-catalasa (LF-MA0004), anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo marcados con Alexa® 594 o Alexa® 488, “CellROX® Orange Reagent”, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), enzima “Accuprime® Pfx ADN polimerasa”, lipofectamina LTX y reactivo Plus, estándares de ADN (25, 100, 500 pb y 1 kb plus), los plásmidos pUC19 y pcDNA3.1/Hygro(+), proteinasa K, SYBR Green I (“SYBR Safe”), y solución “RNA later”.

- Gibco (Thermo Fisher): Interleucina 6 recombinante humana, Interleucina-1 β recombinante humana, Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF α) recombinante humano, medios de cultivo “Opti-MEM” y “Williams’ E” sin L-glutamina con bicarbonato y rojo fenol, mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina y penicilina/estreptomicina/ amfotericina B), y suero bovino fetal (FBS).
- Lonza (Basilea, Suiza): aminoácidos no esenciales.
- Merck Millipore (Barcelona): etanol (grado HPLC), isopropanol, tartrato disódico y Tris HCl.
- Menarini Diagnostics (Barcelona): portaobjetos OptiplusTM, tiras reactivas de bioquímica seca.
- Origene (Herford, Alemania): plásmido conteniendo la *Open Reading frame* (ORF) de Acox2 de ratón.
- Peprotech (Londres, Reino Unido): FGF19 recombinante humano.
- Promega (Madison, EE.UU.): algunas enzimas de restricción, T4 ADN ligasa y plásmido pGEM-T Easy.
- Pronadisa (Conda, Madrid): agarosa de uso habitual, agarosa de alta resolución MS-8, agarosa LM-GQT de bajo punto de fusión, extracto de levaduras y triptona.
- Qiagen (Izasa, Barcelona): “QIAamp DNA Blood Mini Kit”.
- RayBiotech (Norcross, Georgia): oncostatina M (OSM) recombinante humana (227 aminoácidos).
- R&D systems (Wiesbaden, Alemania): anticuerpo anti-OSM biotinilado (BAF295).
- Roche (Barcelona): mitomicina C y fosfatasa alcalina.
- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EE.UU.): anticuerpo anti-ACOX2 (sc-514320), anticuerpo anti-GAPDH (sc-32233), anticuerpo anti-GRP78 (sc-13968), anticuerpo anti-Na⁺/K⁺-ATPasa (sc-28800), agonista de PPAR α WY14643, agonista de PPAR γ rosiglitazona, agonista de FXR GW4064 y polibreno.
- Sartorius (Goettingen, Alemania): filtros de nitrato de celulosa de 0,2 μ m y 0,1 μ m de tamaño de poro.
- Selleckchem (Munich, Alemania): Ruxolitinib, inhibidor selectivo de Janus quinasas (JAK1/2) e ipatasertib, inhibidor selectivo de proteínas quinasas B (AKT).

- Sigma-Aldrich (Madrid): acetato de amonio, formaldehído 37%, anticuerpo anti- α -Tubulina (T6074), polietilenimina (PEI), sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (AEDT), acetaminofeno, albúmina bovina (fracción V, BSA), sal sódica de los ácidos cólico (CA), glicocólico (GCA), taurocólico (TCA), desoxicólico (DCA), glicodesoxicólico (GDCA), taurodesoxicólico (TDCA), quenodesoxicólico (CDCA), glicoquenodesoxicólico (GCDCA), tauroquenodesoxicólico (TCDCa) y litocólico (LCA), ácido ursodesoxicólico (UDCA), ácido trihidroxicolestanoico (THCA), ácido fórmico, azul de bromofenol, azul de Tripán, bromuro de metiltiazolildifenil tetrazolio (MTT), ampicilina, kanamicina, mezcla de inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil) bencenosulfonilfluoruro 104 mM, pepstatina A 1.5 mM, E-64 1.64 mM, bestatina 4 mM, leupeptina 2 mM y aprotinina 80 μ M), Nonidet P40, dexametasona, dietilpirocarbonato (DEPC), dimetil sulfóxido (DMSO), dodecil sulfato sódico (SDS), D-glucosa, diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), ioduro de propidio, L-prolina, medios de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM)”, “DEM-Ham-F12”, “Minimum Essential Medium Eagle” (MEM), “Nutrient Mixture F-12 Ham”, y “HAT Media Supplement Hybri-Max”, tapsigargina (TG), piruvato sódico, solución de insulina humana (I9278), tripsina de páncreas porcino, sulfato de gentamicina y Tris base.
- Takara (Laboratorios Conda, Madrid): algunas enzimas de restricción y solución de carga para electroforesis en gel.
- TargetMol (Boston, Massachusetts): agonista de LXR GW3965.
- Thermo Scientific: marcador de pesos moleculares de proteínas “PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder” y ARN total de hígado humano sano.
- Toronto Research Chemicals (North York, Canada): ácido nordesoxicólico (norDCA).
- VWR Internacional (Barcelona): ácido acético glacial, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, bicarbonato sódico, bromuro de etidio, carbonato sódico, cloruro potásico, cloruro sódico, dihidrógeno fosfato potásico, etanol (grado analítico), fosfato disódico, glicerol, hidróxido sódico, indicador universal de pH, metanol, reactivo de Folin Ciocalteu y Tween® 20.
- Whatman (GE Healthcare): papel de cromatografía Whatman de 3 mm para la transferencia en Western blot (WB) y “Omni Swabs”.
- Waters: cartuchos “Sep-Pak Plus C18”.

- El ácido *allo*-cólico (Allo-CA) fue sintetizado en nuestro laboratorio por la Dra. M^a Encarnación Mendoza (Mendoza *et al.*, 2003).

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

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

3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES

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

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

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

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

Para las medidas espectrofotométricas se emplearon los espectrofotómetros Hitachi U-2000 (Grupo Taper), Nanodrop 1000 (Thermo Fisher); y un lector de ELISA modelo ELx808 Absorbance Microplate reader (BioTek, Winooski, EE.UU.).

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

Para la evaporación de pequeños volúmenes de solventes, se utilizó un “speed-vacuum” marca Savant modelo SPD121P, acoplado a una bomba de vacío modelo UVS400A (Hucoa-Erlöss).

Para la PCR analítica y para la transcripción reversa (RT) se utilizó un termociclador Mastercycler Pro marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania). Los ensayos de PCR

cuantitativa a tiempo real en tubos de 0,2 ml se realizaron en un aparato ABI PRISM® 7300 Sequence Detection System, de Applied Biosystems (Thermo Fisher). El sistema se controló desde un ordenador Intel Core 2 (modelo DELL OPTIPLEX 755) utilizando el software DataAssist versión 2.0.

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

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

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

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

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

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

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

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

El manejo de células se realizó en una campana de flujo laminar vertical modelo Telstar AV 30/70, mientras que el manejo de vectores lentivirales se realizó en una campana de flujo laminar Telstar Bio-IIA (Telstar Industrial, Barcelona). Las células se mantenían a 37 °C en atmósfera del 5% de CO₂ con humedad relativa del 80%, en un incubador modelo Hepa Class 100 (Thermo Fisher). Para contar las células se utilizaron cámaras Thoma que se observaban a través de un microscopio Leitz Fluovert FS (Leitz).

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

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

Para visualizar las células se utilizó un microscopio de contraste de fases, que además tenía acoplado una lámpara para fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000-S (Nikon, DueroLab). Para visualizar el resultado de las inmunofluorescencias se utilizaron un microscopio confocal modelo TCS SP5 (Leica, Barcelona) y Zeiss LSM510 (Zeiss, Madrid), pertenecientes al Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca).

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

También se utilizó un sistema cromatográfico acoplado a un detector de masas, HPLC-MS-MS, de la casa Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU.). Este sistema se compone de un equipo de HPLC serie 1200 formado por: una bomba cuaternaria con

desgasificador de vacío (modelo G12354A); un inyector de 20 µl de capacidad (modelo G1328B); un detector ultravioleta/visible (modelo G1314B) de longitud de onda variable y programable y una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de poro, termostatzada a 35 °C (Agilent Technologies). El Detector de Masas Triple Cuadrupolo (modelo G6410A) está acoplado a una fuente de ionización a presión atmosférica (API) serie 6000 (modelo G1948B). Todo el sistema se controló desde un ordenador Pentium IV (modelo HP LP2065), utilizando el software Q-TOF, QQQ, TOF (Agilent Technologies) que permite tanto el control del HPLC como del detector de masas.

Las muestras de ARN y proteínas se conservaron en un congelador -80 °C marca Revco (Pacisa). Los viales de almacenamiento de las distintas líneas celulares se conservaban en un contenedor de N₂ líquido (Thermo Fisher).

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

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

3.4. ANÁLISIS GENÉTICO DE MUESTRAS HUMANAS

3.4.1. Obtención de muestras por raspado bucal

Las muestras de ADN de los distintos individuos se obtuvieron utilizando “Omni Swabs”, hisopos estériles diseñados específicamente para la recogida de células epiteliales bucales. Las muestras se obtuvieron al menos 30 min después de haber ingerido cualquier alimento o bebida, raspando la parte interna de la mejilla 5 ó 6 veces durante aproximadamente 10 s. Una vez finalizado el raspado, los hisopos se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento.

3.4.2. Extracción y purificación del ADN genómico

Para la purificación del ADN a partir de los raspados bucales, las muestras se procesaron siguiendo las indicaciones del ensayo comercial “QIAamp DNA Blood Mini

Kit". El ADN se eluyó en agua libre de nucleasas y las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su utilización en el análisis genético.

3.4.3. PCR analítica de alta fidelidad, purificación y secuenciación

Para la amplificación de los exones de los genes potencialmente implicados en la patología de estudio se diseñaron *primers* específicos que anillaban en los intrones que flanqueaban los exones correspondientes, en base a las secuencias NG_052668 (gen *ACOX2*), NG_008182 (gen *HSD17B4*) y NG_012211 (gen *SCP2*), de la base de datos GenBank (Tabla MM1).

Tabla MM1: Secuencias de *primers forward* (F) y *reverse* (R) y tamaño de los amplicones obtenidos para el estudio genético de genes de la ruta peroxisomal de metabolismo de ácidos biliares.

Gen	Exón	Amplicón (pb)	Primer (5'-3')	Tipo
<i>ACOX2</i>	1	208	GCTTCTGTGTTCCAGCCCCTATGT	F
			GCTGCGGACAGGGTCATCAT	R
	2	431	GAGGTGGAGTGGCATTTCAGGTA	F
			GGAAGCAGAACTGCTAATGAAGGACTCT	R
	3 - 5	1215	GAGAAGATTTCAAGGTGCCAGAAACCTCA	F
			AGTGCTACTCTGCCCTCCAACA	R
	6 - 8	1475	CCAGGAGGCTGGGTTGGTT	F
			GTGGGACCAAGAGGCAGCA	R
	9	368	GGCCTCATGTCAGTTCAAGTTTGTCAAT	F
			GCTCCCCAGTGAGTGGAACAATCTTA	R
	10	328	GTGCACAGGGTTGGTCCCTA	F
			CTCCACCCAACAGAAGCTTGGT	R
	11	324	CTCACAGAGTCTCTGCCCTCTCA	F
			CTGAATCCACGAATGTCCACCCAA	R
	12	228	GGAAGCCCATCAGTTGTCTTTTCCACT	F
GTAGCCTGCCTGGGAAGCAA			R	
13	262	GCTTCCAGGGTGACTTCTGGAGTA	F	
		TGGAGTTGGAAGTGACCTGTGAACAA	R	
14	295	TCATGCAACCTCTAATTAGGTATTGTTATTCACCA	F	
		GGTGTATTCACTGCCTGTCTCTGCT	R	
15	337	CCTGGCAGAAATGTA	F	
		CTGCCATTGACCAGCTTCAACAA	R	
<i>HSD17B4</i>	1	442	GCTCATCTTCTACCAGAAATCGGA	F
			CTCTCCTCTCAGGCAGGACCTT	R
	2	385	CAAGCAGAAGAGAGTGGATAGGTTGAGAA	F

		GACAGACAGCCTTAGTCGGGGTAA	R
3	400	CTCTACCCCAGTTTTAAAAAGAGCAGTT	F
		GCGATGGCCACAGTAATACACAGA	R
4 - 5	718	GGAAGTGGGCAGATGACTGAAGAGA	F
		GGTAGAAGTTGCTCCACAAGAGCCAT	R
6 - 7	302	CGCCAGTTTTGAGAGAAAATGTGAGTTGTAAG	F
		GGCTAAATGGATAAGTATGTTCCCCAGAGAA	R
8	291	TCATTGGGGTGTGACAGTAGGCA	F
		CCTGTACACAAGAACCCCCAGACA	R
9	327	GGTGCAGTAGTACCAAAACAGAGTTAGAGT	F
		TCCACATAGGTTTGTAAAGTAACAGCACTGA	R
10	505	GAGCCCTTTAGAAAATGGCTCAGTTGAGA	F
		CCAGCCACATTTTCATTTGGTAGGAATGTT	R
11	367	GCCAGTGGACTCTTACAGAGCTGTATT	F
		GGCCACAGACCTATAGGACAATCACA	R
12	560	GACCTTATCCTAGTGGGTTTGTGGGAA	F
		CCATCCATCCCCAATCACACATAAAC	R
13	377	GGCTCTGTAGCAGGTTTGCTGAAT	F
		ATCTCTGCCACTGCTTCTCTCCAT	R
14	720	GAGGCATACTGTCTGTTAGCAAGAAGCA	F
		TGCCAGGGTTATGGGACTACACAT	R
15	313	AGAGAAATGTGAGCCTGTGGATGGT	F
		AGTCTACTCTAATGGCTCACATGTGCAT	R
16	439	GCAGCATCTGTTGTTTCAGGAACACT	F
		CAATGAAATGCCTCACCTTCCCA	R
17	453	GCTCCTCTCTCTCTGCCTTTCAGAT	F
		CCCAGGGGTGGCAGATGTATAAGA	R
18	490	CTCCATTGTGGCCTGGAGGATTT	F
		CGTGCAATCACAGGAAACATGTCTGTATG	R
19	433	CAGAGCCTCAGGTACATTATGATACAATGCTT	F
		TGGTCCTATCCTAGACCTCGCACTA	R
20	1080	CAGAGCCTCAGGTACATTATGATACAATGCTT	F
		AAAGTGTGCTGATTGCCAGGTCAATG	R
21	711	CCCCAGGCCTCATTCCCTTAGACT	F
		GGCCACTGCTACATAGATAGCTACCA	R
22	488	GCTCCAGCTGATTATAAAGCCAGGTTTAGT	F
		GCCAGAGTATTCCTTCTATTCCAAGCTGT	R
23	487	TCCTGTTATTAAGAGGACTGAGGTTCTGAGT	F
		GGACATTCCTAACCTATTCATTCCAC	R
24	524	GACCTGAGCCACTACAGAAGTGA	F

			CTGTCAACCAGAGTATCAGTAGCAACTGT	R
	25	470	GGTAACAGTTGGCACTCTTTTTCCCT	F
			AACAAAGGTATCAAAGGCCTTTATTGATTTAATTTTCCT	R
<i>SCP2</i>	1	246	CCCTGGCTTCGGGCTTCA	F
			GGAGACCGGAGGGACAGAGAA	R
	2	226	TCCAGCCTGGGTAACAGAGCAA	F
			TGCCCCATCCATGAAATCAAGACAGA	R
	3	348	ACGGAAAAGTGATGCAGTAGCTTAGAGG	F
			CTCCGCATTGTTTGTATAGTTGCTGCT	R
	4	371	TCTTGCACATGTTATATGCTAGGCAAAGGT	F
			ACACCCGGCCTGATGAAGACT	R
	5	338	GCCATTGTGTGCTCACTTGACGTAC	F
			CCTGGAACACCAGTTTCATCATTGGCA	R
	6	387	CCATGTTTCCCTGTGGAGCATGTC	F
			CCTGGCATCCTCCACAGTTCC	R
	7	337	AGCAGAACACTGAGTACCATTGCAAGA	F
			AGTGGCCAAAACTGGAAGTAAAAAGTTG	R
	8	366	GCCAGGAACCCAGGACAAAAGA	F
			GGCAGGAAGGCAGCAGTTA	R
	9	278	GTCTGAAATCCTCCGATCAGGTGCTA	F
			GCTCCATCACAAGAATCATGAGACTCCAT	R
	10	412	AGGCATGAGCCAATGCACCT	F
			AGTGTGGCAGAGCCAACGTTAAG	R
	11	454	GTCAGAGAGCTCTAAGGAACTAATAGGAGCTT	F
			TAAAGCACCAGCTACCAAGTTCAGAGA	R
	12	428	CACAAACGTGGCCTCGGCTTA	F
			CCTGATGGCCACTTTTAAAGCCATGT	R
	13	355	GCGCCCGCCAAGCTTAATTATTTTAT	F
			CTCGTGGCAACACCTGAAACCT	R
	14	253	GCTTGAGGAGAAAGCCAGAGAAATGGA	F
			CCCAGCTGACAGCCTTCGTAAA	R
	15	263	GTTGCAGTCAGTGGCTCTTGACAAA	F
			TCTGACCACTTTGCACTTTAGAGTCTGAG	R
	16	1157	TCAGGGCTAGATAGTGTAGAAACATCAGCA	F
			TCCCCAACGTTTCTCTTTATTCTGCAT	R

La amplificación por PCR se llevó a cabo con los reactivos incluidos en el kit “AccuPrime Pfx SuperMix” (apartado 3.7.1). Los productos obtenidos por PCR se visualizaron tras electroforesis en geles de agarosa y se purificaron con columnas de gel

de sílice (apartados 3.7.2 y 3.7.3). Los fragmentos purificados se secuenciaron según se recoge en el apartado 3.7.8, utilizando para ello los mismos *primers* específicos (Tabla MM1).

3.5. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Para la recogida de muestras y análisis del fenotipo de los ratones de la cepa C57BL/6J portadores de la mutación c.526C>T en el gen *Acox2* murino que produce la variante p.R225W de *Acox2* se pesaron los animales, y se sacrificaron machos y hembras de las mismas camadas con genotipo homocigoto silvestre (WT/WT), heterocigoto (WT/KI) y homocigoto mutante (KI/KI). Para ello, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg peso corporal) por vía intraperitoneal y se recogieron distintas muestras, en el orden que se detalla a continuación:

- Bilis, por punción con jeringa de la vesícula biliar, determinando el volumen exacto recogido por pesada.
- Sangre, mediante extracción de la vena cava inferior. Estas muestras se centrifugaron durante 5 min a 13.000 rpm (18.000 *xg*) para obtener suero.
- Hígado, cuya masa total se determinó por pesada. Fragmentos representativos de los distintos lóbulos se conservaron en RNeasy® (para extraer ARN) o en N₂ líquido (para realizar estudios histológicos, WB, y medida de ácidos biliares).

3.6. CULTIVOS CELULARES

3.6.1. Medios y procedimiento de cultivo

Los medios de cultivo estériles utilizados fueron los siguientes:

MEM suplementado con 1 mM de piruvato sódico, 26,2 mM de bicarbonato sódico, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml y amfotericina B 0,25 µg/ml para las líneas celulares Alexander y HepG2.

DMEM suplementado con 2 mM de L-glutamina, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 0,1 mg/ml para las líneas celulares HuH-7 y HEK293T. Para la línea celular HuH-7 además se añadió gentamicina 50 µg/ml.

Para la línea celular WIF-B9 se utilizó 11,5 g/l Nutrient Mixture F-12 Ham suplementado con 26,2 mM bicarbonato sódico y penicilina 100 U/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml y amfotericina B 0,25 µg/ml y medio HAT (hipoxantina 10 µM, aminopterina 0.037 µM y timidina 16 µM).

Para las líneas celulares IHH y HepaRG se utilizó medio Williams' E suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomina 0,1 mg/ml y 2 mM de L-glutamina. En el caso de las células IHH se añadió además 50 nM de dexametasona y 20 mU/ml de insulina humana, mientras que en el caso de las HepaRG se suplementó con 50 μ M de hidrocortisona, 5 μ g/ml de insulina y 2% (v/v) de DMSO para inducir la diferenciación. Todos los medios se completaron con 10% de FBS inactivado a 56 °C durante 30 min, excepto el medio para la línea celular WIF-B9, que contenía sólo un 5% de FBS no inactivado, y para la línea IHH, en la que se utilizó un 10% de FBS no inactivado.

Tanto al recibir las células como al recuperarlas del N₂ líquido en el que se almacenaban, los criotubos se descongelaron en un baño húmedo termostatzado a 37 °C. Una vez descongeladas, se centrifugaron a 300 \times g durante 5 min. El precipitado se resuspendió en el medio de cultivo correspondiente y se pasó a frascos de cultivo donde se incubaron en la estufa a 37 °C, en atmósfera del 5% de CO₂ en aire y humedad relativa del 80%. Las células IHH y HEK-293T fueron cultivadas en superficies recubiertas con 0,5 mg/ml colágeno tipo I.

El crecimiento de las células se produjo durante un periodo de incubación que seguía a una etapa de adhesión a la superficie de la placa. Una vez que el cultivo alcanzaba la confluencia, las células se tripsinizaron, desprendiéndose con una solución de tripsina 0,25% y 20 mM de AEDT en PBS. Seguidamente, las células se centrifugaban a 300 \times g durante 5 min para precipitarlas, se resuspendían en el medio de cultivo correspondiente y se contaban en una cámara Thoma. Durante el contaje se utilizaba una solución de azul de Tripán (0,4% en PBS) para determinar el número de células vivas. A continuación, se sembraban en placas para realizar los distintos tipos de experimentos o bien se congelaban en alícuotas de FBS con DMSO al 10%, para su almacenamiento en N₂ líquido.

3.6.2. Experimentos de metabolismo de ácidos biliares

Para estudiar la síntesis de ácidos biliares y el metabolismo del ácido trihidroxicolestanoico (THCA) a ácido cólico (CA), las células HepG2 y HuH-7 se sembraron en 3 ml de medio y placa de 6 pocillos, y se incubaron 16 h en estufa a 37 °C. En el caso de las células HepaRG, se sembraron a una densidad de 26.000 cél./cm² y se mantuvieron en cultivo cuatro semanas hasta su diferenciación, según se ha descrito en otros estudios (Gripon *et al.*, 2002). Pasado este tiempo, se cambió el medio de

cultivo, añadiendo la cantidad correspondiente de THCA (2-10 μM) y se incubaron durante 48 o 72 h en la estufa a 37 °C. En el caso de los experimentos con moduladores de la expresión de ACOX2, estos se añadieron al cultivo 6 h antes de la adición del THCA. En cualquier caso, tras el tiempo de incubación, el medio fue recogido determinándose el volumen exacto por pesada, se lavó cada pocillo con PBS y las células se lisaron durante 4 h a 4 °C en agua ultrapura. Se raspó el fondo de la placa, se recogió el lisado, determinando el volumen por pesada, y se sonicó en un baño de ultrasonidos a una potencia de 400 W durante 1 min a 4 °C. Finalmente, 50 μl de lisado se reservaron para valoración de proteínas (apartado 3.13.2) y el resto se mezcló con el medio de cultivo para la extracción de ácidos biliares y determinación de su concentración por HPLC-MS/MS (apartado 3.13.4). Para el resto de líneas celulares (Alexander, HUH-6, WIFB9 e IHH), el medio de cultivo se recogió tras 48 o 72 h en cultivo a un 60-90% de confluencia, y se procesó de igual forma.

3.6.3. Estudios de viabilidad celular

Para investigar el efecto tóxico de los ácidos biliares o de fármacos con potencial hepatotoxicidad en las distintas líneas celulares empleadas en esta Tesis Doctoral, las células se sembraron en placas de 96 pocillos. A las 16 h se añadían los distintos agentes y tras 72 h se realizaba el test de formazán (apartado 3.13.3). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.6.4. Determinación del estrés oxidativo

La generación de ROS se determinó mediante citometría de flujo utilizando sondas fluorescentes, como la diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) y el compuesto CellROX® Orange Reagent. La DCFH-DA es un compuesto no fluorescente que difunde rápidamente a través de las membranas celulares y es posteriormente hidrolizado por esterasas intracelulares que lo transforman en diclorofluoresceína (DCFH), un compuesto con una intensa fluorescencia verde con un máximo de absorción/emisión a las longitudes de onda de 502/523 nm, que se oxida en presencia de todos los tipos de ROS dando lugar a su forma oxidada, DCF, aumentando su fluorescencia (Possel *et al.*, 1997). El CellROX® Orange Reagent no es fluorescente cuando se encuentra en estado reducido, pero presenta una fluorescencia naranja con un máximo de absorción/emisión a las longitudes de onda de 545/565 nm tras la oxidación por parte de ROS.

3.6.5. Determinación del estrés de retículo endoplásmico

Para el estudio de la inducción de estrés de retículo endoplásmico, las células se sembraron para la extracción de ARN (apartado 3.10.1) y homogenado proteico (apartado 3.11.1) a una densidad adecuada en función del tipo celular. Tras 16 h de la siembra, se añadieron los agentes inductores, utilizando como control positivo la incubación con taspigargina a 2 μ M, y se incubaron un tiempo variable en estufa a 37 °C. La activación de la UPR se determinó utilizando diferentes marcadores típicos:

- Inducción de la expresión de la proteína pro-apoptótica CHOP, tras 24 h de incubación, determinada por RT-qPCR (apartado 3.10, Tabla MM4) y/o WB (apartado 3.11, Tabla MM5).
- Inducción de la expresión de la proteína GRP78, tras 24 h de incubación, determinada por RT-qPCR (apartado 3.10, Tabla MM4) y/o WB (apartado 3.11, Tabla MM5).
- *Splicing* atípico de XBP1, tras 1 h de incubación, determinado por RT-qPCR (apartado 3.10) mediante la combinación de *primers* específicos (Tabla MM4) para las variantes de ARN mensajero total (XBP1-total), corta (XBP1-S) y larga (XBP1-U).

3.6.6. Estudios de modulación de la expresión génica

Para estudiar el papel de distintos mediadores inflamatorios (oncostatina M y citoquinas), receptores nucleares y otras moléculas de señalización (FGF19), como moduladores de la expresión de *ACOX2* y otras enzimas implicadas en la síntesis y conjugación de los ácidos biliares, las células IHH se sembraron en placas de 24 o 6 pocillos, y las HepG2 se sembraron en placas de 24 pocillos. 16 h después de la siembra, se añadieron las proteínas recombinantes o los compuestos correspondientes y se incubaron 6-24 h en estufa a 37 °C. Finalmente, las células se recogieron y procesaron para la extracción de ARN y cuantificación de la expresión de los genes de interés por PCR cuantitativa (apartado 3.10).

3.7. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.7.1. PCR analítica de alta fidelidad

La PCR de alta fidelidad se llevó a cabo con el kit “AccuPrime Pfx SuperMix”. Se preparó una mezcla con el ADN molde y los reactivos suministrados por el kit, que

contenía la ADN polimerasa *Pfx* de alta fidelidad, $MgCl_2$ y desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), solución tampón y los *primers* a una concentración final de 200 nM. Una vez preparada la mezcla de reacción, los tubos se incubaron en un termociclador con las siguientes condiciones:

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

En algunos casos se utilizó un gradiente de temperatura de anillamiento (58 °C, 60 °C, 62 °C) para fijar las condiciones de mayor eficacia de amplificación.

3.7.2. Electroforesis en geles de agarosa no desnaturalizante

Los productos obtenidos por PCR se visualizaron tras electroforesis en geles de agarosa. Para preparar el gel de electroforesis se mezcló tampón TAE 1x (Tris base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, AEDT 1 mM, pH 8) con un porcentaje variable (1%-2.5%) de agarosa, calentándose a ebullición para disolver la agarosa y añadiéndose “SYBR Safe” para teñir el ADN. Tras polimerizar, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis con tampón TAE. Las muestras se mezclaron con la solución de carga, relación 1:10 (v/v), antes de depositarlas en los pocillos del gel. Como patrón de tamaños moleculares de ADN se emplearon estándares de ADN de 25, 100, 500 pb o 1 kb. Los productos de PCR teñidos con “SYBR Safe” se visualizaron en un equipo de análisis de imagen LAS-4000. Tras comprobar la presencia o ausencia de bandas inespecíficas, en algunos casos se cortó el fragmento del gel que contenía la banda correspondiente al amplicón de interés y se purificó (apartado 3.7.3).

3.7.3. Purificación de ADN contenido en geles de agarosa y reacciones enzimáticas

En ocasiones, fue necesario purificar el ADN contenido en un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Para ello, el fragmento del gel de agarosa que contenía la banda del ADN de interés se cortó y la agarosa se disolvió calentando a 60 °C durante 15 min. El ADN contenido en esta mezcla, así como en otras mezclas procedentes de reacciones enzimáticas, se purificó en columnas con membrana de gel de sílice suministradas en el

kit “illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification”, siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. El ADN se eluyó con agua ultrapura o en un tampón TE (Tris 10 mM, AEDT 1 mM, pH 8.0), en función de la aplicación en la que se usaba posteriormente.

3.7.4. Transformación de bacterias por choque térmico

Se mezclaron 5-10 ng del plásmido de interés con 50 µl de una suspensión de bacterias químicamente competentes, y se incubaron durante 30 min en hielo y, posteriormente, para facilitar la entrada del plásmido, a 42 °C durante 30 s, en el caso de las bacterias “One Shot Mach1 T1”, y 2 min para las bacterias DH5α. A continuación, se mantuvo la mezcla en hielo durante 2 min y tras añadir 250 µl de medio SOC (20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levaduras, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa; pH 7,0) se realizó una incubación en agitación durante 1 h a 37 °C. Finalmente, aproximadamente la mitad del volumen se sembró en condiciones de esterilidad por extensión con un asa de vidrio en una placa con medio Luria-Bertani (LB; 10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levaduras y 10 g/l NaCl; pH 7,0) y 15 g/l de agar suplementado con el antibiótico de selección apropiado (100 µg/ml de ampicilina o 50 µg/ml kanamicina) que se incubó en una estufa a 37 °C durante aproximadamente 16 h para permitir el crecimiento de colonias.

3.7.5. Selección de colonias bacterianas y crecimiento en medio líquido

De las colonias bacterianas que habían crecido en la placa y que se encontraban aisladas, sin colonias satélite alrededor, se seleccionaron entre 4 y 8 en función del objetivo. Se rasparon con una punta de pipeta estéril, se inocularon en 6 ml de medio LB y se incubaron 16 h en agitación a 37 °C.

3.7.6. Purificación de ADN plasmídico de cultivos bacterianos

Para la purificación de plásmidos a partir de las bacterias en suspensión se utilizó el kit comercial “illustra PlasmidPrep Mini Spin”, diseñado para una extracción rápida y eficaz del ADN plasmídico de cultivos de *E. coli*, y que utiliza columnas de gel de sílice que adsorben el ADN. Para la comprobación de la identidad de los plásmidos purificados, se realizaron una PCR analítica (apartado 3.7.1) y/o un estudio de restricción (apartado 3.7.7), seguido de secuenciación (apartado 3.7.8).

3.7.7. Digestión con enzimas de restricción

Para llevar a cabo las reacciones de restricción se prepararon mezclas de reacción conteniendo el ADN de interés, el tampón de reacción adecuado según la enzima utilizada, la enzima de restricción (5 U/ μ g de ADN) y agua ultrapura hasta un volumen final de 20-50 μ l. En caso de que la casa comercial lo recomendase, también se añadía albúmina bovina sérica al 0,1%. La reacción de restricción se llevó a cabo durante 3 h a 37 °C para enzimas clásicas o 15 min a 37 °C para las enzimas “Fast Digest™”. En algunos casos, la enzima de restricción fue inactivada mediante incubación a alta temperatura (65-80 °C durante 5-20 min). Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en un gel de agarosa o se purificaron de la mezcla de reacción (apartado 3.7.3).

3.7.8. Secuenciación de ADN

La secuenciación de los plásmidos y productos de PCR se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca utilizando la técnica de terminación de la cadena de tipo Sanger. Para cada secuencia, se preparó una mezcla que contenía 200-500 ng de ADN y 3,3 pmol de un *primer* específico. El análisis de los cromatogramas tras la electroforesis capilar se realizó con el programa informático FinchTV 1.4 (Geospiza, PerkinElmer, Seattle, EE.UU.) y para la visualización de las secuencias de ADN se usó el programa Gene Construction Kit.

3.8. TÉCNICAS DE CLONACIÓN Y MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

En esta Tesis Doctoral se han utilizado distintas estrategias basadas en la metodología de la clonación clásica y modificación de plásmidos. Brevemente, este método utiliza la capacidad de algunas enzimas de restricción, las endonucleasas de tipo II, para cortar moléculas de ADN no metiladas, reconociendo secuencias específicas. Los extremos generados por estas enzimas de restricción pueden ser romos o extendidos en 5' o 3' y cohesivos (Figura MM1-A); en este segundo caso, los extremos tenderán a unirse con cadenas complementarias, por ejemplo, aquellas que resulten del corte con la misma enzima de restricción o de isocaudómeros. Para la formación de los enlaces fosfodiéster que vuelvan a unir las hebras de ADN, se utilizan enzimas ligasas, capaces de sellar *nicks* en hebras de doble cadena (Figura MM1-B). La combinación de ambos tipos de reacciones permite la clonación de fragmentos de ADN en plásmidos bacterianos (Figura MM1-C) (Reece, 2004).

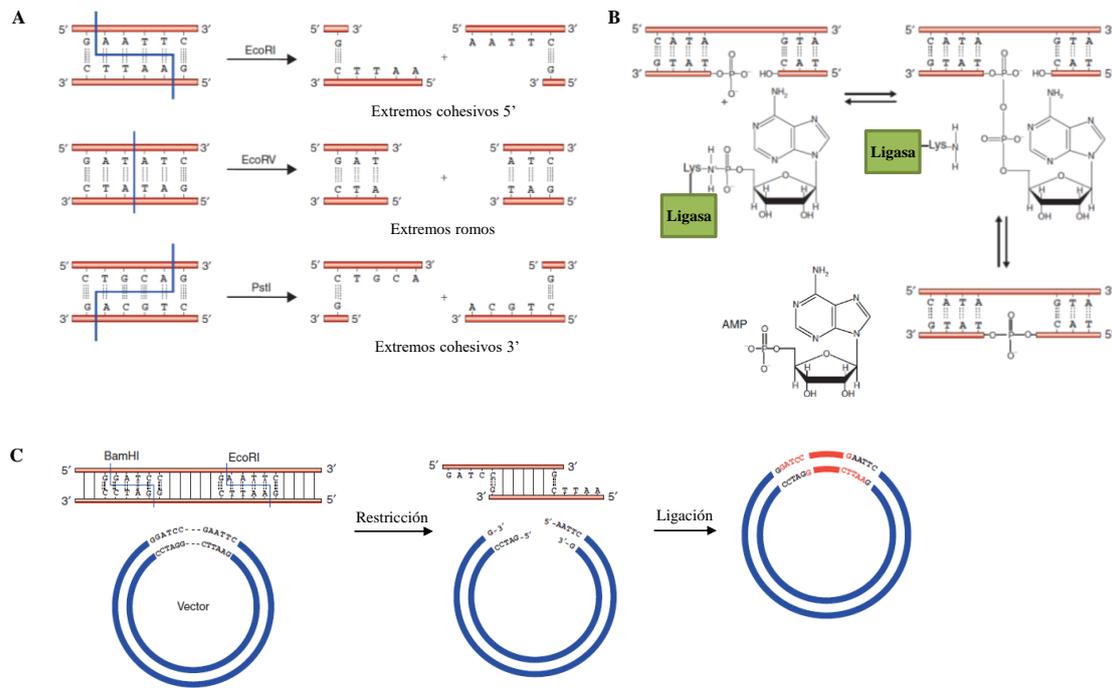


Figura MM1: A) Esquema representativo de los tipos de corte de enzimas de restricción en las cadenas de ADN. B) Esquema representativo del mecanismo de generación de enlaces fosfodiéster por las enzimas de ligación. C) Esquema general de la combinación de restricción+ligación aplicado a la clonación en vectores o plásmidos (Reece, 2004).

3.8.1. Clonación de la ORF del gen *ACOX2*

Durante la realización de mi Trabajo Fin de Máster se llevó a cabo la clonación de la ORF de *ACOX2* (Alonso-Peña, 2015). Brevemente, se utilizó como molde ADN complementario (ADNc) obtenido a partir de ARN total de hígado humano sano, como se describe en el apartado 3.10.2. A partir de este ADNc se amplificó la ORF de *ACOX2* mediante PCR analítica de alta fidelidad (apartado 3.7.1) utilizando *primers* específicos (Tabla MM4). El amplicón resultante se purificó a partir del gel de agarosa y se clonó en el plásmido pGEMT Easy linealizado.

3.8.2. Modificación de plásmidos por mutagénesis dirigida

La estrategia de mutagénesis dirigida que se ha utilizado en esta Tesis Doctoral es una adaptación del método de Laible *et al.* (Laible *et al.*, 2009) que consta de dos etapas: la amplificación del plásmido de interés en dos fragmentos mediante PCR, introduciendo en los *primers* específicos la mutación de interés, y el corte y ligación de los dos amplicones generados.

Para la obtención de cada una de las distintas variantes del gen *ACOX2*, humano (*hACOX2*) y murino (*mAcox2*), se utilizaron cuatro *primers*: uno de ellos contenía la mutación que se quería introducir, otro de ellos anillaba en la posición adyacente de la hebra complementaria, mientras que los otros dos anillaban en la región codificante de los genes de resistencia a antibióticos utilizados para la selección de colonias. Además, estas modificaciones se encontraban en los extremos de cada amplicón, de forma que el plásmido se reconstruía posteriormente por ligación (Figura MM2).

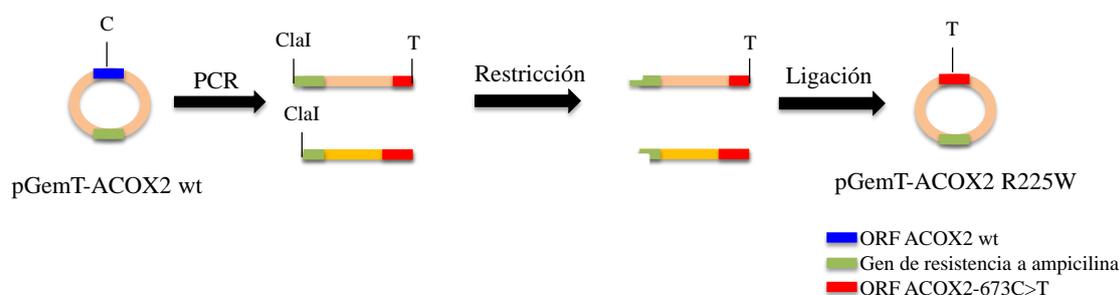


Figura MM2: Representación esquemática y ejemplificada del proceso de modificación de plásmidos por mutagénesis dirigida.

3.8.3. Subclonación en plásmidos lentivirales

Para la subclonación de distintos insertos en el plásmido pWPI-V5, generado por mutagénesis dirigida durante la realización de mi Trabajo Fin de Máster (Alonso-Peña, 2015), se siguieron dos estrategias:

- El plásmido pWPI-V5 se linealizó mediante corte con la enzima *PacI* y se desfosforiló con una fosfatasa alcalina para evitar la circularización de este. Los insertos de interés se cortaron con la misma enzima de restricción y se purificaron a partir de la banda de un gel de agarosa. Para la reacción de ligación se utilizó la enzima T4 ligasa (apartado 3.8.1).
- Debido a la dificultad de llevar a cabo la clonación anterior, en algunos casos se diseñó una nueva estrategia que consistió en una clonación direccional, utilizando un plásmido pWPI-V5 en el que previamente se había introducido una secuencia MCS (*Multi-cloning site*), que denominamos pWPI-MCS, y que había sido construido por la Dr. Ruba Al-Abdulla durante el desarrollo de su Tesis Doctoral en nuestro laboratorio. Esto permitió la linealización del plásmido con diferentes enzimas de restricción en cada extremo, la clonación de los insertos de interés de forma direccional y evitar la recircularización del plásmido vacío.

Para ello, los insertos se amplificaron por PCR de alta fidelidad con *primers* específicos conteniendo en sus extremos las secuencias reconocidas por las enzimas *MluI* y *SpeI* (Tabla MM3), se digirieron con ambas enzimas de restricción, se purificaron a partir de la banda visualizada en gel de agarosa (apartados 3.7.2 y 3.7.3) y se ligaron con el plásmido pWPI-MCS-V5 linealizado con la enzima T4 ligasa.

Tabla MM3: Secuencias de *primers* utilizados para clonación, subclonación y secuenciación de plásmidos.

Aplicación	Secuencia 5' - 3'	Tipo
Secuenciación plásmidos comerciales	TGCTGCCAGATCCTCTTCTGAGAT	F
Secuenciación plásmidos comerciales	AGTGAGGAAGTAGCAGTGAGCCTT	R
Secuenciación pGem-ACOX2	GCCATGCGCTACTCGGTCAT	F
Secuenciación pGem-ACOX2	ATAACTGATGGCCAGCTGAGGAAAGA	R
Secuenciación pWPI-V5	CCCTAGGAATGCTCGTCAAGAAGACA	F
Secuenciación pWPI-V5	GGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGA	F
Secuenciación pWPI-V5	TGCTATTATGTCTACTATTCTTTCCCCTGCACT	R
<i>primer</i> T7 (Universal)	TAATACGACTCACTATAGGG	R
<i>primer</i> M13 (Universal)	GTA AACGACGGCCAG	F
<i>primer</i> M13 (Universal)	CAGGAAACAGCTATGAC	R
Amplificación <i>ORF hACOX2</i>	GCCACCATGGGCAGCCAGTGCA	F
Amplificación <i>ORF hACOX2</i>	TAGCTTGGATCTCCAACCTTGTAAAAGTGGT	R
Subclonación <i>mACOX2</i> en pWPI-MCS	AATTCCGGACGCGTTACCGAGGAGATCTGCCGC	F
Subclonación <i>mACOX2</i> en pWPI-MCS	AATTCCGGACTAGTCAGCTTGGGTTTCCAGCTTGC	R

hACOX2: gen *ACOX2* humano. *mACOX2*: gen *ACOX2* murino. F: *Forward*. R: *Reverse*.

3.9. OBTENCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES

Para los estudios *in vitro* se emplearon lentivirus como vectores, un tipo de retrovirus cuyo genoma se compone de un ARN lineal monocatenario, capaz de integrarse en el genoma de la célula huésped. Esto permite la transducción tanto de células que se dividen como células que no están destinadas a dividirse, consiguiendo una expresión del transgén estable y de larga duración. Para la utilización segura de estos vectores virales, el plásmido que conforma el genoma viral se ha modificado, produciéndose lentivirus recombinantes defectivos, en los que el transgén de interés sustituye los genes de las proteínas virales.

Para producir estos virus se necesita una línea celular hospedadora o empaquetadora que se cotransfecta con tres plásmidos: dos que codifican las proteínas estructurales del

lentivirus y un plásmido recombinante que contiene el gen de interés flanqueado por las secuencias LTR (*Long Terminal Repeats*) y por la señal de empaquetamiento, además de otros elementos necesarios en *cis* como el TSS (Sitio de inicio de transcripción) y el tracto polipurínico necesario para la síntesis de la segunda cadena. De esta manera, se generarán partículas lentivirales defectivas que pueden ser purificadas y concentradas a partir de los sobrenadantes del cultivo celular (Kuroda *et al.*, 2009).

3.9.1. Producción

Se sembraron células empaquetadoras HEK-293T en placas de 10 cm de diámetro recubiertas con colágeno. Se incubaron durante un mínimo de 6 h hasta que las células estuvieran adheridas a la superficie adecuadamente. A continuación, se transfectaron con polietilenimina (1 mg/ml PEI en 25 mM HEPES y 150 mM NaCl; pH 7,5) y los siguientes plásmidos (Figura MM3):

- Los vectores de transferencia pWPI-hACOX2, que contenían las distintas variantes de estudio de este gen, los vectores pWPI-mACOX2 que contenían los ortólogos murinos, o los plásmidos lentivirales pWPI vacíos, utilizados para producir lentivirus control. Todos presentaban el gen reportero EGFP separado del transgén de estudio por un elemento IRES, lo que permite el seguimiento de la fluorescencia de las células transducidas, tanto por microscopía de fluorescencia como por citometría de flujo; así como una etiqueta V5, para la inmunodetección de la proteína de estudio con anticuerpos anti-V5.
- El plásmido psPAX2, que codifica proteínas estructurales del virus.
- El vector de expresión pMD2.G, que codifica la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular.

Para formar los complejos PEI:ADN se mezclaron 6 µg del plásmido psPAX2, 4,5 µg del plásmido pMD2.G y 6 µg del plásmido de transferencia, disueltos en 1,2 ml de solución salina (150 mM NaCl), con 60 µl de PEI. La mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y se añadió a la placa de cultivo de células HEK-293T. 24 h después se retiró el medio de cultivo con los complejos PEI:ADN y se sustituyó por medio nuevo. El medio de cultivo de las placas se recogió 48 h, 56 h y 72 h después de la transfección, se filtró con filtros de 0,45 µm de tamaño de poro para retirar los restos celulares y se ultracentrifugó a 53.000 *xg*, a 16 °C durante 130 min para concentrar las

partículas lentivirales. El precipitado se resuspendió en 500 μ l de medio de cultivo DMEM base, y se conservó a -80 $^{\circ}$ C en alícuotas de 100 μ l hasta su uso.

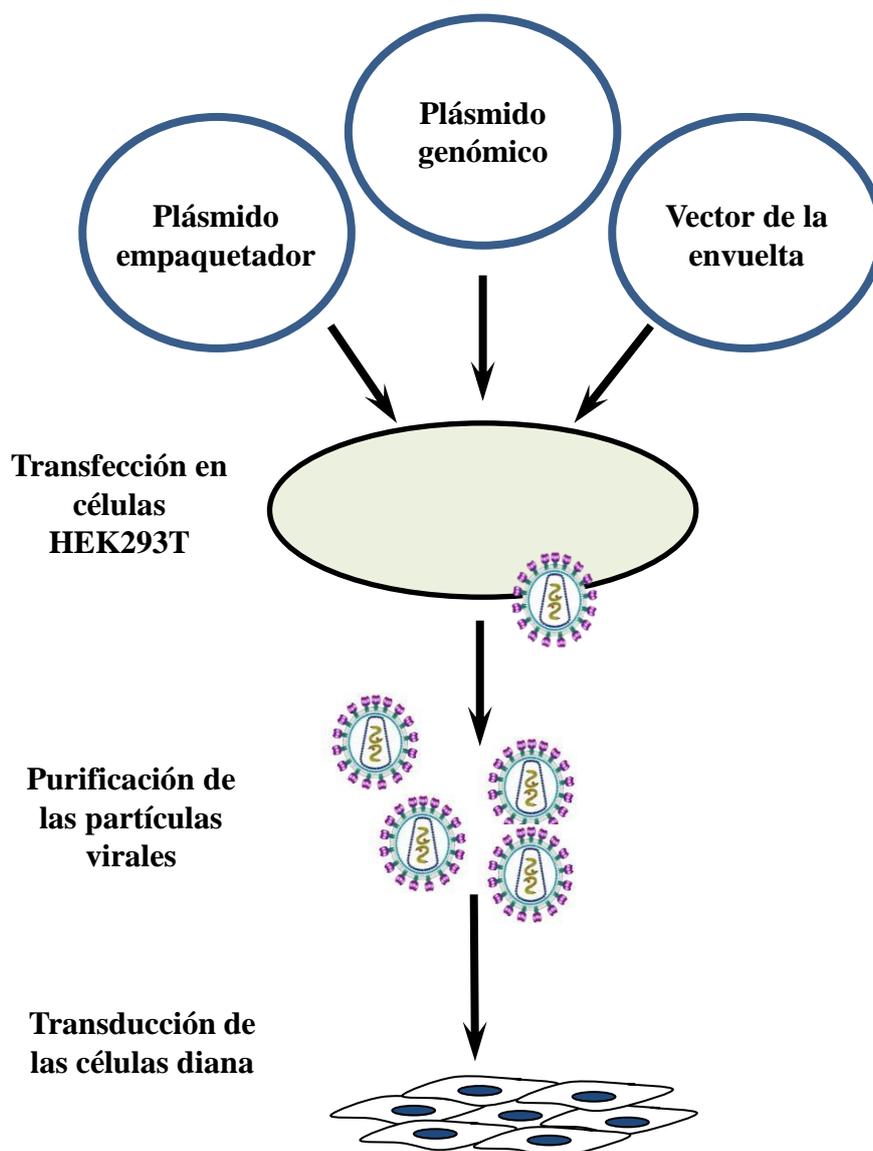


Figura MM3: Esquema del proceso de producción de lentivirus. Las células HEK-293T se transfectaron con el plásmido genómico lentiviral y con los plásmidos empaquetadores y de la envuelta. Tras 72 h los virus ya formados y liberados al medio se purificaron por ultracentrifugación (Pérez-Silva, 2014).

3.9.2. Titulación por citometría de flujo

Se sembraron células HEK293T en placas de 96 pocillos. 24 h después, se añadieron a la placa diluciones crecientes de la solución viral, tras lo que se realizó una centrifugación a 1800 xg durante 90 min a 32 $^{\circ}$ C (“spin-inoculación”). Tras 16 h de incubación, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio nuevo. Cuatro días tras la transducción, se determinó el porcentaje de células EGFP+ por citometría de flujo.

La concentración de partículas virales se calculó por la fórmula:

$$\text{Título (TU/ml)} = \frac{10^{-ED_{50}} * 2 * N^{\circ} \text{ células}}{\text{Vol}}$$

Donde:

- TU: Unidades transformantes (partículas virales infectivas).
- ED₅₀ es el log₁₀ de la dilución de la suspensión viral que consiguió transducir el 50% de las células.
- N° células: 20.000 células.
- Vol: volumen del medio de cultivo (ml).

3.9.3. Transducción de células diana

Se sembraron células HepG2 o HuH-7 en placas de 24 pocillos, y se transdujeron 24 h después con los lentivirus recombinantes según la MOI (multiplicidad de infección) óptima para cada línea celular. En el caso de las HepG2, a la suspensión viral se le añadió polibreno y las placas se centrifugaron a 1800 *xg* durante 90 min a 32 °C, para aumentar la eficacia de la transducción. A las 16 h se cambió el medio de cultivo, eliminando las partículas virales que no se hubieran integrado. A partir del cuarto días tras la transducción se determinó el porcentaje de células fluorescentes que expresaban la EGFP por citometría de flujo.

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

3.10.1. Extracción del ARN total

Para extraer ARN de los homogenados de células o de tejidos se utilizó el kit comercial “illustraRNAspin Mini RNA Isolation Kit”, que se basa en la purificación del ARN adsorbido a membranas de sílice. Se procesaron un máximo de 5 millones de células o 30 mg de tejido por columna, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

3.10.2. Transcripción reversa (RT)

Para conseguir el ADNc utilizado como molde en la PCR, el ARN de partida era sometido a una reacción de retro-transcripción (RT). Para ello utilizamos el kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit”, que contiene una solución tampón de reacción, dNTPs, una mezcla de “*random oligomers*” y una transcriptasa reversa recombinante y optimizada del virus de la leucemia murina de Moloney (rMoMuLV). A

esta mezcla de reacción se añadieron 2 μg de ARN y la reacción se llevó a cabo en un termociclador con las siguientes condiciones de incubación:

- 10 min a 25 °C
- 120 min a 37 °C
- 5 min a 65 °C

3.10.3. Diseño de *primers*

Para diseñar los *primers* específicos para cada uno de los genes estudiados en esta Tesis Doctoral se empleó el programa OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligoanalyzer>; Integrated DNA Technologies, Coralville, EE.UU.), y su especificidad se comprobó con el programa BLAST (Camacho *et al.*, 2009; Geer *et al.*, 2010). De los dos *primers* utilizados para qPCR (Tabla MM4) al menos uno, y frecuentemente los dos, se diseñaron sobre la unión de dos exones codificantes, utilizando como molde la secuencia del ARNm correspondiente a cada gen, publicada en la base de datos GenBank (Geer *et al.*, 2010), evitando así posibles artefactos en la medida debido a amplificaciones de restos de ADN genómico o ARNm inmaduro.

Tabla MM4: Secuencias de *primers forward* (F) y *reverse* (R) utilizados para para cuantificar los niveles de expresión de los genes de interés.

ARNm	Proteína	Número de acceso	Secuencia (5'-3')	Tipo
<i>Homo sapiens</i>				
<i>ABCD3</i>	PMP70	NM_002858.4	CGGCCTGCACGGTAAGAAAAGT	F
			CTTGTCCACCACAGCTCGCT	R
<i>ABCG1</i>	ABCG1	NM_207174.1	CTGGACACAGTTACTAATGCCAGCAGTTA	F
			CATGTTGCTGGACACCACCTCAT	R
<i>ACOX1</i>	ACOX1	NM_004035.7	CCTGGTGGGCTTGGAAAGACTT	F
			GTCACCAACGGTAATTCCTGGCA	R
<i>ACOX2</i>	ACOX2	NM_003500.4	CACCCCACTGCCAGGAATCAT	F
			GCAAGACCTGTGCAAAGCGACT	R
<i>AMACR</i>	AMACR	NM_014324.6	GTGGTGGCCTTATGTGTGCACT	F
			GCTGTTCCCTTCCACCATATTTGCATCA	R
<i>ANGPTL4</i>	ANGPTL4	NM_139314.3	AGCAGGATCCAGCAACTCTTCCA	F
			CCAGGAGGCCAAACTGGCTTT	R

<i>BAAT</i>	BAAT	NM_001701	GGGCAGGTTCTCTTGCTAGGTTTT CTGGCTCATCAACAAGTGCACTCA	F R
<i>CHOP</i>	CHOP	NM_001195053.1	CTGGAACCTGAGGAGAGAGTGTTC GGCTGCTTTGGTGCTGCTT	F R
<i>CYP7A1</i>	CYP7A1	NM_000780.2	CCATAAGGTGTTGTGCCACGGAAA GCCCAAATGCCTTCGCAGAAG	F R
<i>FGF21</i>	FGF21	NM_019113	TGACCAGAGCCCCGAAAGTCT CAGGGTCAAAGTGGAGCGATCCATA	F R
<i>GAPDH</i>	GAPDH	NM_002046	TGAGCCCCGAGCCTCC ACAGAGCTGGGACATGGGACAT	F R
<i>GRP78</i>	GRP78	NM_005347.5	GTTCTTGCCGTTCAAGGTGGTTGAAA GGGTAACCTTCTTTCCCAAATAAGCCTCA	F R
<i>HPRT1</i>	HPRT1	NM_000194	ATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT TGAGCACACAGAGGGCTACAATGT	F R
<i>HSD17B4</i>	DBP	NM_001292027.1	TGTTTTCAATGAATGATTTGGGAGGGGACT TCTTCCACTGAATCATAGTTGGCCACT	F R
<i>NROB2</i>	SHP	NM_021969	GGCTTCAATGCTGTCTGGAGT CTGGCACATCGGGGTTGAAGA	F R
<i>SLC51A</i>	OST α	NM_152672	TTCCAGGTTCTCCTCATCCTGAC CAATTCATCACTTGAGACCTGGTTTT	F R
<i>SCP2</i>	SCPx	NM_002979.5	GGGTTGGCATGACCAAGTTTGTGA GCTAAAGCCTTCTTGCTGCTTCTT	F R
<i>SREBP1</i>	SREBP-1c	NM_001321096.2	GCACTTTCGAAGACATGCTTCAGCTT CTCCCAGCATAGGGTGGGTCAAATA	F R
<i>XBPI</i>	XBPI	NM_005080.3	CGGAAGCCAAGGGGAATGAAGT TCCAGAATGCCCAACAGGATATCAGAC	F R
<i>XBPI(S)</i>	XBPI(S)	NM_001079539.1	GCTGAGTCCGCAGCAGGT TCCAGAATGCCCAACAGGATATCAGAC	F R
<i>XBPI(U)</i>	XBPI(U)	NM_005080.3	CTACGTGCACCTCTGCAGCA TCCAGAATGCCCAACAGGATATCAGAC	F R
<i>Mus musculus</i>				
<i>Acox2</i>	Acox2	NM_001161667.1	CCACTTGATGGAAGTCATTGTAGGGCT TACGACCAAATCCGTTGACTCC	F R
<i>Gapdh</i>	Gapdh	NM_001289726.1	GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATT CAATGAAGGGGTCGTTGATGGCAA	F R

<i>Hprt1</i>	Hprt1	NM_013556.2	CCCAGCGTCGTGATTAGCGAT	F
			CGAGCAAGTCTTTCAGTCCTGTCCATA	R

3.10.4. PCR cuantitativa (qPCR)

La qPCR es una variante de PCR que permite cuantificar el producto amplificado durante la reacción mediante la detección de fluorescencia generada por un fluorocromo al intercalarse entre las hebras de ADN que se van sintetizando. Se usó el fluorocromo “SYBR”, un componente de la mezcla de reactivos “SYBR® Select Master Mix” (Applied Biosystems) utilizada para este propósito.

Las condiciones de tiempo y temperatura para la PCR fueron:

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

En algunos casos, para comprobar la especificidad de los *primers* utilizados, se añadió un ciclo de disociación consistente en dos ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C.

La cuantificación se realizó de forma relativa, comparando el ciclo umbral (Ct). En este método, se utiliza un control interno como elemento normalizador, de forma que, la expresión del gen diana, normalizada frente al control interno, se calcula:

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

Además, se utilizó un calibrador, que es una muestra que sirve como patrón externo para comparar los resultados, y a la que se le otorga el valor 1 de expresión. La expresión del gen diana, normalizada y relativa al calibrador/muestra control, viene dada por:

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

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

Todas las determinaciones se realizaron siempre por duplicado. Como normalizador se utilizó el Ct de GAPDH, HPRT1 o ARNr 18S, en función de la muestra problema.

3.11. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT (WB)

3.11.1. Obtención de homogenados de tejido o de cultivos celulares

Para obtener un homogenado total de proteínas a partir de un cultivo celular, se tripsinizaron las células, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS; NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 0.5 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, pH 7.4) y se resuspendieron en el volumen deseado de RIPA (PBS, Nonidet P40 1%, desoxicolato sódico 0.5%, SDS 0.1%) y un cóctel de inhibidores de proteasas (IP) al 1 % (v/v) (100 µl de RIPA con 1 µl de IP para cada millón de células).

Para la obtención de homogenados proteicos partiendo de tejido congelado a -80 °C, se pesaron entre 50 y 100 mg de tejido que se homogenizaron en 500 µL de la mezcla de RIPA+1% IP utilizando un “Bullet Blender Storm”, ajustando las condiciones de tiempo y velocidad a cada tipo de tejido, siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

En ambos casos, tras incubar el homogenado durante 20 min en hielo, agitando en vórtex cada 5 min, se centrifugó a 20.000 *xg* durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante fue congelado a -80 °C hasta su uso, separando una alícuota para la posterior determinación de la concentración de proteínas (apartado 3.13.2).

3.11.2. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se prepararon geles separadores de poliacrilamida del 5-12% (p/v), dependiendo del tamaño molecular de la proteína de interés, en Tris-HCl utilizando el soporte del sistema “Mini-Protean II Cell”. Una vez que el gel separador había polimerizado, se depositó encima el gel concentrador (4% de poliacrilamida) junto con el peine y se dejó polimerizar a temperatura ambiente.

Se mezcló el homogenado de proteínas con la solución Laemmli 2x (0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 0,004% azul de bromofenol y 5% β-mercaptoetanol). Según las recomendaciones para la detección de la proteína de interés con los anticuerpos específicos, algunas muestras se desnaturalizaron mediante calentamiento durante 5 min a 100 °C. Se cargaron 20-100 µg de proteínas en cada pocillo, así como un marcador de pesos moleculares (“Precision Plus ProteinTM Standards”, “PageRuler Plus Prestained Protein Ladder” o “Prestained SDS-PAGE Standards, low range”), y se desencadenó la electroforesis vertical en una cubeta con solución de migración (25 mM

Tris, 192 mM L-glicina y 1% SDS) a una corriente constante de 15 mA para el gel concentrador y 30 mA para el gel separador, durante el tiempo necesario para una correcta resolución de la proteína de interés.

3.11.3. Transferencia

Terminada la electroforesis, se realizó una transferencia húmeda de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Para ello se utilizó una cubeta llena de tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM L-glicina y 20% metanol), frío y en agitación, conectada a una fuente de alimentación con corriente constante (250 mA) durante 90-120 min, en función del peso molecular de la proteína de interés.

3.11.4. Inmunodetección

Una vez obtenida la membrana, en ocasiones esta se tiñó con Rojo Ponceau para ver la carga total de proteínas. A continuación, se realizó un bloqueo de 1 h a temperatura ambiente y en agitación con albumina sérica bovina (BSA) o leche descremada al 1-5% (p/v) diluida en Tampón Tris salino-Tween (TBS-T; 2,42 g/l Tris base, 8 g/l NaCl, pH 7,6; suplementado con 0.2% v/v Tween 20).

Seguidamente se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente, a 4 °C y en agitación. Los anticuerpos primarios se utilizaron diluidos en leche o BSA al 0-5% (p/v) en TBS-T, según las recomendaciones de la casa comercial (Tabla MM5).

Tabla MM5: Anticuerpos primarios y condiciones empleadas para detectar proteínas humanas y murinas por Western blot.

Antígeno	Especie de origen	Dilución	Proteína de bloqueo
GAPDH	<i>Mus musculus</i>	1:1000	Leche 5%
α -Tubulina	<i>Mus musculus</i>	1:5000	BSA 5%
ACOX2	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:300	Sin Bloqueo
Acox2	<i>Mus musculus</i>	1:100	Leche 1%
V5	<i>Mus musculus</i>	1:4000	Leche 5%
GRP78	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:300	Leche 1%
CHOP	<i>Mus musculus</i>	1:500	BSA 1%
STAT-3	<i>Mus musculus</i>	1:2000	BSA 5%
pY705-STAT3	<i>Mus musculus</i>	1:1000	BSA 5%
OSM	<i>Capra aegagrus hircus</i>	1:500	BSA 5%

V5: etiqueta V5. OSM: Oncostatina M. BSA: Albumina sérica bovina.

Finalmente, se hicieron tres lavados con TBS-T de 5-15 min a temperatura ambiente y en agitación, se incubó la membrana 1 h con el anticuerpo secundario a una dilución 1:2000 en leche al 5% (p/v) en TBS-T. Los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa se escogieron en función de la especie en la que se había producido el anticuerpo primario, salvo en el caso de la detección de la OSM, para la que se usó un anticuerpo primario biotinilado. Después de hacer tres lavados más con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo, se procedió al revelado.

3.11.5. Revelado

Para la detección se utilizó un método quimioluminiscente y un equipo de análisis de imagen LAS-4000. Las membranas se incubaron 1 min en oscuridad con los reactivos ECL (“Enhanced ChemioLuminiscence”) y los tiempos de exposición en el equipo de imagen se adecuaron a la señal obtenida en cada caso.

3.12. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

3.12.1. Fijación

Las células se sembraron en pocillos de placa de 24 pocillos con 500 µl de medio, sobre un cubreobjetos circular y a una densidad adecuada para obtener una confluencia del 60-90% en el momento de la fijación. Para ello, y en función del anticuerpo y la proteína a marcar, se llevó a cabo una fijación de 1 min con metanol puro, almacenado a -20 °C, o se utilizó paraformaldehído al 4% (p/v), incubando a temperatura ambiente durante 20 min, seguido de un paso de permeabilización con Triton X-100 al 0,01-0,5% (v/v) durante 4 min. En todos los casos se realizaron 4 lavados con PBS a continuación.

3.12.2. Inmunodetección

El cubreobjetos con las células fijadas se incubó a temperatura ambiente durante 30 min con suero bovino fetal al 5% (v/v) disuelto en PBS, para bloquear las uniones inespecíficas. Terminado el bloqueo, los cubreobjetos se cubrieron con la solución de anticuerpos primarios correspondientes disueltos en PBS (Tabla MM6) y se incubaron durante 1 h. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS y se llevó a cabo la incubación, durante 1 h en oscuridad, con el anticuerpo secundario apropiado: anti-IgG de ratón o conejo conjugado con Alexa Fluor-488® o Alexa Fluor-594® (dilución 1:1000) y con DAPI para teñir los núcleos (dilución 1:5000). En el caso de anticuerpos primarios ya conjugados, estos se incubaron en las mismas condiciones que

las indicadas para los anticuerpos secundarios fluorescentes. Después de tres lavados de 10 min con PBS, se añadió medio de montaje, se colocó el cubreobjetos sobre un portaobjetos, de forma que las células marcadas quedaran situadas entre ambas superficies de vidrio, y se selló con esmalte de uñas. La visualización del marcaje se realizó en un microscopio confocal.

Tabla MM6: Anticuerpos primarios y condiciones empleadas para detectar proteínas humanas por inmunofluorescencia.

Antígeno	Especie de origen	Dilución
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:100
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	<i>Mus musculus</i>	1:100
V5 - DyLight 650	<i>Mus musculus</i>	1:65
V5	<i>Mus musculus</i>	1:800
PMP70	<i>Mus musculus</i>	1:250
Catalasa	<i>Mus musculus</i>	1:500
ACOX2	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:50

V5: etiqueta V5.

3.13. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.13.1. Valoración de ácidos nucleicos

Las distintas muestras de ácidos nucleicos se cuantificaron espectrofotométricamente determinando la absorción a una longitud de onda de 260 nm en un NanoDrop 1000, modificándose el coeficiente de extinción en función del tipo de muestra. Además, la posible contaminación con proteínas, solventes orgánicos, AEDT y otros, se estimó mediante la relación de absorbancias a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm (260/280), y 260 nm y 230 nm (260/230), respectivamente.

3.13.2. Valoración de proteínas totales

Para medir la concentración total de proteínas se utilizó una modificación del método de Lowry realizada por Markwell (Markwell *et al.*, 1978), que se basa en la reducción de las proteínas con cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolibdico fosfotúngstico con las proteínas tratadas. El producto resultante puede ser determinado espectrofotométricamente. Como patrón se utilizó BSA.

3.13.3. Determinación de la viabilidad celular

El test de formazán es un método colorimétrico utilizado para cuantificar el número de células vivas en ensayos de proliferación celular. Su fundamento se basa en la transformación por las deshidrogenasas mitocondriales del MTT, una sal de tetrazolio de coloración amarilla, en formazán, un compuesto insoluble de color violeta. La cantidad de formazán producido se puede cuantificar espectrofotométricamente y es directamente proporcional al número de células vivas.

Para la determinación de la viabilidad celular, en primer lugar, se añadieron 110 μ l de 0,5 mg/ml MTT en medio de cultivo en cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Tras 4 h de incubación a 37 °C, se añadió sobre la mezcla anterior 100 μ l/pocillo de la solución de lisis (10% SDS y 10 mM HCl en agua). Finalmente, tras 12 h de incubación a 37 °C, se determinó la intensidad del color en el sobrenadante por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm en un lector de ELISA. Como blanco se utilizaron pocillos de la placa en los que no se habían sembrado células, pero sí habían sido incubados con las distintas concentraciones de los compuestos ensayados y posteriormente con medio de cultivo suplementado con MTT y solución de lisis de igual forma que el resto de los pocillos.

3.13.4. Determinación de marcadores bioquímicos de daño hepático

Para la determinación de parámetros bioquímicos de daño hepático en las muestras de suero del modelo murino de Deficiencia Parcial de ACOX2 se utilizó un analizador automático de química seca “Spotchem EZ SP-4430”.

3.13.5. Estudios histológicos

Se realizaron cortes representativos del hígado de 5 μ m de grosor en un criostato, fijándose el tejido sobre portaobjetos mediante presión. Los tejidos fueron conservados a -80 °C hasta su fijación con paraformaldehído al 4% durante 20 min, se tiñeron por los métodos de hematoxilina-eosina, se deshidrataron por inmersión en soluciones crecientes de alcohol y xilol, y se realizó el montaje con entellán para su estudio al microscopio óptico.

3.13.6. Medida de ácidos biliares por HPLC-MS/MS

Previo a su análisis por HPLC-MS/MS, las muestras se calentaron en una solución alcalina de NH_4HCO_3 o NaOH para separar los ácidos biliares (ABs) de su unión a proteínas, y se les añadió ácido nor-desoxicólico (norDCA) como estándar interno.

Además, en función del tipo de muestra, los ABs se extrajeron mediante uno de los siguientes procedimientos:

- Para los tejidos, se pesaron 20-50 mg del mismo y se homogeneizó en agua ultrapura utilizando un “Bullet Blender Storm”. Este homogenado se mezcló con etanol absoluto y se incubó 2 h a 65 °C para obtener un extracto del contenido hidrofóbico y anfipático del tejido, se centrifugó, y se repitió el procedimiento. Posteriormente, la muestra se purificó mediante cartuchos Sep-Pak con relleno de octadecilsilano (C18).
- Los medios de cultivo se procesaron con cartuchos Sep-Pak C18. Los ABs retenidos en las columnas se extrajeron con metanol.
- Debido a su alto contenido en ABs, las muestras de bilis se diluyeron ≈ 200 veces directamente en metanol y se inyectaron en el HPLC-MS/MS.

En todos los casos, las muestras se llevaron a sequedad bajo corriente de aire y se resuspendieron en metanol. Para la separación cromatográfica se empleó una columna de fase reversa, utilizándose un método de elución en gradiente usando como fase móvil una mezcla de metanol y agua. Se comenzó a trabajar con 73:27 de metanol/agua y se fue incrementando la concentración de metanol en la mezcla hasta el 93%, de manera lineal durante 10 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 2500 V. Se emplearon los siguientes modos de trabajo:

- Modo de trabajo MRM: se utiliza el modo SIM, por el cual se selecciona una relación m/z específica en ambos cuadrupolos, de forma que se puede seguir la transición específica de cada uno de los iones precursores (ion molecular - H^+) a

los respectivos iones producto resultantes. Esto permite identificar y cuantificar ABs conocidos, de los que se dispone de un patrón comercial, de modo que se conoce su tiempo de retención en el HPLC en las condiciones descritas en la metodología, así como las relaciones m/z que presentan y sus transiciones. En el caso de los ABs tauroconjugados se monitorizó el ion hijo 80,2 m/z , correspondiente al grupo SO_3^- de la taurina, mientras que en el caso de los glicoconjugados se siguió el ion hijo 74 m/z , correspondiente a la glicina. En el caso de los ABs libres no es posible fragmentar el ion molecular obteniendo iones hijos característicos, por lo que se siguió la transición de ion molecular a ion molecular, por ejemplo, de 407,4 m/z a 407,4 m/z en el caso del ácido cólico.

- Modo de trabajo SCAN: se utiliza el modo SCAN en ambos cuadrupolos, lo que permite obtener un barrido completo de todas las relaciones m/z en un rango.
- Modo de trabajo PRECURSOR ION: se utiliza el modo SCAN en el primer cuadrupolo, y el SIM en el segundo. De esta forma, se pueden seleccionar los iones hijos de relación m/z 80,2, correspondiente a la taurina, o 74 m/z , correspondiente a la glicina, e identificar en el espectro la relación m/z de todos los iones padre que los generan, es decir, todos aquellos ABs que se encuentran conjugados con taurina o con glicina.

Para la cuantificación, se construyeron rectas patrón para cada una de las especies moleculares de ABs de los que se disponía de patrón comercial, mediante inyección de soluciones metanólicas con concentraciones de cada AB entre 0,1 y 10 μM (Ye *et al.*, 2007).

3.14. ESTUDIOS *IN SILICO*

3.14.1. Búsqueda de variantes genéticas en el gen *ACOX2*

A través del navegador del Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI) (Geer *et al.*, 2010) se hizo una búsqueda en la base de datos del Proyecto 1000 genomas para identificar mutaciones descritas en la población que pudieran estar implicadas en la “Deficiencia parcial de la enzima *ACOX2*”. Los criterios de inclusión fueron:

- Frecuencia alélica mínima 1000G MAF<0,01.
- Polimorfismo de nucleótido único (SNP).
- Generar una mutación con cambio de sentido.

3.15. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

El tratamiento de datos y estudio estadístico se realizó con los programas Excel y GraphPad PrismTM.

Los resultados se han expresado como la media \pm desviación estándar (SD) o error estándar de la media (EEM).

Para calcular la significación estadística de las diferencias al comparar dos medias se utilizó el test *t* de Student de valores pareados o no pareados, según el caso. Para las comparaciones entre varios grupos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni para la identificación de los grupos entre los que había diferencias.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CASO CLÍNICO: DEFICIENCIA PARCIAL DE ACOX2 (APD)

Hasta la fecha se han descrito una gran variedad de alteraciones en el metabolismo de los ABs que provocan patologías con consecuencias que varían desde leves a severas, dependiendo de la enzima afectada y el grado de deficiencia. Los trastornos que afectan a las etapas de la síntesis de ABs que ocurren dentro del peroxisoma son la etiología de un grupo heterogéneo de patologías denominadas enfermedades peroxisomales, de las que las más frecuentes son el síndrome de Zellweger y la adrenoleucodistrofia neonatal (Aubourg *et al.*, 2013). Debido a que los defectos del metabolismo de los ABs son poco frecuentes y se manifiestan con síntomas inespecíficos, estas enfermedades no son evidentes cuando se atiende al paciente por primera vez. Su correcto diagnóstico suele alcanzarse tras descartar otras causas de enfermedad hepática, y mediante el análisis de muestras de sangre y orina para la detección de especies moleculares de ABs anormales producidos debido a un bloqueo en las vías metabólicas, o pruebas genéticas que detectan mutaciones en los genes asociados con las enzimas involucradas en la síntesis de ABs (Vaz *et al.*, 2017).

Esta Tesis Doctoral es la continuación del estudio llevado a cabo durante mi Trabajo de Fin de Grado (Alonso-Peña, 2014) de un caso clínico que fue atendido por el Dr. Jesús Prieto Valtuille, especialista en Medicina Interna y en Hepatología de la Clínica Universidad de Navarra.

El paciente era un hombre joven de 16 años cuando fue atendido por primera vez en 2009 debido a una hipertransaminasemia persistente de origen desconocido durante 2 años, después de haber sufrido una hepatitis aguda inducida por la administración combinada de ibuprofeno y diclofenaco tras una intervención quirúrgica necesaria por una lesión traumatológica en una rodilla. La hipertransaminasemia alcanzó niveles entre 2 y 5 veces superiores a los límites normales, con fluctuaciones coincidentes con la toma de AINES y penicilamina (Tabla R1). Inicialmente, el paciente también presentó hiperbilirrubinemia y linfopenia, así como niveles ligeramente disminuidos de ceruloplasmina, ferroxidasa de tipo I y α 1-antitripsina, sin ningún otro síntoma asociado.

Las causas más comunes de hipertransaminasemia, como la celiaquía, infecciones virales y enfermedades autoinmunes, se descartaron al comprobarse que las serologías

virales, los anticuerpos y el perfil de celiacía y tiroideo eran normales. Igualmente se descartaron enfermedades congénitas como la enfermedad de Wilson. El perfil bioquímico de función hepática no coincidía con el de ninguna variante conocida de colestasis familiar intrahepática (BRIC o PFIC).

La exploración abdominal con ecografía mostró una morfología y tamaño normal del hígado, así como de la vesícula y el árbol biliar, descartándose la colelitiasis como causa etiopatogénica. Una biopsia hepática realizada en 2010 (Figura R1) permitió observar la acumulación intrahepática de pigmentos biliares, que se interpretó como un signo de colestasis, si bien la histología general del hígado era normal.

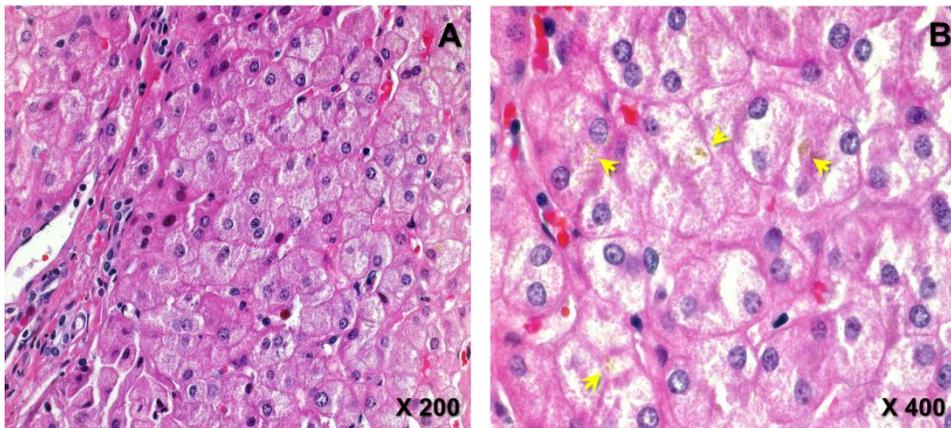


Figura R1: Microfotografías representativas de una biopsia hepática del paciente sujeto del estudio. Se observa una arquitectura hepática normal (A) y acúmulo de pigmentos biliares en el interior de los hepatocitos (flechas amarillas) (B).

Finalmente, en 2012 se consiguió la remisión de la hipertransaminasemia mediante la administración de un tratamiento combinado de resincolestiramina, acetilcisteína y vitamina E (Tabla R1).

Debido a sus particularidades, decidimos estudiar a fondo el caso presentado. Se recibieron muestras biológicas del paciente (raspado bucal, suero y orina), las cuales se tomaron cumpliendo los requisitos éticos y legales que marca la legislación vigente.

Tabla R1: Análisis de marcadores séricos de funcionalidad hepática del paciente sujeto del estudio.

	Dic 2007	Ene 2008	Feb 2008	Abr 2008	Jul 2008	Feb 2009	Mar 2009	Jul 2009	Ene 2010	Jul 2010	Oct 2010	Nov 2010	Jul 2011	Dic 2011	Feb 2012	Ene 2013	Feb 2014
Incidencias	(1)	–	(2)	–	–	–	–	–	–	–	(3)	(3)	–	(4)	(4)	(4)	(4)
ALT (UI/l)	510	256	316	93	54	116	55	115	229	49	143	333	56	76	16	39	14
AST (UI/l)	149	71	90	31	28	54	26	39	67	20	39	77	18	30	22	22	19
ALP (UI/l)	175	197	195	210	184	146	176	136	108	61	63	ND	60	50	91	66	79
GGT (UI/l)	44	26	21	16	13	15	12	12	18	14	15	ND	12	11	7	14	6
TBIL (mg/dl)	ND	ND	1,78	2,24	1,46	2,95	2,06	ND	ND	2,37	2,53	ND	2,58	1,90	1,60	1,40	2,30
DBIL (mg/dl)	ND	ND	0,35	0,65	0,43	0,36	0,62	ND	ND	0,63	0,62	ND	0,69	0,60	ND	0,52	ND

Valores de referencia: Alanina aminotransferasa (ALT), 0-41 UI/l; aspartato aminotransferasa (AST), 1-37 UI/l; fosfatasa alcalina (ALP), 40-130 UI/l; γ -glutamyl transpeptidasa (GGT), 0-60 UI/l; bilirrubina total (TBIL), 0-1,3 mg/dl; bilirrubina directa o conjugada (DBIL), 0-0,4 mg/dl. ND, no disponible. Incidencias: (1) Intervención quirúrgica y tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos (AINES); (2) Tratamiento con AINES; (3) Tratamiento con D-penicilamina; (4) Tratamiento con resinolectiramina.

4.1.1. Análisis del perfil de ABs

Los resultados observados al tratar al paciente con colestiramina hicieron sospechar que existía una alteración en el metabolismo de los ABs. Por ello, se llevó a cabo un análisis por HPLC-MS/MS de las especies moleculares de ABs presentes en la orina y el suero (Tabla R2) del paciente.

En primer lugar, se utilizó el modo analítico MRM, con el objetivo de determinar la concentración de los ABs C24 mayoritarios, encontrándose niveles anormalmente bajos de estas moléculas tanto en la orina ($0,07 \pm 0,02 \mu\text{M}$ para los ABs totales, frente a $1,18 \pm 0,13 \mu\text{M}$ en individuos sanos) como en el suero ($0,06 \pm 0,01 \mu\text{M}$, frente a $4,68 \pm 0,61 \mu\text{M}$) (Tabla R2). Hay que tener en cuenta que, aunque el paciente estaba siguiendo un tratamiento con colestiramina que reduce parcialmente la absorción intestinal de ABs, esto no explica la presencia de niveles más de 20 veces menores de ABs respecto a los determinados en sujetos sanos. También se encontró que la proporción relativa de ABs conjugados, respecto a los niveles totales, era mayor en el paciente (88%) que en los individuos sanos (35,5%), lo que sugería que el trastorno metabólico no se debía a una alteración de la enzima BAAT, responsable de la conjugación de los ABs.

En el modo analítico SCAN del HPLC-MS/MS se buscaron, de entre todas las masas del rango seleccionado (100 a 800 m/z), aquellas que podrían corresponder a los precursores biosintéticos de los ABs, encontrándose en suero y orina un doble pico (tiempos de retención de 9,4 y 9,8 min) con una relación m/z de 556,3, que no aparecía en los individuos sanos (Figura R2), y que se sospechó que podían corresponder a los conjugados con taurina de los isómeros 25R y 25S del ácido $3\alpha, 7\alpha, 12 \alpha$ -trihidroxi-5 β -colestanoico (THCA), uno de los precursores en la síntesis del CA. Para aclarar esta posibilidad, las muestras fueron re-analizadas en el Servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Salamanca mediante un HPLC-MS/TOF. Se pudo identificar por masa exacta el tauro-THCA (Figura R2). Aunque de forma minoritaria en comparación con el THCA, también se observaron dos picos que se sospechó que podrían corresponder a los dos estereoisómeros del DHCA, precursor del CDCA (datos no mostrados).

Tabla R2: Análisis de las especies de ácidos biliares (ABs) presentes en la orina y el suero del paciente sujeto del estudio.

	Orina		Suero	
	Control	Paciente	Control	Paciente
AB C24 totales (μM)	1,18±0,13	0,08±0,02	4,68±0,61	0,06±0,01
Tauroconjugados (μM)	0,28±0,11	0,06±0,02	0,67±0,08	0,01±0,01
Gliconjugados (μM)	0,14±0,02	0,01±0,01	2,37±0,59	0,04±0,01
No conjugados (μM)	0,76±0,18	0,01±0,01	1,65±0,33	0,01±0,01
AB C24 (nM)				
Glicocólico	71±8	6±2	478±111	9±3
Glicoenodesoxicólico	33±8	2±1	1049±278	24±1
Glicodesoxicólico	23±4	<1	672±199	<1
Glicolitocólico	<1	<1	40±19	<1
Glicoursodesoxicólico	15±5	<1	127±40	<1
Taurocólico	15±4	6±5	136±9	3±1
Tauroenodesoxicólico	6±2	1±1	203±53	8±4
Taurodesoxicólico	2±1	<1	129±34	<1
Taurolitocólico	<1	<1	2±1	<1
Taoursodesoxicólico	<1	<1	23±9	<1
Taurosulfolitocólico	247±115	52±15	96±15	<1
Cólico	572±149	3±1	242±157	2±1
Quenodesoxicólico	28±9	<1	604±246	1±1
Desoxicólico	105±17	1±1	529±151	6±3
Litocólico	2±1	<1	145±100	<1
Ursodesoxicólico	<1	<1	42±14	<1
AB C27 totales (nM)				
Taurotrihidroxicolestanoico	<1	2±1	3±2	32±6
Taurodihidroxicolestanoico	<1	1±1	<1	9±1
Trihidroxicolestanoico	<1	4±1	<1	11±2

Los valores en el paciente son la media±SD de 4 medidas realizadas en dos muestras diferentes recogidas con un intervalo de 6 meses. Las muestras Control se recogieron de 5 varones sanos de edad similar al paciente sujeto del estudio y se representan como media±SD.

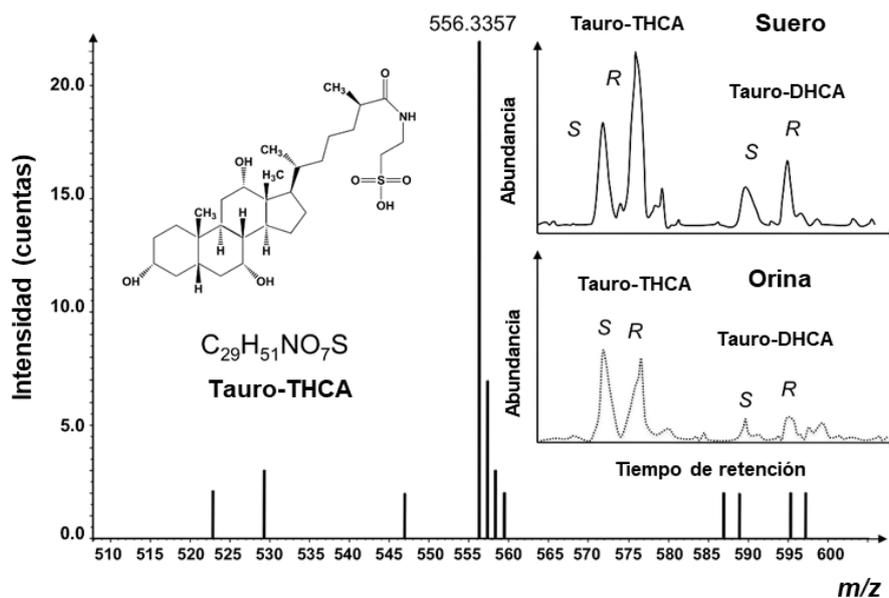


Figura R2: Espectro de masas HPLC-TOF del compuesto encontrado en el suero del paciente sujeto del estudio. La masa exacta (556,3357) coincide con la del conjugado con taurina del ácido trihidroxi-5 β -colestanoico (THCA). El inserto contiene cromatogramas representativos de suero y orina obtenidos por HPLC-MS/MS en modo MRM que muestran los picos de las transiciones m/z 556,3 a 80,2, que corresponde a los isómeros 25*S* y 25*R* del conjugado con taurina del THCA, y 540,3 a 80,2, que corresponde a los isómeros 25*S* y 25*R* del conjugado con taurina del ácido dihidroxi-5 β -colestanoico (DHCA).

La acumulación de tauro-THCA, ácido pristánico y otros intermediarios de la síntesis de ABs en plasma, como se ha comentado previamente, ya fue descrita por Ferdinandusse *et al.* en pacientes con una enfermedad peroxisomal causada por deficiencia en la enzima racemasa AMACR (Ferdinandusse *et al.*, 2001), que transforma los ésteres (*R*)-metilacil-CoA en sus enantiómeros *S*. Sin embargo, el espectro que obtuvieron por LC-MS/MS de los ABs del plasma de sus pacientes sólo mostró que acumulaban el isómero *R* del tauro-THCA, es decir, el sustrato de la enzima AMACR, lo que indicaba una pérdida de funcionalidad de dicha enzima. Puesto que en las muestras del paciente de nuestro estudio observábamos la acumulación de ambos estereoisómeros, descartamos una deficiencia de AMACR como causante de su patología.

4.1.2. Análisis genético

La identificación del tauro-THCA como principal metabolito acumulado en el suero del paciente parecía indicar la existencia de alguna alteración en alguno de los pasos peroxisomales en la ruta biosintética de los ABs. El análisis del perfil de ABs, es decir, la presencia de ABs conjugados y de los dos estereoisómeros del THCA, permitió descartar una deficiencia en las enzimas BAAT y AMACR, por lo que se llevó a cabo la

amplificación y secuenciación de todos los exones y las regiones intrónicas que flanqueaban los exones del ARNm del resto de enzimas implicadas en la ruta, ACOX2, DBP y SCPx (Tabla R3), cuya deficiencia podría explicar la acumulación en suero y orina del metabolito intermediario THCA.

Tabla R3: Definición, nomenclatura y frecuencia alélica de las mutaciones encontradas en los exones y en la zona proximal de los intrones que flanquea los exones de las enzimas peroxisomales de la síntesis de ácidos biliares del paciente sujeto del estudio.

Proteína (Gen)	Variación de aminoácido	Variación de nucleótido	Genotipo	Localización en el gen	Referencia SNP	MAF
ACOX2 (<i>ACOX2</i>)		c.-26T>C	G/G	5'-UTR	rs4681862	A=7,6%
	R225W	c.673C>T	A/A	Exón 6	rs150832314	A=0,031%
DBP (<i>HSD17B4</i>)		c.-75C>G	C/G	5'-UTR	rs26180	G=43,0%
	R106H	c.317G>A	G/A	Exón 7	rs25640	A=45,1%
	I559V	c.1675A>G	A/G	Exón 20	rs11205	G=41,9%
	E576E	c.1728G>A	G/A	Exón 21	rs1004706877	ND
		c.113-68delAC	AC/-	Intrón 3	rs10601221	Del=51,8%
		c.220+167T>A	T/A	Intrón 4	rs553273092	A=0,01%
		c.1210-78T>C	T/C	Intrón 14	rs257969	C=28,3%
		c.1209+65delTATCT	TATCT/-	Intrón 15	rs146145595	Del=1,1%
		c.1261+46C>T	C/T	Intrón 15	rs460945	T=33,3%
		c.1261+47A>G	A/G	Intrón 15	rs455949	G=48,3%
		c.1574-200delTT	TT/-	Intrón 19	rs370713910	N.D.
		c.1767+57C>T	C/T	Intrón 22	rs2636961	C=35,8%
		c.1855-43A>G	A/G	Intrón 22	rs10036783	G=0,4%
	c.1993+74G>C	G/C	Intrón 23	rs17145464	C=28,3%	
SCPx (<i>SCP2</i>)		c.396+79A>G	A/G	Intrón 5	rs75463479	G=0,3%

MAF (del inglés *Minor Allele Frequency*) es la frecuencia del alelo minoritario en una población. Los datos se han obtenido del estudio “gnomAD – Exomes”, actualizado en octubre de 2018, y que consta de 246.144 muestras. La posición de los nucleótidos se refiere a la ORF de las secuencias silvestres NM_003500 (*ACOX2*), NM_000414 (*HSD17B4*) y NM_002979 (*SCP2*). La posición de los aminoácidos se basa en las proteínas NP_003491 (*ACOX2*) y NP_000405 (*DBP*). ND, no disponible.

De ellas, la mayoría se encontraban en regiones no codificantes sin relevancia conocida en el procesamiento del ARNm, en la expresión génica, ni en la funcionalidad de la proteína. Asimismo, se encontraron algunos polimorfismos con cambio de sentido que, a pesar de aparecer en la secuencia codificante de *HSD17B4*, son altamente frecuentes en la población, por lo que pareció poco probable que fuesen la causa subyacente de una situación clínica poco frecuente. También se identificó un SNP en homocigosis en la región 5'UTR del gen *ACOX2*, c.-26T>C (NCBI, rs4681862), que parece estar asociado con variaciones en el *splicing* alternativo del gen (Nembaware *et al.*, 2008), y una

mutación puntual en la secuencia codificante de *ACOX2*, c.673C>T, que provoca un cambio de sentido en la secuencia de aminoácidos de la enzima, p.Arg225Trp (R225W), pudiendo afectar a la funcionalidad de la misma.

De nuevo, en el caso del polimorfismo c.-26T>C, la frecuencia alélica que se ha descrito en estudios de secuenciación masiva es demasiado elevada (7,6%) para que, siendo esta la causa de la enfermedad, no se haya descrito antes en la población cercana genéticamente al paciente o en la población en general. Por ello, se descartó que este polimorfismo fuera la causa directa y única de la enfermedad de nuestro paciente. Por otro lado, en las bases de datos del NCBI se encontró que la mutación c.673C>T se describía como un SNP (rs150832314), aunque su frecuencia alélica era muy baja, del 0,031% en heterocigosis, y nunca se había descrito en homocigosis. Su efecto no había sido estudiado previamente, pero las predicciones con los programas informáticos SIFT y PolyPhen-2 indicaban que el cambio R225W generado era deletéreo para la actividad de la enzima.

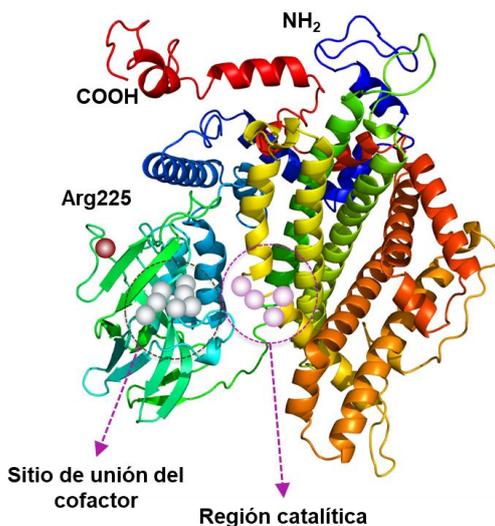


Figura R3: Predicción de la estructura terciaria de la proteína ACOX2. Se indica la proximidad de la Arginina 225 a las regiones de unión del cofactor FAD y del centro catalítico de la enzima.

De acuerdo con el modelo de predicción de la estructura tridimensional de ACOX2 (Figura R3), desarrollado en base a la estructura determinada por cristalización del ortólogo de rata ACO-II (Nakajima *et al.*, 2002), sugerimos que la mutación encontrada en el paciente afecta a una región de superposición de los dominios C-terminal y pseudo-barril β de la enzima, que parecen estar implicados en la unión del cofactor FAD, la dimerización y la actividad catalítica de la enzima.

4.1.3. Estudio genealógico

Dada la alta probabilidad de que la patología estuviera determinada por un componente genético, se llevó a cabo el análisis del perfil de ABs en muestras de suero de la familia (padre, madre y hermana) del paciente de estudio, todos nacidos en dos valles cercanos del País Vasco (Tabla R4; Figura R4).

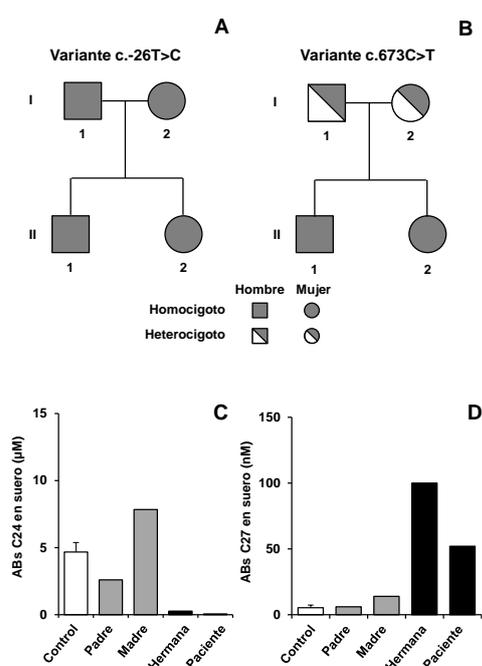


Figura R4: Análisis del genotipo (A, B) y fenotipo (C, D) en los familiares de primer grado del paciente sujeto del estudio. Árboles genealógicos de la familia afectada para las mutaciones encontradas en el gen *ACOX2*, c.-26T>C (A) y c.673C>T (B). Análisis de la concentración de ácidos biliares (ABs) de 24 carbonos (C24) e intermediarios de 27 carbonos (C27) en suero. Las muestras control (n = 5) se recogieron de varones sanos de edad similar a la del paciente sujeto del estudio y los valores se representan como la media±SD.

Tanto el padre como la madre presentaron niveles de ABs C24 dentro del rango normal (2,57 y 7,84 µM, respectivamente), e incluso la concentración de CA se encontró por encima de la media de los sujetos control (586 y 1969 nM vs. 242±157 nM). Asimismo, la concentración de los intermediarios de síntesis de ABs C27 eran bajos y semejantes a los del grupo control (6 y 14 nM vs. 3±2 nM). Sin embargo, la única hermana del paciente, tres años más joven que él, presentaba niveles de ABs C24 anormalmente bajos (0,28 nM) y de ABs C27 anormalmente altos (100 nM), destacando el tauro-THCA como principal intermediario acumulado (56 nM). Hay que resaltar que las concentraciones de las distintas especies de ABs en el suero de la hermana eran superiores a las del paciente, aunque esta diferencia podría deberse al tratamiento con colestiramina al que se había sometido al paciente, que conlleva la retención de ABs en el intestino y su posterior eliminación en heces.

Tabla R4: Análisis de las especies de ácidos biliares (AB) presentes en suero en la familia de primer grado del paciente sujeto del estudio.

	Control	Paciente	Hermana	Padre	Madre
AB C24 totales (µM)	4,68±0,61	0,06±0,01	0,28	2,57	7,84
Tauroconjugados (µM)	0,67±0,08	0,01±0,01	0,04	0,10	0,34
Glicoconjugados (µM)	2,37±0,59	0,04±0,01	0,11	0,90	3,53
No conjugados (µM)	1,65±0,33	0,01±0,01	0,13	1,56	3,97
AB C24 (nM)					
Glicocólico	478±111	9±3	23	117	589
Glicoquenodesoxicólico	1049±278	24±1	30	399	1867
Glicodesoxicólico	672±199	<1	42	215	877
Glicolitocólico	40±19	<1	<1	4	61
Glicoursodesoxicólico	127±40	<1	17	110	134
Taurocólico	136±9	3±1	3	13	49
Tauroquenodesoxicólico	203±53	8±4	8	38	147
Taurodesoxicólico	129±34	<1	7	23	68
Taurolitocólico	2±1	<1	<1	1	7
Taoursodesoxicólico	23±9	<1	<1	3	2
Taurosulfolitocólico	96±15	<1	18	23	70
Cólico	242±157	2±1	19	586	1969
Quenodesoxicólico	604±246	1±1	9	161	709
Desoxicólico	529±151	6±3	76	691	1166
Litocólico	145±100	<1	24	117	112
Ursodesoxicólico	42±14	<1	<1	9	16
AB C27 totales (nM)					
Taurotrihidroxicolestanoico	3±2	52±6	100	6	14
Taurodihidroxicolestanoico	<1	9±1	33	<1	<1
Trihidroxicolestanoico	<1	11±2	11	<1	<1

Los valores en el paciente son la media±SD de 4 medidas realizadas en dos muestras diferentes recogidas con un intervalo de 6 meses. Las muestras Control se recogieron de 5 varones sanos de edad similar al paciente sujeto del estudio y se representan como media±SD.

El análisis genealógico de los SNP c.-26T>C y c.673C>T del gen *ACOX2* (Figura R4-A y B) reveló que todos los miembros de la familia eran homocigotos para c.-26T>C, lo que apoyaba la hipótesis de que este polimorfismo no estaba implicado en el desarrollo de la patología. Sin embargo, ambos progenitores presentaron la mutación c.673C>T en heterocigosis, mientras que sus hijos portaban dicha mutación en homocigosis, por lo que esta mutación del gen *ACOX2* podría ser la responsable de esta patología congénita, autosómica y recesiva, afectando de forma clínica o subclínica a ambos hermanos.

Un análisis detallado de la historia clínica de la hermana del paciente reveló la existencia de picos de hipertransaminasemia asociados al tratamiento con AINES (Tabla R5). Además, la retirada del tratamiento era seguida de la reversión de los niveles de transaminasas séricas a valores normales sin que fuera necesaria ninguna otra intervención, a diferencia de lo ocurrido en el caso del paciente objeto del estudio (Tabla R1).

Tabla R5: Análisis de marcadores séricos de funcionalidad hepática de la hermana del paciente sujeto del estudio.

	Jul 2012	Ene 2013	Nov 2015	Feb 2016
Incidencias	–	(1)	–	–
ALT (UI/l)	18	79	22	16
AST (UI/l)	16	50	21	20
ALP (UI/l)	ND	ND	60	60
GGT (UI/l)	ND	ND	8	8
TBIL (mg/dl)	ND	ND	2,2	ND
DBIL (mg/dl)	ND	ND	0,7	ND

Valores de referencia: Alanina aminotransferasa (ALT), 0-41 UI/l; aspartato aminotransferasa (AST), 1-37 UI/l; fosfatasa alcalina (ALP), 40-130 UI/l; γ -glutamil transpeptidasa (GGT), 0-60 UI/l; bilirrubina total (TBIL), 0-1,3 mg/dl; bilirrubina directa o conjugada (DBIL), 0-0,4 mg/dl. ND, no disponible. Incidencias: (1) Tratamiento antigripal, con infundadas sospechas de que incluyese antiinflamatorios no esteroideos.

4.1. DESARROLLO DE UN MODELO *IN VITRO* PARA LA EVALUACIÓN FUNCIONAL DE ACOX2

El estudio clínico y genético reveló la posible implicación de la mutación c.673C>T (p.R225W) del gen *ACOX2* en la etiopatogenia de la enfermedad padecida por el paciente objeto del estudio. Por ello, nos planteamos como siguiente objetivo desarrollar un modelo *in vitro* en el que se pudiera demostrar la relación causa-efecto entre la mutación encontrada y el fenotipo observado en el paciente; es decir, la acumulación de intermediarios C27 como el THCA y los bajos niveles de ácidos biliares primarios C24.

4.2.1. Síntesis de ABs en líneas celulares de origen hepático

En primer lugar, determinamos la expresión del gen *ACOX2* en distintas líneas celulares de origen hepático (Figura R5), en comparación con hígado humano sano. Todas las

líneas estudiadas presentaron un nivel de expresión de *ACOX2* considerablemente menor al del hígado, si bien la mayor expresión se observó en la línea celular HuH-6, de hepatoblastoma, con una expresión en torno al 50% del gen normalizador hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 (*HPRT1*), es decir, un 25% de la encontrada en el hígado. Las líneas celulares HepG2, de hepatoblastoma, HuH-7, de hepatocarcinoma, e IHH, derivada de hepatocitos humanos inmortalizados, presentaron un nivel de expresión de *ACOX2* bajos, mientras que en las líneas celulares Alexander, de hepatocarcinoma, y HepaRG, de hepatoma, la expresión era despreciable.

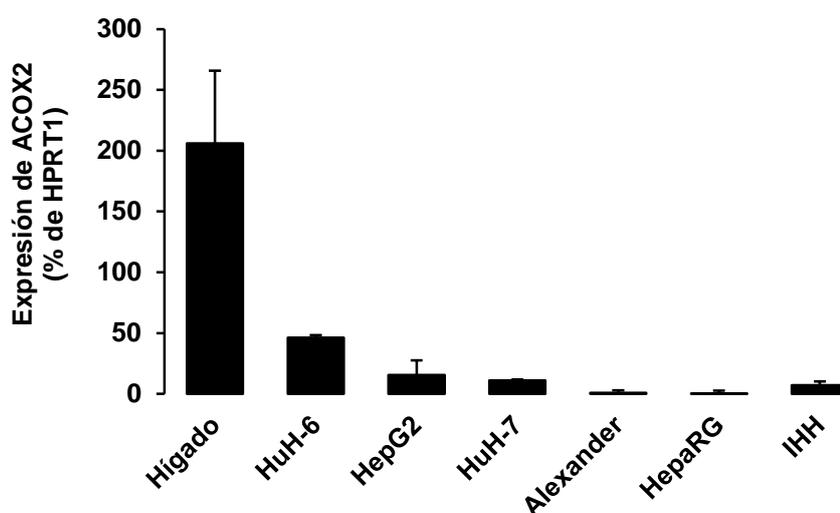


Figura R5: Expresión de *ACOX2* en hígado humano sano y en líneas celulares de hepatoblastoma (HuH-6 y HepG2), hepatocarcinoma (HuH-7 y Alexander), hepatoma (HepaRG) y derivadas de hepatocitos humanos inmortalizados (IHH). Los niveles de ARNm se determinaron por RT-qPCR y se expresan como porcentaje de la expresión de *HPRT1*. Los valores son la media \pm SD de más de cuatro determinaciones realizadas en más de dos cultivos celulares.

A continuación, determinamos la síntesis endógena de ABs por las distintas líneas celulares (Figura R6) mediante HPLC-MS/MS. Además, se incluyó en este estudio la línea celular WIF-B9, línea híbrida obtenida mediante fusión de células Fao de hepatoma de rata y fibroblastos humanos WI-38 (Decaens *et al.*, 1996), en la que nuestro grupo de investigación había descrito previamente una predominancia del metabolismo de ABs de tipo más parecido al de humano que al de rata (Monte *et al.*, 2001). Dado que el estudio de la síntesis de ABs en líneas celulares de origen hepático no era un objetivo de esta Tesis Doctoral, sino un procedimiento necesario para la puesta a punto del modelo *in vitro* que queríamos desarrollar, estas determinaciones se realizaron solamente en uno o dos cultivos.

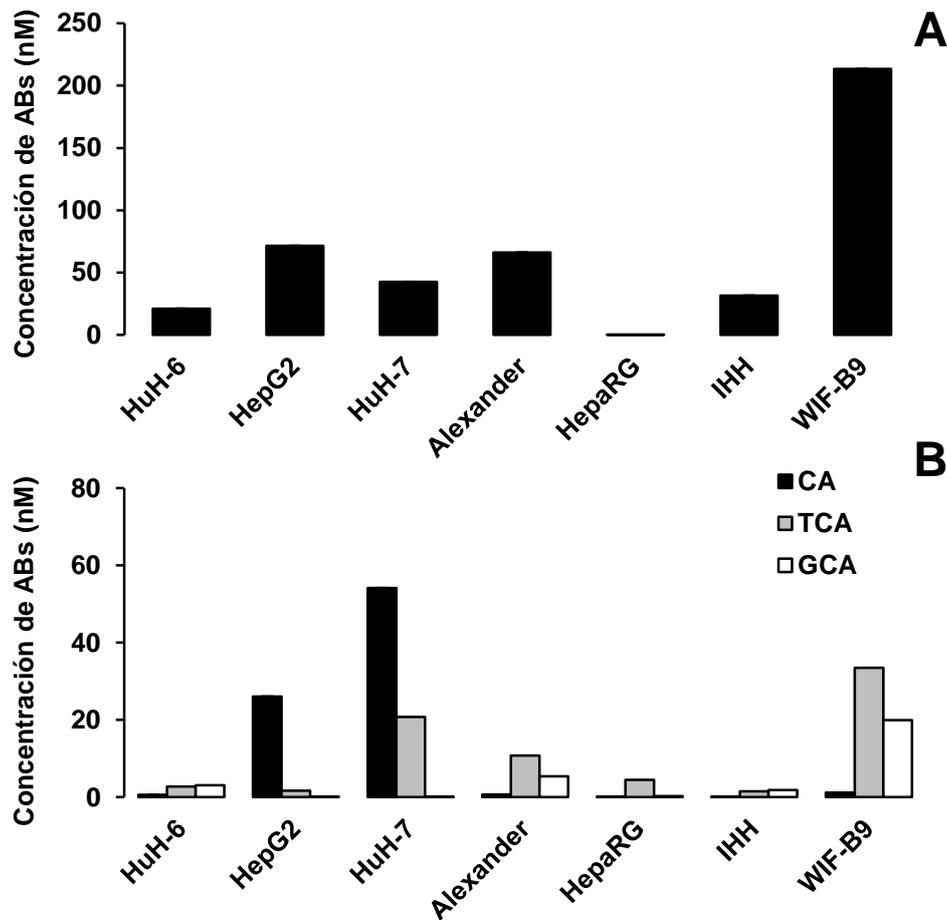


Figura R6: Nivel de síntesis de ácidos biliares (ABs) en líneas celulares de origen hepático. La concentración de ABs totales (A) y de ácido cólico (CA) y sus conjugados con taurina (ácido taurocólico, TCA) o glicina (ácido glicocólico, GCA) (B), se determinó por HPLC-MS/MS en el medio de cultivo de células cultivadas a confluencia durante 48 h. Los datos representan la concentración de ABs determinada en un experimento típico.

Como puede observarse en la Figura R6-A, las células WIF-B9 presentaron un nivel de síntesis de ABs totales superior al del resto de líneas celulares, mientras que la línea celular HepaRG presentó una biosíntesis de ABs muy baja, a pesar de ser una línea celular diferenciada y que se ha propuesto como un buen modelo preclínico para predecir el daño hepático inducido por fármacos (Bell *et al.*, 2017). Por otro lado, la línea celular HuH-6 presentó una menor concentración de ABs que el resto de líneas derivadas de tumores hepáticos, y semejantes a los encontrados en la línea celular IHH, a pesar de que la expresión de *ACOX2* era considerablemente superior (Figura R5).

No obstante, dado que el principal metabolito encontrado en el paciente era el THCA, precursor biosintético del CA, consideramos interesante analizar de forma particular la capacidad de síntesis de CA y sus conjugados por las distintas líneas celulares. Así, la

mayor síntesis de CA y sus conjugados, TCA y GCA, se observó en las líneas celulares HepG2 y HuH-7 (Figura R6-B).

Un análisis más detallado de las especies de ABs encontradas en los medios de cultivo reveló la presencia de ABs tauroconjugados y glicoconjugados en el medio de cultivo que consideramos como Control en las siguientes figuras; procedente en su mayor parte del suero bovino fetal, así como DCA, utilizado en la mezcla de antibiótico y antimicótico como agente solubilizador.

El análisis del medio de cultivo de la línea celular HepG2 (Figura R7) demostró una baja capacidad de conjugación de estas células, donde las especies mayoritarias fueron los ABs libres CA y CDCA, encontrándose también THCA. Asimismo, los ABs conjugados encontrados fueron mayoritariamente TDCA y GDCA, que eran sintetizados a partir del DCA del medio.

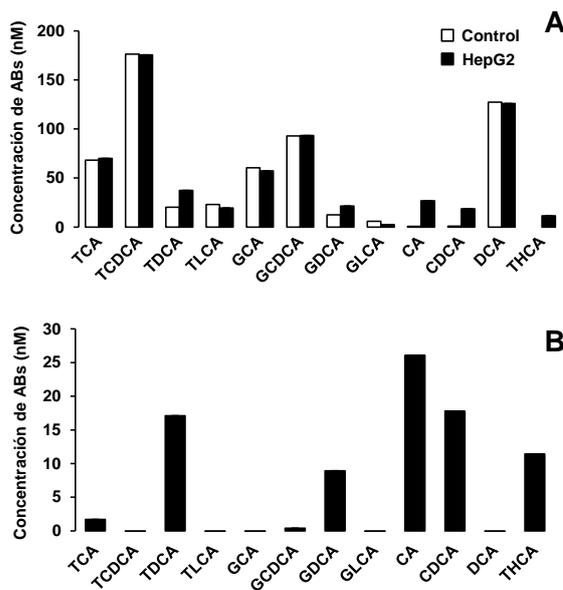
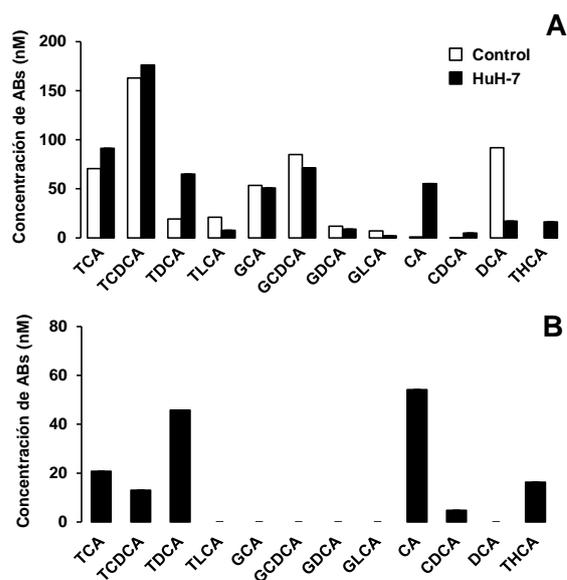


Figura R7: (A) Concentración de diferentes especies de ácidos biliares (ABs) determinada por HPLC-MS/MS en el medio de cultivo (Control) y después de cultivar células HepG2 a confluencia durante 48 h. (B) Síntesis de ABs por las células HepG2, calculada a partir de la diferencia entre la concentración de ABs a las 48 h de cultivo y el Control. Los datos representan la concentración de ABs determinada en un experimento típico. TCA, ácido taurocólico; TCDCA, ácido tauroquenodesoxicólico; TDCA, ácido taurodesoxicólico; TLCA, ácido taurolitocólico; GCA, ácido glicocólico; GCDCA, ácido glicoquenodesoxicólico; GDCA, ácido glicodesoxicólico; GLCA, ácido glicolitocólico; CA, ácido cólico; CDCA, ácido quenodesoxicólico; DCA, ácido desoxicólico; THCA, ácido trihidroxicolestanoico.

En cuanto a la línea celular HuH-7 (Figura R8), se observó una gran capacidad de conjugación con taurina, pero no con glicina, siendo los ABs tauroconjugados abundantes y los glicoconjugados minoritarios. Asimismo, observamos que las células eran capaces de sintetizar TDCA, un AB más hidrofílico y menos tóxico, mediante la conjugación del DCA del medio, así como la síntesis de CA, TCA, CDCA y THCA, siendo el CA el AB mayoritario.



En el caso de la línea celular HuH-6, a pesar de ser las células que presentaban una mayor expresión de *ACOX2* (Figura R5), encontramos una síntesis baja de ABs (Figura R9), siendo las especies mayoritarias los tauroconjugados y glicoconjugados. La síntesis de CA fue muy baja, y no se encontró ni CDCA ni THCA, por lo que se descartó el uso de esta línea celular como modelo para evaluar la funcionalidad de *ACOX2*, entendiéndose que en estas células podría haber alguna deficiencia en la ruta biosintética de los ABs.

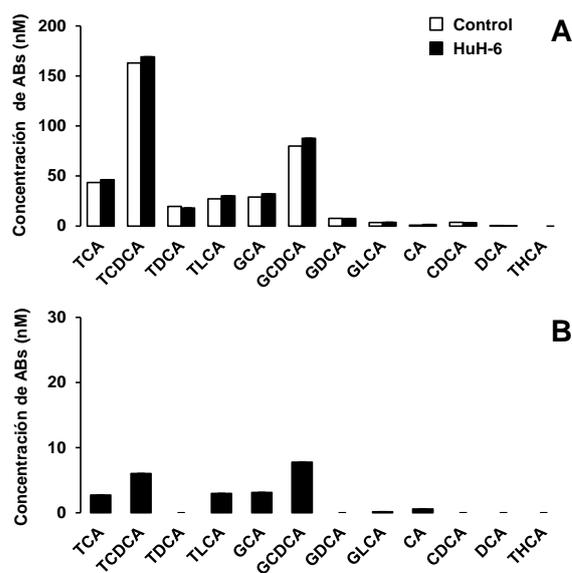


Figura R9: (A) Concentración de diferentes especies de ácidos biliares (ABs) determinada por HPLC-MS/MS en el medio de cultivo (Control) y después de cultivar células HuH-6 a confluencia durante 48 h. (B) Síntesis de ABs por células HuH-6, calculada por la diferencia entre la concentración de ABs a las 48 h de cultivo y el Control. Los datos representan la concentración de ABs determinada en un experimento típico. TCA, ácido taurocólico; TCDCA, ácido tauroquenodesoxicólico; TDCA, ácido taurodesoxicólico; TLCA, ácido taurolitocólico; GCA, ácido glicocólico; GCDCA, ácido glicoquenodesoxicólico; GDCA, ácido glicodesoxicólico; GLCA, ácido glicoliticólico; CA, ácido cólico; CDCA, ácido quenodesoxicólico; DCA, ácido desoxicólico; THCA, ácido trihidroxicolestanoico.

Por el contrario, la línea celular Alexander, a pesar de su baja expresión del gen *ACOX2* (Figura R5), presentó niveles de síntesis de ABs (Figura R10) superiores a los observados en las HuH-6. No obstante, las especies mayoritarias fueron tauroconjugados y glicoconjugados, no observándose síntesis de CDCA libre, ni THCA, y niveles de CA muy inferiores a los observados en las células HepG2 y HuH-7.

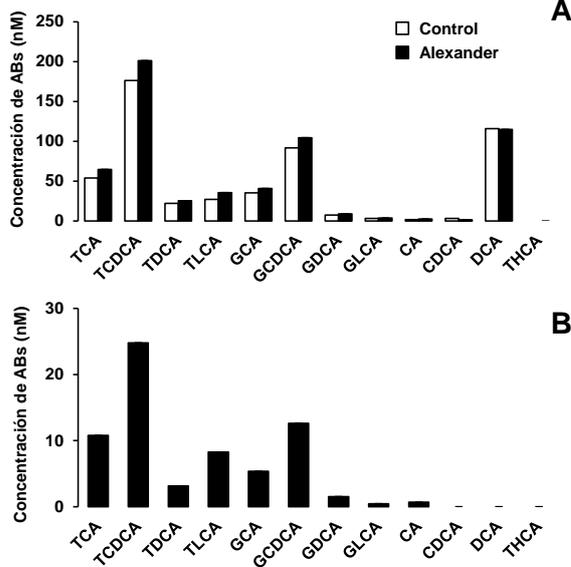
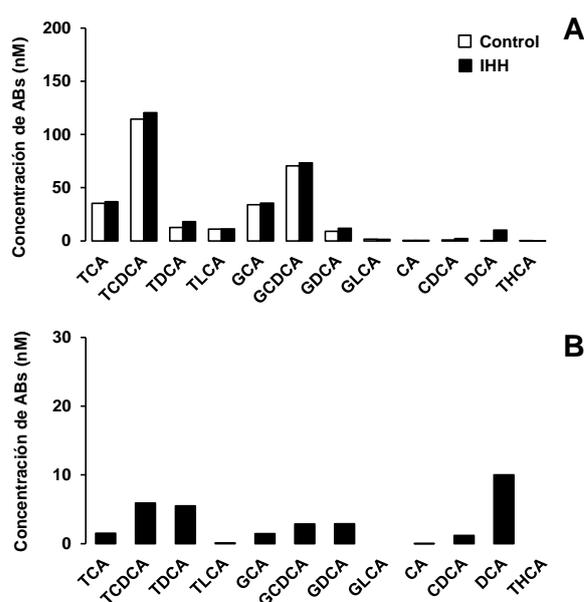
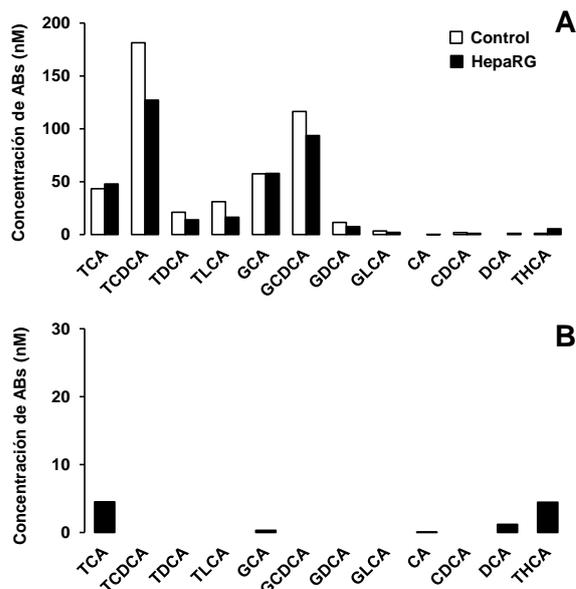


Figura R10: (A) Concentración de diferentes especies de ácidos biliares (ABs) determinada por HPLC-MS/MS en el medio de cultivo (Control) y después de cultivar células Alexander a confluencia durante 48 h. (B) Síntesis de ABs por células Alexander, calculada por la diferencia entre la concentración de ABs a las 48 h de cultivo y el Control. Los datos representan la concentración de ABs determinada en un experimento típico. TCA, ácido taurocólico; TCDCa, ácido tauroquenodesoxicólico; TDCA, ácido taurodesoxicólico; TLCA, ácido taurolitocólico; GCA, ácido glicocólico; GDCa, ácido glicoquenodesoxicólico; GDCA, ácido glicodesoxicólico; GLCA, ácido glicolitocólico; CA, ácido cólico; CDCA, ácido quenodesoxicólico; DCA, ácido desoxicólico; THCA, ácido trihidroxicolestanoico.

En el caso de la línea celular HepaRG, a pesar de su elevada diferenciación, apenas mostraron una expresión detectable de *ACOX2* (Figura R5), y por tanto tampoco una síntesis destacable de ABs (Figura R11). De las especies de ABs de interés, los ABs mayoritarios fueron el THCA y el TCA. Sin embargo, el AB más abundante fue el ácido hiocólico (datos no mostrados), un AB minoritario en humanos sanos, pero abundante en especies como el cerdo (*Sus scrofa*), que se ha encontrado aumentado en pacientes con hepatitis virales durante la fase de recuperación (Nakashima *et al.*, 1999).

En cuanto a la línea celular IHH, derivada de hepatocitos sanos inmortalizados, a pesar de tener un nivel de expresión de *ACOX2* semejante a las HepG2 (Figura R5), demostraron tener un nivel de síntesis de ABs mucho menor (Figura R12), donde además el AB primario mayoritario fue el CDCA. Los niveles de especies tauroconjugados y glicoconjugadas del CDCA y DCA también fueron superiores a las especies conjugadas del CA, encontrado en valores muy bajos en el cultivo de esta línea celular.



Finalmente, en el medio obtenido tras la incubación con las células WIF-B9 (Figura R13), los ABs predominantes fueron los tauroconjugados y glicoconjugados del CA y CDCA, mientras que el AB libre mayoritario fue el DCA.

Basándonos en este análisis, seleccionamos las líneas celulares HepG2 y HuH-7 como las principales candidatas para desarrollar el modelo de evaluación *in vitro* de la funcionalidad de la enzima ACOX2, debido a su elevada capacidad para sintetizar ABs primarios, principalmente CA libre, y su baja capacidad de conjugación del mismo. Esto, por una parte, facilita el análisis de la biotransformación del THCA, su precursor,

en CA, al no ser necesario tener en cuenta los derivados conjugados, y por otra reduce la variabilidad experimental que podría suponer la presencia de ABs conjugados en el suero bovino fetal utilizado en la preparación del medio de cultivo celular y cuya concentración puede variar entre distintos lotes. No obstante, cabe destacar que estudios previos en estas líneas celulares habían descrito patrones de síntesis de ABs diferentes a los encontrados en esta Tesis Doctoral. Así, en la línea celular HepG2 se había descrito una síntesis de CDCA muy superior a la de CA, así como una acumulación evidente de DHCA y THCA que superaba los niveles de CA (Everson *et al.*, 1986). Por otro lado, otros autores habían encontrado una síntesis predominante de CDCA y conjugación con glicina en el medio de cultivo de células HuH-7 (Yoshik Amuro, 1994). Sin embargo, las condiciones experimentales empleadas en estos estudios fueron diferentes a las nuestras, bien por utilización de distintos medios de cultivo o por falta de suero bovino fetal en el cultivo, lo que puede resultar en la falta de factores de crecimiento y diferenciación importantes en el control metabólico. Además, en ambos casos se trata de estudios antiguos, por lo que no se puede descartar que las características propias de la línea celular puedan haberse modificado tras los pases y cultivos sucesivos. Por todo ello, el análisis de la capacidad de síntesis de ABs en distintas líneas celulares resultó de especial relevancia para la consecución de los objetivos de esta Tesis Doctoral.

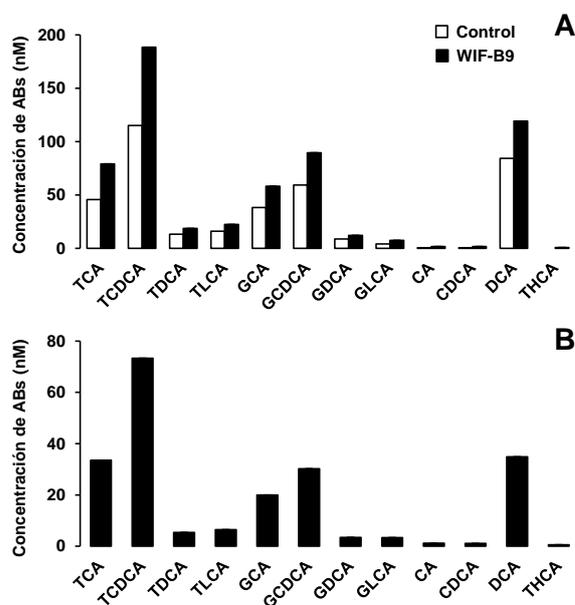


Figura R13: (A) Concentración de diferentes especies de ácidos biliares (ABs) determinada por HPLC-MS/MS en el medio de cultivo (Control) y después de cultivar células WIF-B9 a confluencia durante 48 h. (B) Síntesis de ABs por células WIF-B9, calculada por la diferencia entre la concentración de ABs a las 48 h de cultivo y el Control. Los datos representan la concentración de ABs determinada en un experimento típico. TCA, ácido taurocólico; TCDCA, ácido tauroquenodesoxicólico; TDCA, ácido taurodesoxicólico; TLCA, ácido taurolitocólico; GCA, ácido glicocólico; GCDCA, ácido glicoquenodesoxicólico; GDCA, ácido glicodesoxicólico; GLCA, ácido glicolitocólico; CA, ácido cólico; CDCA, ácido quenodesoxicólico; DCA, ácido desoxicólico; THCA, ácido trihidroxicolestanoico.

4.2.2. Evaluación de la biotransformación del THCA en HepG2 y HuH-7

Para comprobar que las líneas celulares HepG2 y HuH-7 podían transformar el THCA en CA, ambos tipos celulares se cultivaron durante 48 h en presencia de THCA añadido al medio de cultivo. Pasado este tiempo, se determinaron los niveles de CA en los cultivos, con o sin THCA añadido a dicho medio (Figura R14). En ambos tipos celulares se observó un aumento significativo en la síntesis de CA cuando se añadía THCA.

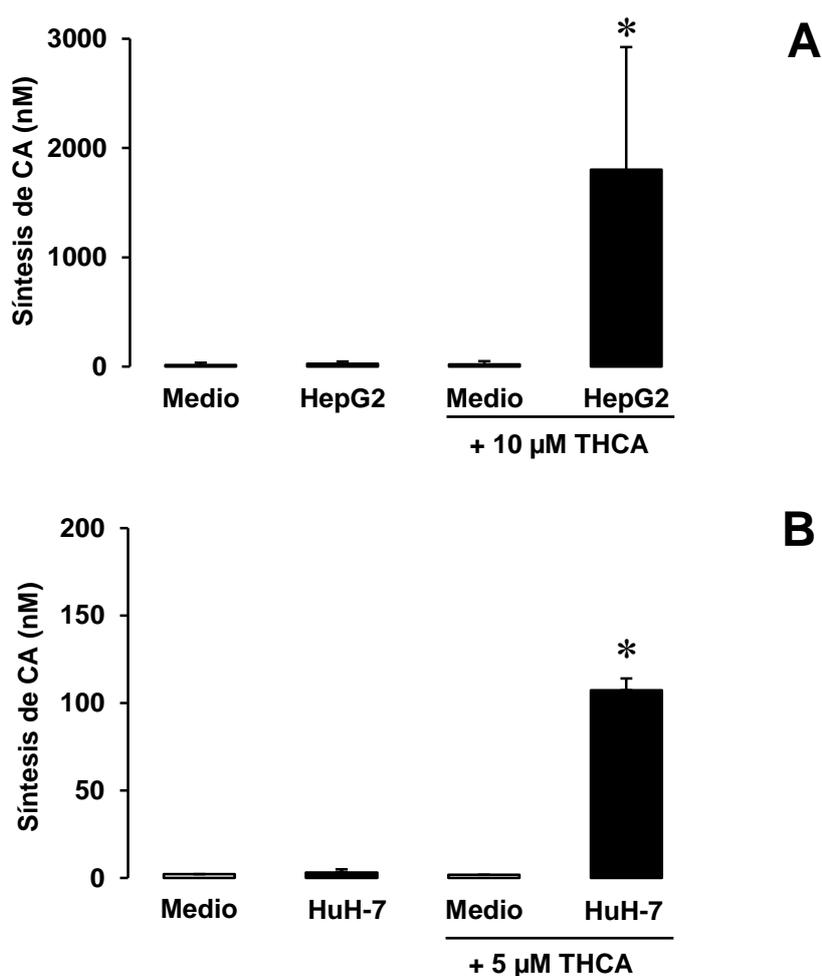


Figura R14: Síntesis de ácido cólico (CA) por células HepG2 (A) y HuH-7 (B) incubadas o no durante 48 h con ácido trihidroxicolestanoico (THCA) a una concentración de 10 μ M (HepG2) o 5 μ M (HuH-7). La concentración de CA se determinó en el medio de cultivo por HPLC-MS/MS. Los valores representan la media \pm SD de al menos cuatro determinaciones usando dos cultivos diferentes. * p <0,05, comparado con la concentración de THCA en el medio de cultivo solo, mediante el test *t* de Student.

4.2.3. Evaluación funcional *in vitro* de la variante V1 (R225W) de ACOX2

Durante la realización de mi Trabajo de Fin de Máster clonamos la ORF de *ACOX2* en un plásmido pGEM-T, a partir de la que posteriormente obtuvimos mediante mutagénesis dirigida la variante V1 de *ACOX2* identificada en el paciente de estudio

(c.673C>T, p.R225W). Asimismo, se modificó el plásmido pWPI, de generación de vectores lentivirales, para introducir la etiqueta V5 en el extremo C-terminal de la proteína que se deseaba expresar, y se subclonó la ORF de ambas variantes en este plásmido. La utilización de vectores lentivirales nos permitió expresar establemente en líneas celulares las proteínas ACOX2-V5 silvestre y la variante V1, así como seguir su expresión con un anticuerpo anti-V5. Tras producir lentivirus-ACOX2, así como lentivirus vacíos utilizados como control (Mock), se transdujeron células HepG2 y HuH-7 y se analizó la expresión del transgén (Figuras R15 y R16, respectivamente).

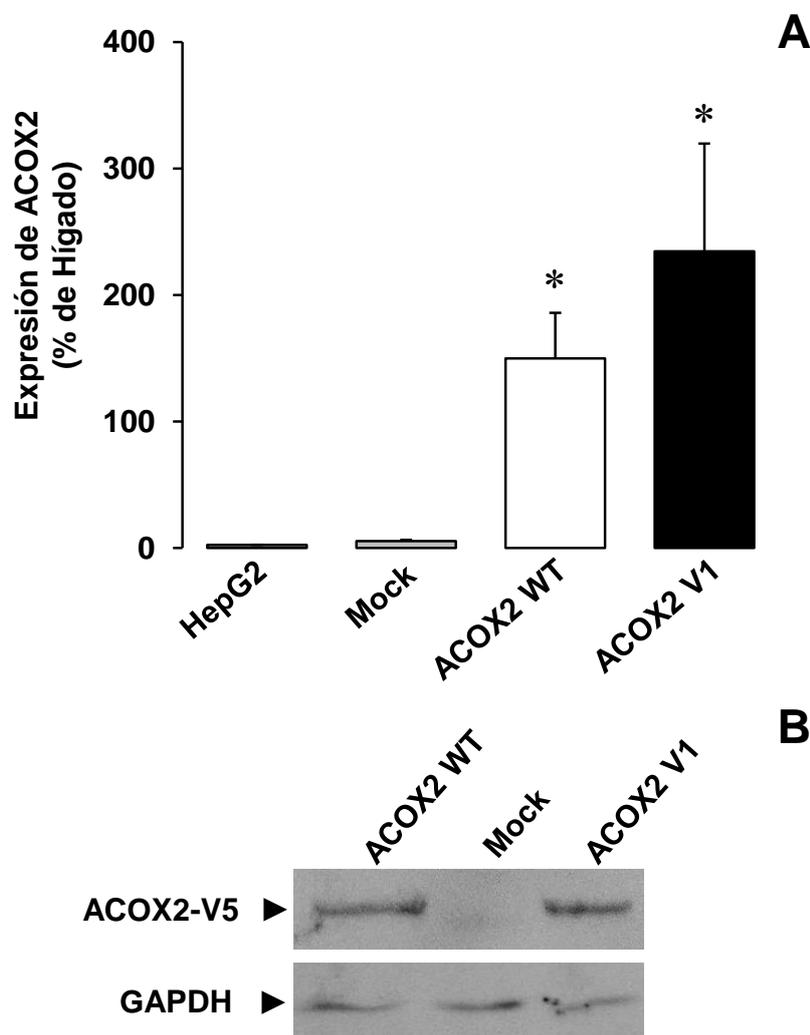


Figura R15: Expresión de ACOX2 a nivel de ARNm (A) y de proteína (B) en células HepG2 no transducidas y transducidas con lentivirus vacíos (Mock) o que contenían la ORF de las variantes silvestre (WT) o R225W (V1) de ACOX2, determinada por RT-qPCR (A) y Western blot (B) con un anticuerpo anti-V5. La expresión de GAPDH se utilizó como control de carga de proteína. Los valores representan la media \pm SD de ocho determinaciones realizadas en cuatro cultivos. * $p < 0,05$, comparado con las células HepG2 sin transducir mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

En ambas líneas celulares, la transducción con los lentivirus portadores de la ORF de las dos variantes de *ACOX2* aumentó significativamente la expresión de *ACOX2*, incluso por encima de los niveles observados en hígado humano sano. Asimismo, la inmunodetección con un anticuerpo anti-V5 permitió observar la expresión de la proteína *ACOX2* en los homogenados de las células transducidas, observando que ambas variantes codificaban una proteína del mismo tamaño molecular (Figuras R15 y R16). La adquisición y puesta a punto de un anticuerpo anti-*ACOX2* permitió además observar la sobreexpresión de la proteína *ACOX2* en las células HuH-7 transducidas con las variantes silvestre y V1 de *ACOX2* en comparación con las células Mock (Figura R16).

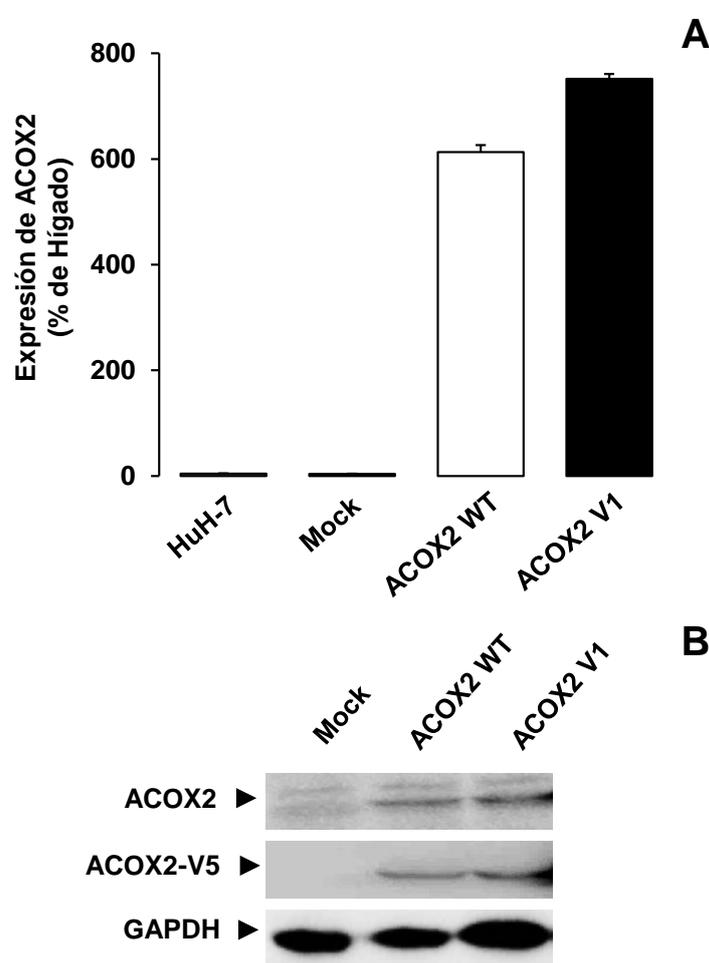


Figura R16: Expresión de *ACOX2* a nivel de ARNm (A) y de proteína (B) en células HuH-7 no transducidas y transducidas con lentivirus vacíos (Mock) o que contenían la ORF de las variantes silvestre (WT) o R225W (V1) de *ACOX2*, determinada por RT-qPCR (A) y Western blot (B) con anticuerpos anti-*ACOX2* y anti-V5. La expresión de GAPDH se utilizó como control de carga de proteína. Los valores representan la media \pm SD de dos determinaciones realizadas en un cultivo.

Además, mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-V5, se estudió la distribución subcelular de las variantes silvestre y V1 de *ACOX2* (Figura R17) en las

células HepG2 con sobreexpresión de ambas proteínas. Así, se pudo observar que ambas variantes presentaban un patrón de distribución subcelular punteado, similar al que cabría esperar para los peroxisomas. Además, para confirmar que la localización subcelular de la variante V1 (Figuras R17-A y B) era la misma que la de la proteína silvestre, se realizó una inmunofluorescencia de las células HepG2 con sobreexpresión de *ACOX2* V1, combinando los anticuerpos anti-V5 y anti-PMP70 (*ABCD3*), utilizado como marcador de la membrana del peroxisoma. La colocalización de ambas proteínas (Figura R17-C) confirmó que la mutación observada en el paciente no afectaba al direccionamiento de la proteína al peroxisoma.

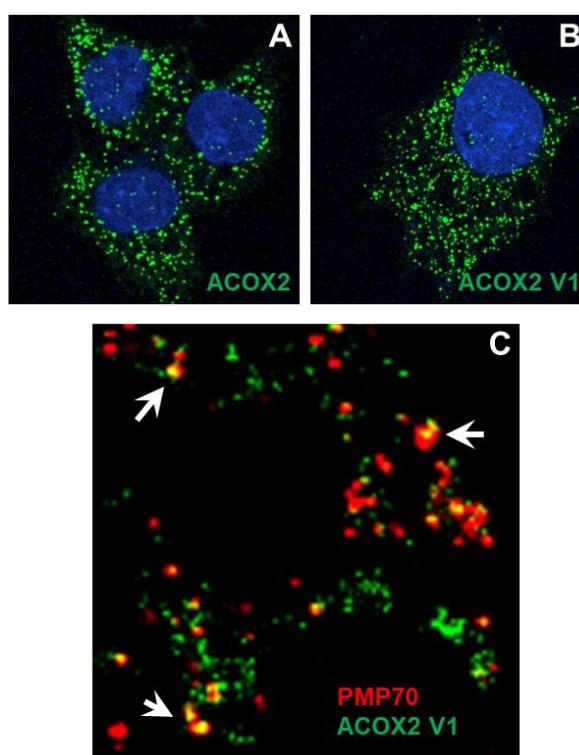


Figura R17: Imágenes representativas de inmunofluorescencia obtenidas por microscopia confocal de células HepG2 con sobreexpresión de las variantes silvestre (A) y R225W (V1) de *ACOX2* (B y C), en las que la localización de *ACOX2* se detectó con un anticuerpo anti-etiqueta V5 (verde). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). (C) Localización de *ACOX2* (verde) junto con el marcador de peroxisomas PMP70 (rojo). Las flechas señalan zonas representativas donde colocalizan *ACOX2* y PMP70 (amarillo).

Finalmente, se estudió la síntesis de CA a partir de THCA en las células HepG2 y HuH-7 que sobreexpresaban las variantes silvestre y V1 de *ACOX2* (Figura R18). En ambas líneas celulares se observó que, mientras que la sobreexpresión de *ACOX2* silvestre aumentaba significativamente la síntesis de CA respecto a las células control (Mock), la expresión de la variante V1 producía una síntesis de CA significativamente inferior a la observada en las células portadoras de la variante silvestre, demostrando que la

mutación c.673C>T da como resultado una proteína ACOX2 hipofuncional y, por lo tanto, conlleva una menor capacidad de las células portadoras de transformar los intermediarios de síntesis C27 en ABs primarios C24.

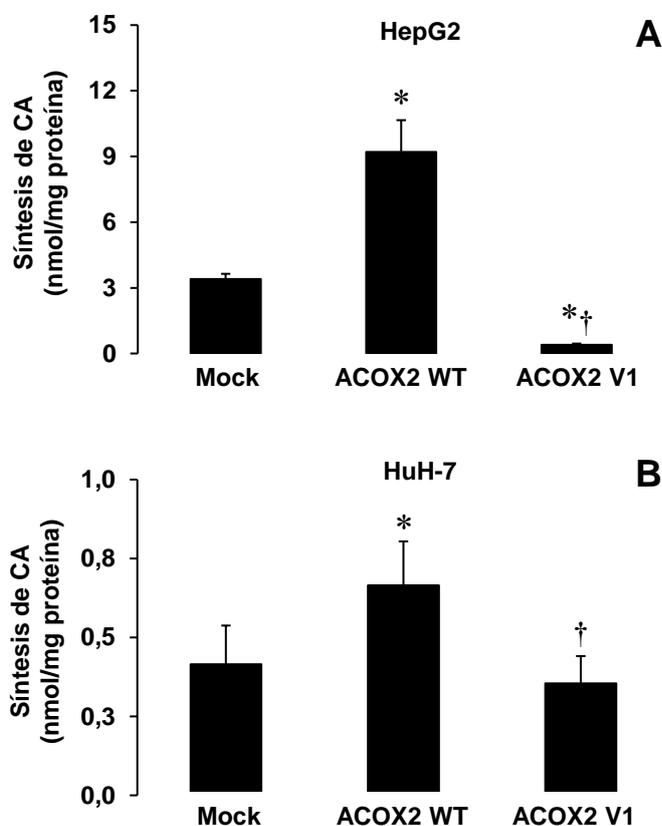


Figura R18: Síntesis de ácido cólico (CA) por células HepG2 (A) y HuH-7 (B) Control (Mock) o con sobreexpresión de las variantes silvestre (WT) o R225W (V1) de ACOX2, incubadas durante 48 h con ácido trihidroxicolestanoico (THCA) a una concentración de 10 μ M (HepG2) o 5 μ M (HuH-7). La concentración de CA en el medio de cultivo y lisado celular se determinó por HPLC-MS/MS. Los valores representan la media \pm SD de seis (A) y nueve (B) determinaciones usando tres cultivos diferentes. * $p < 0,05$, comparado con el Control; y † $p < 0,05$, comparado con ACOX2-WT por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni.

4.2.4. Selección clonal de células HuH-7 con sobreexpresión de las variantes silvestre y V1 de ACOX2

Para mejorar nuestro modelo experimental y evitar la posible dilución de las células transducidas por el resto de células presentes en la población policlonal, llevamos a cabo una selección clonal. Aunque tanto la línea celular HepG2 como la HuH-7 habían demostrado ser modelos *in vitro* adecuados para la evaluación de la funcionalidad de la variante de ACOX2 V1 (R225W), las células HepG2 presentan ciertas dificultades en su manipulación, como su baja tolerancia al cultivo en baja confluencia y un tiempo medio de generación considerablemente superior al de las HuH-7. Por ello, elegimos la

línea celular HuH-7 para obtener poblaciones monoclonales que sobreexpresasen las variantes silvestre y V1 de *ACOX2*.

En la selección clonal de células HuH-7 con sobreexpresión de la variante silvestre de *ACOX2* (Figura R19) se siguió un procedimiento en dos pasos para tratar de favorecer el éxito en el proceso de obtención de clones: en primer lugar, se enriqueció la población en células transducidas mediante *cell sorting* y, posteriormente, se seleccionaron poblaciones derivadas de una única célula mediante dilución límite. Esta estrategia supuso, sin embargo, una elevada pérdida de viabilidad de las células.

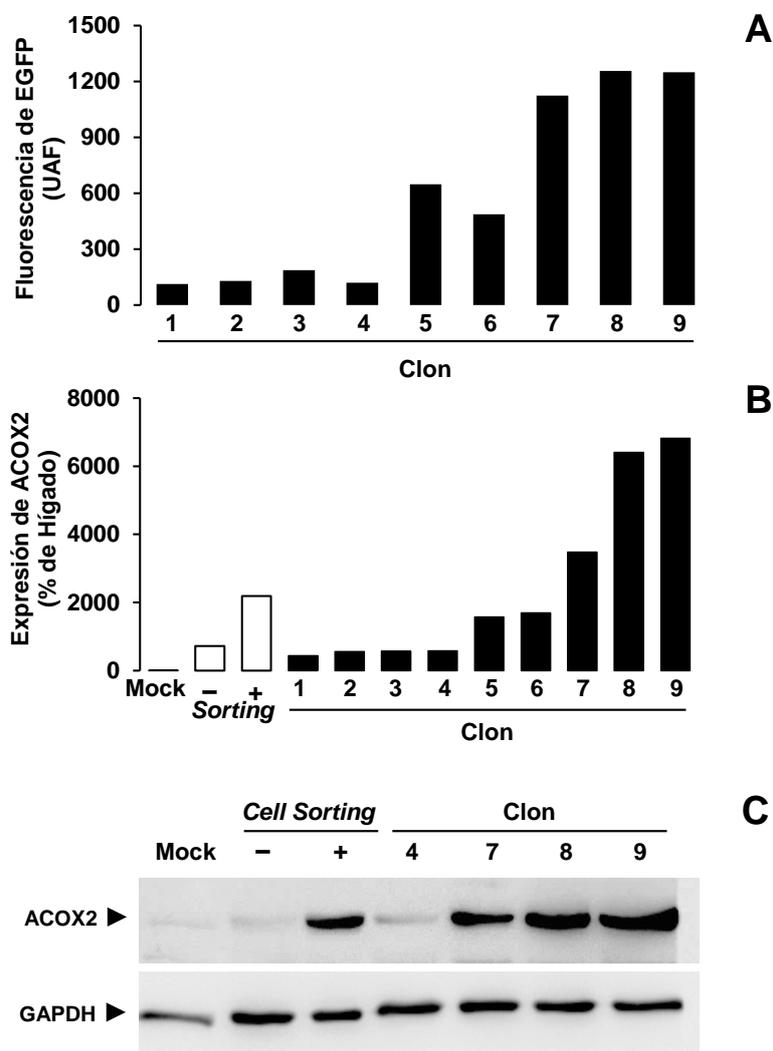


Figura R19: (A) Fluorescencia de la proteína fluorescente verde EGFP de diferentes clones de células HuH-7 aislados a partir de células transducidas con lentivirus que contenían la ORF de *ACOX2* y EGFP. Los valores representan la fluorescencia media expresada en unidades arbitrarias (UAF) determinada por citometría de flujo. Expresión de *ACOX2* a nivel de ARNm, determinada por RT-qPCR (B), y de proteína, determinada por Western blot (C), en células HuH-7 Control (Mock); transducidas con lentivirus-*ACOX2*, antes y después de ser enriquecidas en células que expresaban EGFP por *Cell Sorting*; y los clones seleccionados. La expresión de GAPDH se utilizó como control de carga de proteína.

El sistema de *cell sorting* permite separar mediante citometría de flujo una población celular concreta dentro de una mezcla. En nuestro caso, a partir de una población policlonal, en la que había células que habían incorporado el transgén y células que no se habían transducido, seleccionamos aquellas células que presentaban elevada fluorescencia verde debida a la expresión de EGFP y que, presumiblemente, también contenían la ORF de la variante silvestre de *ACOX2*. Como se observa en la Figura R19-B y C, la expresión de *ACOX2* en las células seleccionadas por *cell sorting* fue mayor que en la población policlonal inicial. Sin embargo, es esperable que esta población no sea homogénea ya que la integración del transgén puede darse en cualquier *loci* del genoma celular, lo que también va a determinar los niveles de expresión del transgén. Por ello, para conseguir una población homogénea monoclonal a partir de esta población policlonal enriquecida, llevamos a cabo una siembra en condiciones de dilución límite. Siguiendo el crecimiento de estas células obtuvimos un total de 9 poblaciones monoclonales, de las cuales 3 presentaban niveles altos de intensidad de fluorescencia verde debida a la expresión de EGFP (Figura R19-A) y, por tanto, podrían haber integrado el transgén en una región poco condensada del genoma, lo que facilitaría su expresión. Estas poblaciones monoclonales también presentaron unos niveles altos de ARNm de *ACOX2* (Figura R19-B) así como de la proteína *ACOX2* (Figura R19-C).

Para comprobar que este aumento de expresión se acompañaba de mayor actividad metabólica, se seleccionaron los tres clones con mayor expresión (7, 8 y 9) y un clon que había demostrado tener un bajo nivel de transducción (baja intensidad de fluorescencia verde EGFP) y bajos niveles de expresión de *ACOX2* (clon 4) como control negativo, y se determinó la síntesis de CA tras 48 h en cultivo en presencia de THCA (Figura R20). Además, la capacidad de sintetizar CA de los clones se comparó con las células control (Mock), así como con la población policlonal con sobreexpresión de la variante silvestre de *ACOX2*. Las poblaciones monoclonales con altos niveles de expresión de *ACOX2* (clones 7, 8 y 9) presentaron una elevada capacidad de síntesis de CA que fue significativamente superior a las de las células control, a diferencia de la población policlonal y el clon 4 con bajo nivel de expresión, que presentaba una capacidad de síntesis de CA mucho menor.

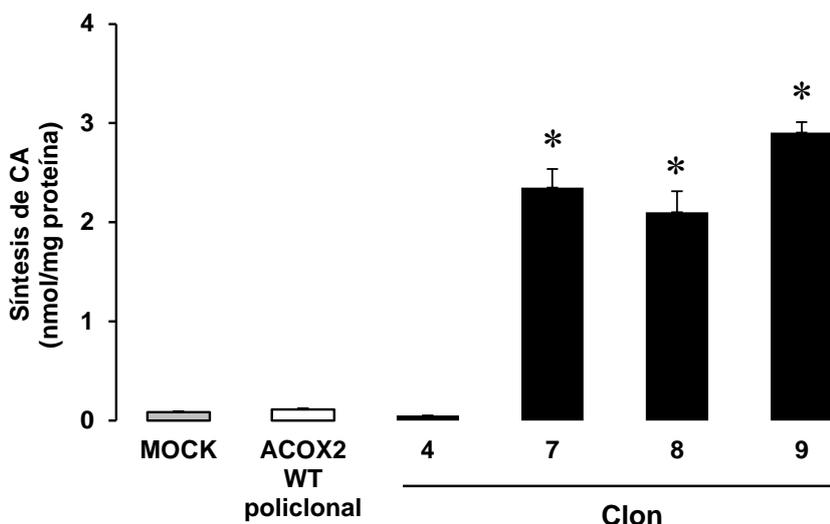


Figura R20: Síntesis de ácido cólico (CA) por células HuH-7 Control (Mock), una población policlonal de células HuH-7 transducidas con lentivirus-*ACOX2* y diferentes clones seleccionados. Las células se incubaron durante 48 h en presencia de 5 μ M de ácido trihidroxicolestanoico (THCA). La concentración de CA en el medio de cultivo y lisado celular se determinó por HPLC-MS/MS. Los valores representan la media \pm SD de cuatro determinaciones usando dos cultivos diferentes. * $p < 0,05$, comparado el Control por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni.

De igual manera, se llevó a cabo la selección clonal a partir de células HuH-7 con sobreexpresión de la variante V1 de *ACOX2*. En este caso, se realizó directamente la siembra por dilución límite a partir de la población policlonal transducida con esta variante, lo que nos permitió obtener cuatro clones. De ellos, sólo dos presentaban una intensidad de fluorescencia verde similar (clon 3) o superior (clon 4) a la de la población policlonal (Figura R21-A). Debido a la fragilidad de estas células, en esta ocasión no se llevó a cabo el paso previo de selección por *cell sorting* para evitar la pérdida de viabilidad celular. No obstante, sólo una de estas poblaciones monoclonales (clon 4) proliferó y demostró una expresión superior de *ACOX2* en comparación con la población policlonal (Figura R21-B).

La capacidad de síntesis de CA a partir de THCA se evaluó en las poblaciones monoclonales con sobreexpresión de las variantes silvestre (clon 9) y V1 (clon 4), en comparación con las líneas celulares policlonales transducidas con cada una de estas variantes (Figura R22-A). Además, los niveles de expresión de la proteína *ACOX2* se determinaron en estas poblaciones mediante WB, utilizando para ello el anticuerpo anti-V5 (Figura R22-B). Como puede observarse, los clones 9 y 4 presentaron una expresión de *ACOX2* comparable y muy superior a sus respectivas poblaciones policlonales. Sin embargo, sólo en el clon 9 se observó un aumento significativo de la síntesis de CA

tanto en comparación con las células Control (Mock) como en comparación con la población policlonal con sobreexpresión de la variante silvestre de *ACOX2*. En cuanto al clon 4, la sobreexpresión de la variante V1 de *ACOX2* se acompañó de una reducción de la capacidad de síntesis de CA en comparación con las células Control, confirmando el hallazgo de que esta mutación genera un déficit funcional en la enzima *ACOX2*. Además, observamos que el clon 4 mostraba una menor capacidad de síntesis de CA que la población policlonal con sobreexpresión de la variante V1 de *ACOX2*, posiblemente porque el nivel de expresión del transgén *ACOX2*-V1 que se alcanzó en este clon fue tal que desplazaba la enzima *ACOX2* silvestre endógena, lo que sugería que la proteína mutada acumulada en exceso podría reducir la actividad enzimática global.

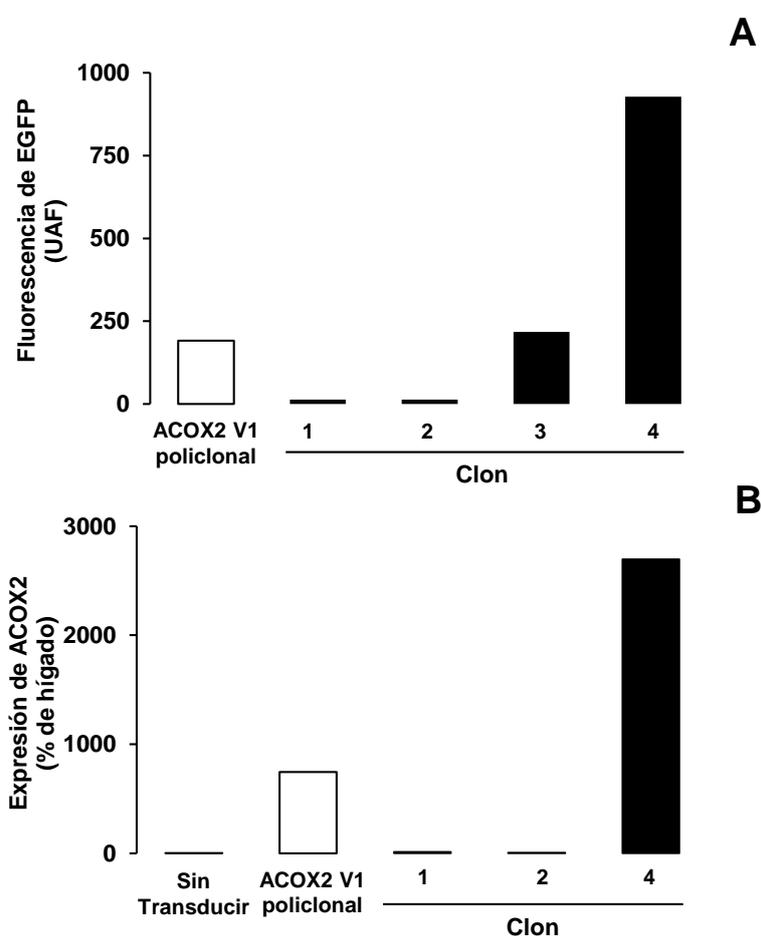


Figura R21: (A) Fluorescencia de la proteína fluorescente verde EGFP de células HuH-7 transducidas con lentivirus que contenían la ORF de la variante V1 de *ACOX2* y de EGFP y diferentes clones seleccionados. Los valores representan la fluorescencia media expresada en unidades arbitrarias (UAF) determinada por citometría de flujo. (B) Expresión de *ACOX2* en células HuH-7 sin transducir (Control), HuH-7-*ACOX2* V1 policlonales y los clones seleccionados. Los niveles de ARNm se determinaron por RT-qPCR y se expresan como porcentaje de la expresión en hígado sano. Los valores representan la media de dos determinaciones.

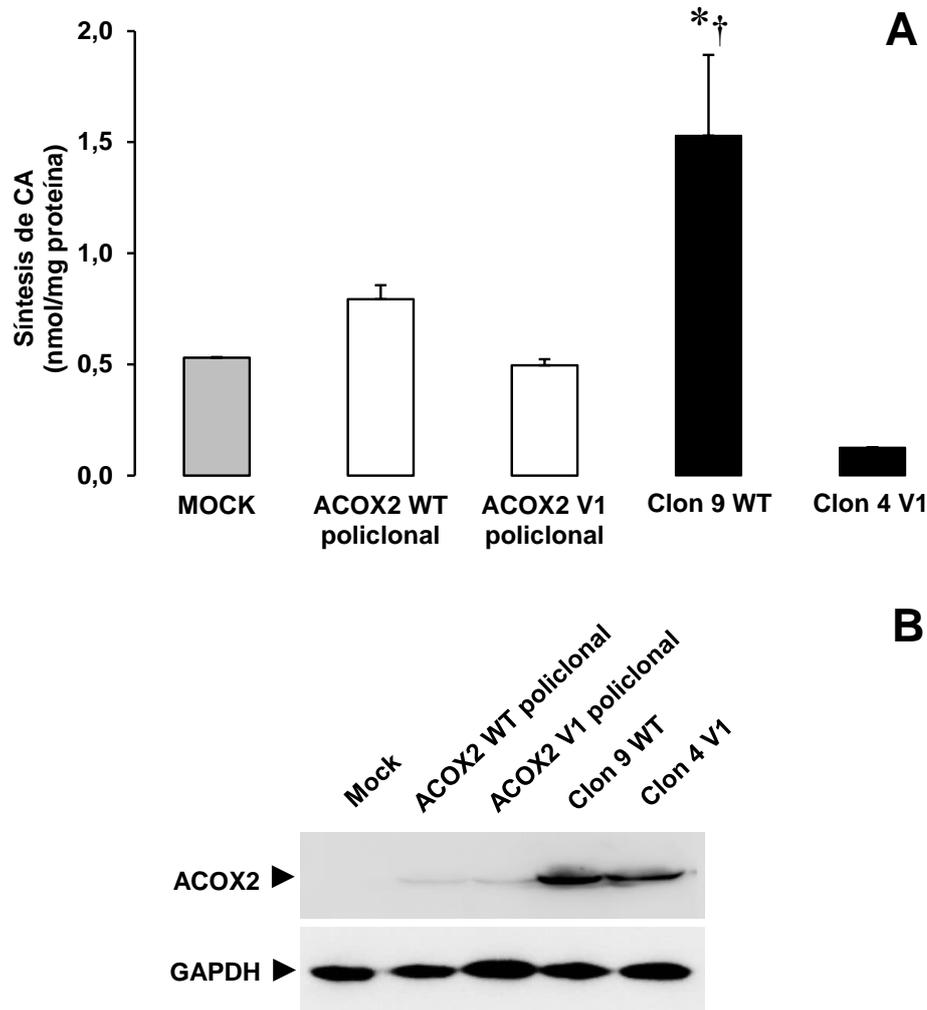


Figura R22: (A) Síntesis de ácido cólico (CA) por células HuH-7 Control (Mock), poblaciones policlonales de células HuH-7 transducidas con lentivirus que contenían la ORF de las variantes silvestre (WT) o V1 de *ACOX2* y diferentes clones seleccionados. Las células se incubaron durante 48 h con 5 μ M de ácido trihidroxicolestanoico (THCA). La concentración de CA en el medio de cultivo y lisado celular se determinó por HPLC-MS/MS. Los valores representan la media \pm SD de cuatro determinaciones usando dos cultivos diferentes. * p <0,05, comparado con el Control, y † p <0,05, comparado con ACOX2-WT policlonal por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni. (B) Expresión de *ACOX2* en las diferentes poblaciones policlonales y monoclonales de células HuH-7 determinada por Western blot con un anticuerpo anti-V5. La expresión de GAPDH se utilizó como control de carga de proteína.

Finalmente, la obtención de estas poblaciones monoclonales permitió realizar un análisis cuantitativo de colocalización de las variantes silvestre y V1 de *ACOX2*. Para ello, se comparó el marcaje de *ACOX2* (anticuerpo anti-*ACOX2*, verde) con el de la enzima peroxisomal catalasa (rojo) en células HuH-7 monoclonales con sobreexpresión de *ACOX2* silvestre (clon 9) o *ACOX2* V1 (clon 4) y en células HuH-7 no transducidas (Figura R23), mediante el *plugin* JACoP del *software* ImageJ (Bolte *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2012). En todos los tipos celulares los métodos de análisis basados en

el solapamiento de objetos, como el test *Costes Randomization* (p-valor = 100%), fueron capaces de detectar la colocación de ambas enzimas, mientras que sólo en las poblaciones monoclonales la intensidad de fluorescencia derivada de ambas proteínas fue suficientemente semejante como para poder calcular la correlación entre ambos parámetros mediante el coeficiente de Pearson que fue $r=0,184$ para las HuH-7, $r=0,431$ para el clon 9 WT y $r=0,316$ para el clon 4 V1.

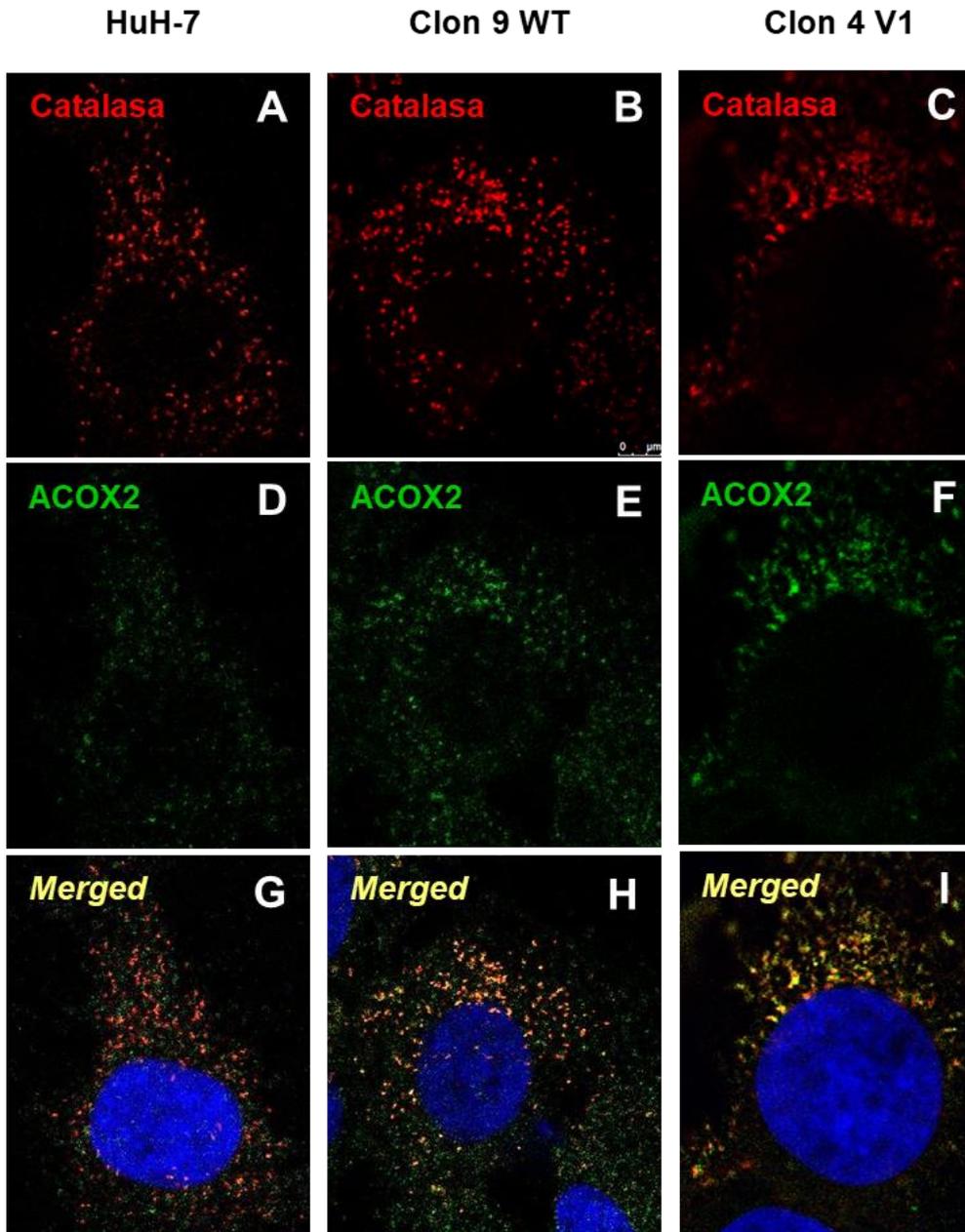


Figura R23: Imágenes representativas de inmunofluorescencia obtenidas por microscopía confocal de células HuH-7 no transducidas (A, D, G) y con sobreexpresión de la variante silvestre de *ACOX2*, clon 9 (B, E, H), o de la variante V1, clon 4 (C, F, I), donde se muestra la localización subcelular de la enzima peroxisomal catalasa (rojo, A, B y C), de *ACOX2* (verde, D, E y F) y su colocación (*merged*) (amarillo, G, H, I). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul).

A partir de estos estudios pudimos concluir que la mutación R225W en ACOX2 genera una alteración de su capacidad enzimática, a pesar de que no provocó cambios en el tamaño de la proteína ni en su localización subcelular como muestran los resultados obtenidos en nuestros modelos experimentales *in vitro*. Hay que recordar que la mutación puede afectar a la región necesaria para la dimerización, lo que explicaría el déficit funcional, y que el exceso de la variante mutada pueda interferir en la formación de dímeros de la ACOX2 endógena, quizá generándose heterodímeros WT/V1 con menor actividad y/o mayor probabilidad de ser degradados por el proteosoma, lo que justificaría la reducción de la síntesis de CA en nuestros modelos celulares con sobreexpresión de ACOX2-V1 respecto a las células Control.

Por otro lado, durante la realización de esta Tesis Doctoral se han descrito dos nuevos casos de deficiencia de ACOX2. En ambos, los pacientes mostraron una deficiencia total de la proteína ACOX2 y fallecieron durante la infancia, presentando un cuadro clínico de una severidad muy superior al del paciente objeto del estudio de esta Tesis Doctoral. El primer caso se trató de un paciente de origen turco, fallecido a los 8 años de edad, portador de una mutación sin sentido en homocigosis en ACOX2 (p.Y69*), lo que daba lugar a la ausencia total de la proteína funcional (Vilarinho *et al.*, 2016). La sintomatología incluía, además de un fenotipo de hepatopatía, con elevación de transaminasas, un fenotipo neurológico similar al descrito en otras enfermedades peroxisomales, que incluía ataxia y deterioro cognitivo (Vilarinho *et al.*, 2016). En el segundo caso, la paciente, de padres consanguíneos y de origen pakistaní, padecía de artrogriposis, hipertensión pulmonar y convulsiones y falleció a los seis meses de edad tras sufrir varios episodios de paro cardíaco. Además presentaba un fenotipo típico de lesión hepática caracterizado por hipertransaminasemia, hiperbilirrubinemia e hipoalbuminemia (Ferdinandusse *et al.*, 2018). A pesar de que el cuadro clínico hacía sospechar de más de un trastorno genético, los autores de este estudio identificaron una delección de cuatro nucleótidos en homocigosis que resultaba en la generación de una proteína ACOX2 truncada (p.T154Sfs*25), no detectable por estudios de WB (Ferdinandusse *et al.*, 2018). Sorprendentemente, el análisis del perfil de ABs en fluidos biológicos de ambos pacientes demostró la acumulación de intermediarios C27 pero no una reducción significativa de ABs primarios C24, a pesar de demostrarse una deficiencia total de la enzima ACOX2. Así, en el estudio llevado a cabo por Ferdinandusse *et al.* se evaluó la especificidad de sustrato de las distintas acil-CoA

oxidasas ACOX1, ACOX2 y ACOX3 para contrastar la hipótesis de que otra acil-CoA oxidasa pueda compensar la deficiencia de ACOX2. Sin embargo, sus resultados demostraron que ACOX2 es la única acil-CoA oxidasa capaz de metabolizar tanto ácidos grasos de cadena corta, larga y/o ramificada como intermediarios de la síntesis de ABs, mientras que las acil-CoA oxidasas ACOX1 y ACOX3 metabolizan específicamente distintos tipos de ácidos grasos. Solamente cabe hipotetizar que la ruta de 25-hidroxilación (apartado 1.2.1), la única descrita que podría resultar en la síntesis de ABs primarios C24 sin necesidad de acortamiento por β -oxidación, es capaz de compensar parcialmente la deficiencia de ACOX2, dando lugar a la síntesis de ABs primarios C24 a pesar de la acumulación de intermediarios C27. No obstante, en los individuos con deficiencia parcial objeto de este estudio parece que esta compensación no se produce, ya que se observó una deficiencia clara de ABs C24. Todos estos hallazgos ponen de manifiesto la necesidad de reconsiderar los paradigmas establecidos en cuanto al metabolismo y regulación de la síntesis de ABs.

4.4. MECANISMOS DE TOXICIDAD IMPLICADOS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE APD

4.4.1. Toxicidad del THCA en líneas celulares con sobreexpresión de las variantes silvestre y V1 (R225W) de ACOX2

En este estudio, quisimos evaluar si la presencia de la mutación R225W de ACOX2 inducía un aumento de la sensibilidad de las células portadoras al THCA. Para ello, utilizamos como modelo las células HepG2 policlonales (Figura R34) y HuH-7 monoclonales (Figura R35) con sobreexpresión de las variantes silvestre y V1 de ACOX2. Evaluamos la viabilidad celular en un rango de concentraciones crecientes de THCA y, en el caso de las HepG2, la capacidad del THCA de inducir estrés oxidativo en comparación con CA y DCA (Figura R34-A y B). En el caso de los clones obtenidos a partir de células HuH-7 no se pudieron realizar los ensayos de estrés oxidativo debido a los altos niveles de fluorescencia endógena de la proteína EGFP.

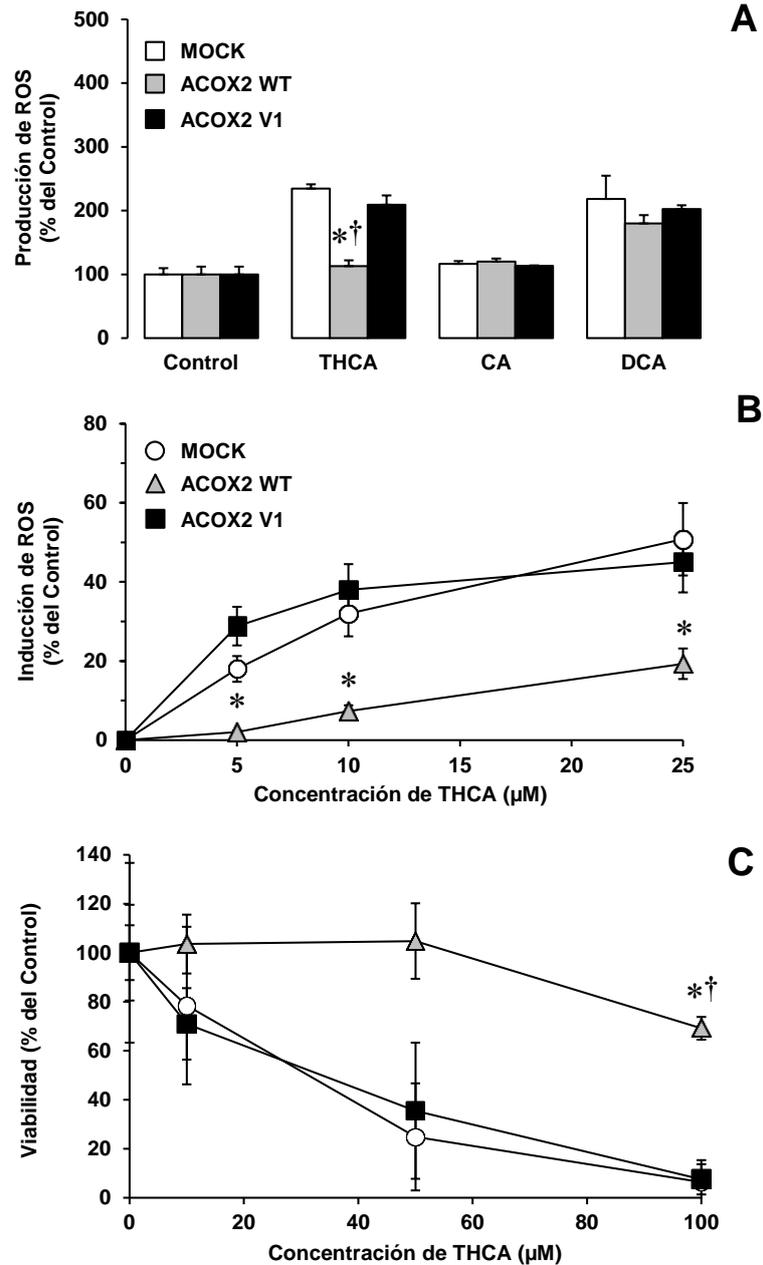


Figura R34: Efecto del ácido trihidroxicolectanoico (THCA) sobre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras un tiempo corto (30 min, A) o largo (72 h, B) de incubación y sobre la viabilidad (C) de células HepG2 con sobreexpresión de *ACOX2* silvestre (*ACOX2* WT), la variante R225W de *ACOX2* (*ACOX2* V1) o transducidas con lentivirus Control (Mock). El aumento de la fluorescencia celular se determinó por citometría de flujo tras incubar las células con diclorodihidrofluoresceína diacetato (A) o CellROX (B). Los ácidos cólico (CA) y desoxicólico (DCA) se incluyeron como controles negativo y positivo, respectivamente. La viabilidad celular se determinó tras 72 h por el test MTT-formazán. Los valores representan la media \pm SD de al menos 9 determinaciones realizadas en tres cultivos diferentes. *, $p < 0,05$, en comparación con el Control (Mock); †, $p < 0,05$, en comparación con la variante V1, mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

En ambas líneas celulares se observó que la sobreexpresión de la variante silvestre de *ACOX2* era capaz de proteger del efecto citotóxico del THCA respecto a las células

control (Mock). Sin embargo, el THCA provocó una reducción de la viabilidad celular semejante en las células control y con sobreexpresión de *ACOX2 V1*.

En cuanto a la inducción de estrés oxidativo, evaluamos la producción de ROS en las tres sublíneas de HepG2 (Mock, *ACOX2 WT* y *ACOX2 V1*) incubadas con THCA en comparación con el CA y el DCA a tiempos cortos, ya que a tiempos más largos pueden inducirse mecanismos enzimáticos antioxidantes, sobre todo en casos de estrés oxidativo moderado como el inducido por los ABs. Observamos que la sobreexpresión de *ACOX2*, en cualquiera de sus variantes, no producía ningún cambio en la producción de ROS inducida por el tratamiento con DCA en comparación con el control (Mock). Sin embargo, las células *ACOX2 WT* presentaron niveles de ROS significativamente inferiores a los observados en las células control y *ACOX2 V1* tras el tratamiento con el THCA.

Finalmente, dado que el THCA tuvo un efecto negativo sobre la viabilidad celular en las células HepG2 Mock y *ACOX2 V1*, decidimos evaluar la generación de ROS en condiciones equivalentes, tras 72 h de exposición, en un rango inferior de concentraciones de THCA (Figura R34-B). Los resultados mostraron un aumento de los niveles de ROS en las células *ACOX2 WT* que era dependiente de la concentración de THCA, pero significativamente inferior al observado en las células Mock y *ACOX2 V1*, en los que el estrés oxidativo aumentaba de forma rápida, a concentraciones muy bajas de THCA.

Estos resultados demuestran que la expresión de la variante V1 de *ACOX2* causa una mayor sensibilidad a la toxicidad inducida por el THCA en comparación con la expresión de una variante funcional de *ACOX2*. Dado que la ausencia de metabolismo de este intermediario y su acumulación conlleva un aumento de estrés oxidativo y de ERS en las células hepáticas incluso superior al inducido por otros ABs hidrofóbicos, podemos concluir que los intermediarios C27 y los metabolitos que se originan a partir de ellos son los principales compuestos hepatotóxicos que actúan como mediadores de la lesión hepática en APD, como ocurre en otras enfermedades peroxisomales (Wanders *et al.*, 2012).

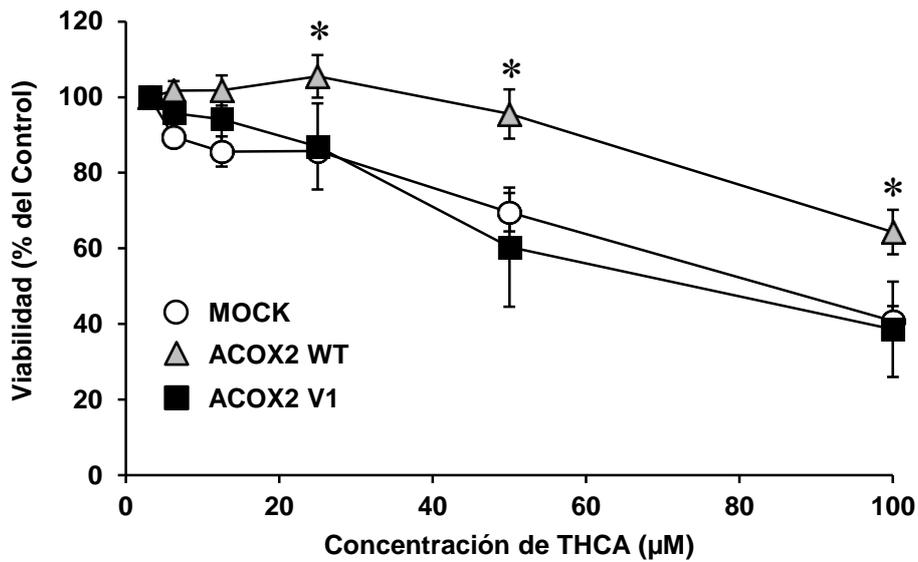


Figura R35: Efecto del ácido trihidroxicolestanoico (THCA) sobre la viabilidad celular determinada tras 72 h por el test MTT-formazán en células HuH-7 con sobreexpresión de ACOX2 silvestre clon 9 (ACOX2 WT), la variante R225W de ACOX2, clon 4, (ACOX2 V1) o transducidas con lentivirus Control (Mock). Los valores representan la media±SD de 12 determinaciones realizadas en cuatro cultivos diferentes. *, $p < 0,05$, en comparación con células Mock mediante el método de comparaciones múltiples de Bonferroni.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA:

La deficiencia parcial de ACOX2 (APD) es una enfermedad peroxisomal caracterizada por la acumulación de intermediarios de la síntesis de ácidos biliares C27 y la reducción de ácidos biliares primarios C24, lo que provoca la elevación persistente de las transaminasas séricas posiblemente asociada al tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos. En contraposición, la deficiencia total de ACOX2 resulta en un cuadro clínico más severo, en el que los pacientes no sobreviven a la infancia, a pesar de que presentan ácidos biliares primarios C24.

CONCLUSIÓN SEGUNDA:

En los pacientes identificados con APD, una mutación de un solo nucleótido en el gen *ACOX2* conduce a la sustitución del aminoácido p.Arg225Trp, lo que genera una alteración en la actividad de la enzima, sin afectar al tamaño molecular ni a la localización subcelular de la misma. Basándonos en la posición del aminoácido afectado, esta mutación probablemente modifique la interacción con el cofactor (FAD) y/o la dimerización de la proteína.

CONCLUSIÓN TERCERA:

La presencia de otras variantes genéticas en *ACOX2* descritas en la población puede resultar en patologías similares a APD no diagnosticadas. Nuestros estudios preliminares indican que las mutaciones p.Arg614Cys, p.Glu406Gln, p.Arg264Gly, p.Ile238Thr, p.Arg574Cys y p.Gly284Cys en *ACOX2* tienen una repercusión funcional, por lo que es necesario llevar a cabo estudios genéticos que incluyan el gen *ACOX2* en individuos que presenten hipertransaminasemia de causa no filiada y otras enfermedades hepáticas de origen desconocido para determinar la epidemiología y gravedad de esta patología.

CONCLUSIÓN CUARTA:

En los pacientes con APD, la ausencia de metabolismo de los intermediarios C27 de la síntesis de los ácidos biliares y su acumulación provoca la inducción de estrés oxidativo y de retículo endoplásmico en células hepáticas, superando la hepatotoxicidad de otros ácidos biliares hidrofóbicos como los ácidos quenodesoxicólico y desoxicólico. Así, el ácido trihidroxicolestanoico (THCA) y sus derivados es el principal compuesto hepatotóxico que actúan como mediadores de la lesión hepática en APD. Asimismo, el

diclofenaco es capaz de interactuar con los mecanismos de hepatotoxicidad inducidos por el THCA, por lo que las mutaciones en *ACOX2* podrían actuar como factores predisponentes al daño hepático inducido por fármacos (DILI) y otras enfermedades hepáticas.

CONCLUSIÓN QUINTA:

FXR, el principal receptor nuclear implicado en la regulación fisiológica de la enzima limitante de la síntesis de ácidos biliares, *CYP7A1*, no parece influir en la expresión de *ACOX2*. Sin embargo, las citoquinas tienen un efecto importante en la expresión y actividad de esta enzima. Así, el estudio preliminar desarrollado en esta Tesis Doctoral sugiere una disminución de la expresión de *ACOX2* en pacientes con hepatopatías de tipo inflamatorio, aunque se necesitan más estudios para dilucidar el papel de *ACOX2* en estas enfermedades.

CONCLUSIÓN SEXTA:

La edición del gen *Acox2* de ratón mediante tecnología CRISPR/Cas9 ha permitido desarrollar un modelo de APD *in vivo*. Este modelo se asemeja al fenotipo humano, con una acumulación significativa de ácidos biliares C27 en el tejido hepático y la bilis, *a priori* sin la presencia de daño hepático ni otra sintomatología. Además, los portadores de la mutación en homocigosis presentaron una ausencia casi total de proteína *Acox2* en el tejido hepático y, a pesar de ello, una cantidad normal de ácidos biliares primarios C24, como en el caso de los pacientes con deficiencia total de *ACOX2*. Este modelo constituye una poderosa herramienta para el desarrollo de futuros estudios encaminados a investigar la fisiopatología de APD, el papel de *ACOX2* en DILI y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

6. BIBLIOGRAFÍA

Adachi T., Kaminaga T., Yasuda H., Kamiya T., Hara H. (2014). The involvement of endoplasmic reticulum stress in bile acid-induced hepatocellular injury. *J Clin Biochem Nutr* 54(2): 129-135.

Aleksunes L.M., Yeager R.L., Wen X., Cui J.Y., Klaassen C.D. (2012). Repression of hepatobiliary transporters and differential regulation of classic and alternative bile acid pathways in mice during pregnancy. *Toxicol Sci* 130(2): 257-268.

Alonso-Peña M. (2014). Búsqueda de las bases genéticas del trastorno en el metabolismo de los ácidos biliares en un paciente con colestasis intrahepática congénita. Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca. **Grado en Biotecnología.**

Alonso-Peña M. (2015). Desarrollo de un modelo para la evaluación funcional in vitro de la acil-CoA oxidasa ACOX2. Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca. **Máster en Fisiopatología y Farmacología Celular y Molecular.**

Alvarez-Sola G., Uriarte I., Latasa M.U., Jimenez M., Barcena-Varela M., Santamaria E., Urtasun R., Rodriguez-Ortigosa C., Prieto J., Berraondo P., Fernandez-Barrena M.G., Berasain C., Avila M.A. (2018). Bile acids, FGF15/19 and liver regeneration: From mechanisms to clinical applications. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864(4 Pt B): 1326-1334.

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

Aravindhan K., Webb C.L., Jaye M., Ghosh A., Willette R.N., DiNardo N.J., Jucker B.M. (2006). Assessing the effects of LXR agonists on cellular cholesterol handling: a stable isotope tracer study. *J Lipid Res* 47(6): 1250-1260.

Argemi J., Latasa M.U., Atkinson S.R., Blokhin I.O., Massey V., Gue J.P., Cabezas J., Lozano J.J., Van Booven D., Bell A., Cao S., Verneti L.A., Arab J.P., Ventura-Cots M., Edmunds L.R., Fondevilla C., Starkel P., Dubuquoy L., Louvet A., Odena G., Gomez J.L., Aragon T., Altamirano J., Caballeria J., Jurczak M.J., Taylor D.L., Berasain C., Wahlestedt C., Monga S.P., Morgan M.Y., Sancho-Bru P., Mathurin P., Furuya S., Lackner C., Rusyn I., Shah V.H., Thursz M.R., Mann J., Avila M.A., Bataller R. (2019). Defective HNF4alpha-dependent gene expression as a driver of hepatocellular failure in alcoholic hepatitis. *Nat Commun* 10(1): 3126.

Arias I.M., Wolkoff A.W., Boyer J.L., Shafritz D.A., Fausto N., Alter H.J., Cohen D.E. (2009). *The Liver: Biology and Pathobiology*.

Arnoldi A., Crimella C., Tenderini E., Martinuzzi A., D'Angelo M.G., Musumeci O., Toscano A., Scarlato M., Fantin M., Bresolin N., Bassi M.T. (2012). Clinical phenotype variability in patients with hereditary spastic paraplegia type 5 associated with CYP7B1 mutations. *Clin Genet* 81(2): 150-157.

Aubourg P., Wanders R. (2013). Peroxisomal disorders. *Handb Clin Neurol* 113: 1593-1609.

Avery S.V. (2011). Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J* 434(2): 201-210.

B. Delgado-Coello Coello M.S.-G., Rocío Alcantara (2017). *Avances en el Estudio Experimental de la Bioquímica Hepática*, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Bartosz G. (2009). Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol* 77(8): 1303-1315.

Bataller R., Brenner D.A. (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115(2): 209-218.

Baumgart E., Vanhooren J.C., Fransen M., Marynen P., Puype M., Vandekerckhove J., Leunissen J.A., Fahimi H.D., Mannaerts G.P., van Veldhoven P.P. (1996). Molecular characterization of the human peroxisomal branched-chain acyl-CoA oxidase: cDNA cloning, chromosomal assignment, tissue distribution, and evidence for the absence of the protein in Zellweger syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13748-13753.

Bechmann L.P., Kocabayoglu P., Sowa J.P., Sydor S., Best J., Schlattjan M., Beilfuss A., Schmitt J., Hannivoort R.A., Kilicarslan A., Rust C., Berr F., Tschopp O., Gerken G., Friedman S.L., Geier A., Canbay A. (2013). Free fatty acids repress small heterodimer partner (SHP) activation and adiponectin counteracts bile acid-induced liver injury in superobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 57(4): 1394-1406.

Bell C.C., Lauschke V.M., Vorrink S.U., Palmgren H., Duffin R., Andersson T.B., Ingelman-Sundberg M. (2017). Transcriptional, Functional, and Mechanistic Comparisons of Stem Cell-Derived Hepatocytes, HepaRG Cells, and Three-Dimensional Human Hepatocyte Spheroids as Predictive In Vitro Systems for Drug-Induced Liver Injury. *Drug Metab Dispos* 45(4): 419-429.

Bertolotti A., Zhang Y., Hendershot L.M., Harding H.P., Ron D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2(6): 326-332.

Biancheri R., Ciccolella M., Rossi A., Tessa A., Cassandrini D., Minetti C., Santorelli F.M. (2009). White matter lesions in spastic paraplegia with mutations in SPG5/CYP7B1. *Neuromuscul Disord* 19(1): 62-65.

Bjorklund S.S., Kristensen V.N., Seiler M., Kumar S., Alnaes G.I., Ming Y., Kerrigan J., Naume B., Sachidanandam R., Bhanot G., Borresen-Dale A.L., Ganesan S. (2015). Expression of an estrogen-regulated variant transcript of the peroxisomal branched chain fatty acid oxidase ACOX2 in breast carcinomas. *BMC Cancer* 15: 524.

Bohm F., Kohler U.A., Speicher T., Werner S. (2010). Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol Med* 2(8): 294-305.

Bolte S., Cordelieres F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224(Pt 3): 213-232.

Boulias K., Katrakili N., Bamberg K., Underhill P., Greenfield A., Talianidis I. (2005). Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP. *EMBO J* 24(14): 2624-2633.

Boyer J.L., Trauner M., Mennone A., Soroka C.J., Cai S.Y., Moustafa T., Zollner G., Lee J.Y., Ballatori N. (2006). Upregulation of a basolateral FXR-dependent bile acid efflux transporter OSTalpha-OSTbeta in cholestasis in humans and rodents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(6): G1124-1130.

Buchmann M.S., Kvittingen E.A., Nazer H., Gunasekaran T., Clayton P.T., Sjovall J., Bjorkhem I. (1990). Lack of 3 beta-hydroxy-delta 5-C27-steroid dehydrogenase/isomerase in fibroblasts from a child with urinary excretion of 3 beta-hydroxy-delta 5-bile acids. A new inborn error of metabolism. *J Clin Invest* 86(6): 2034-2037.

Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421.

Clayton P.T., Leonard J.V., Lawson A.M., Setchell K.D., Andersson S., Egestad B., Sjovall J. (1987). Familial giant cell hepatitis associated with synthesis of 3 beta, 7 alpha-dihydroxy-and 3 beta,7 alpha, 12 alpha-trihydroxy-5-cholenoic acids. *J Clin Invest* 79(4): 1031-1038.

Clayton P.T., Verrips A., Siermans E., Mann A., Mieli-Vergani G., Wevers R. (2002). Mutations in the sterol 27-hydroxylase gene (CYP27A) cause hepatitis of infancy as well as cerebrotendinous xanthomatosis. *J Inherit Metab Dis* 25(6): 501-513.

Columbano A., Ledda-Columbano G.M. (2003). Mitogenesis by ligands of nuclear receptors: an attractive model for the study of the molecular mechanisms implicated in liver growth. *Cell Death Differ* 10 Suppl 1: S19-21.

Cover C., Mansouri A., Knight T.R., Bajt M.L., Lemasters J.J., Pessayre D., Jaeschke H. (2005). Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 315(2): 879-887.

Cheema S.K., Agellon L.B. (2000). The murine and human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene promoters are differentially responsive to regulation by fatty acids mediated via peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 275(17): 12530-12536.

Chen W.D., Wang Y.D., Meng Z., Zhang L., Huang W. (2011). Nuclear bile acid receptor FXR in the hepatic regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1812(8): 888-892.

Chiang J.Y. (2013). Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol* 3(3): 1191-1212.

Chiang J.Y., Kimmel R., Stroup D. (2001). Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR α). *Gene* 262(1-2): 257-265.

Chow E.C., Magomedova L., Quach H.P., Patel R., Durk M.R., Fan J., Maeng H.J., Irondi K., Anakk S., Moore D.D., Cummins C.L., Pang K.S. (2014). Vitamin D receptor activation down-regulates the small heterodimer partner and increases CYP7A1 to lower cholesterol. *Gastroenterology* 146(4): 1048-1059.

Dai D., Mills P.B., Footitt E., Gissen P., McClean P., Stahlschmidt J., Coupry I., Lavie J., Mochel F., Goizet C., Mizuochi T., Kimura A., Nittono H., Schwarz K., Crick P.J., Wang Y., Griffiths W.J., Clayton P.T. (2014). Liver disease in infancy caused by oxysterol 7 α -hydroxylase deficiency: successful treatment with chenodeoxycholic acid. *J Inherit Metab Dis* 37(5): 851-861.

Daly A.K., Day C.P. (2009). Genetic association studies in drug-induced liver injury. *Semin Liver Dis* 29(4): 400-411.

Dawson P.A., Karpen S.J. (2015). Intestinal transport and metabolism of bile acids. *J Lipid Res* 56(6): 1085-1099.

Day C.P. (2002). Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16(5): 663-678.

Deavall D.G., Martin E.A., Horner J.M., Roberts R. (2012). Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol* 2012: 645460.

Decaens C., Rodriguez P., Bouchaud C., Cassio D. (1996). Establishment of hepatic cell polarity in the rat hepatoma-human fibroblast hybrid WIF-B9. A biphasic phenomenon going from a simple epithelial polarized phenotype to an hepatic polarized one. *J Cell Sci* 109 (Pt 6): 1623-1635.

del Castillo-Olivares A., Campos J.A., Pandak W.M., Gil G. (2004). The role of alpha1-fetoprotein transcription factor/LRH-1 in bile acid biosynthesis: a known nuclear receptor activator that can act as a suppressor of bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 279(16): 16813-16821.

Deng J., Lu P.D., Zhang Y., Scheuner D., Kaufman R.J., Sonenberg N., Harding H.P., Ron D. (2004). Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 24(23): 10161-10168.

Denson L.A., Sturm E., Echevarria W., Zimmerman T.L., Makishima M., Mangelsdorf D.J., Karpen S.J. (2001). The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 121(1): 140-147.

Diamond J.M. (1962). The reabsorptive function of the gall-bladder. *J Physiol* 161: 442-473.

Duan Y., Gross R.A., Sheu S.S. (2007). Ca²⁺-dependent generation of mitochondrial reactive oxygen species serves as a signal for poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during glutamate excitotoxicity. *J Physiol* 585(Pt 3): 741-758.

Duez H., van der Veen J.N., Duhem C., Pourcet B., Touvier T., Fontaine C., Derudas B., Bauge E., Havinga R., Bloks V.W., Wolters H., van der Sluijs F.H., Vennstrom B., Kuipers F., Staels B. (2008). Regulation of bile acid synthesis by the nuclear receptor Rev-erb α . *Gastroenterology* 135(2): 689-698.

DuRose J.B., Scheuner D., Kaufman R.J., Rothblum L.I., Niwa M. (2009). Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α coordinates rRNA transcription and translation inhibition during endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 29(15): 4295-4307.

Elferink R.O., Groen A.K. (2002). Genetic defects in hepatobiliary transport. *Biochim Biophys Acta* 1586(2): 129-145.

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4): 495-516.

Everson G.T., Polokoff M.A. (1986). HepG2. A human hepatoblastoma cell line exhibiting defects in bile acid synthesis and conjugation. *J Biol Chem* 261(5): 2197-2201.

Fagerberg L., Hallstrom B.M., Oksvold P., Kampf C., Djureinovic D., Odeberg J., Habuka M., Tahmasebpour S., Danielsson A., Edlund K., Asplund A., Sjostedt E., Lundberg E., Szgyarto C.A., Skogs M., Takanen J.O., Berling H., Tegel H., Mulder J., Nilsson P., Schwenk J.M., Lindskog C., Danielsson F., Mardinoglu A., Sivertsson A., von Feilitzen K., Forsberg M., Zwahlen M., Olsson I., Navani S., Huss M., Nielsen J., Ponten F., Uhlen M. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics* 13(2): 397-406.

Faubion W.A., Guicciardi M.E., Miyoshi H., Bronk S.F., Roberts P.J., Svingen P.A., Kaufmann S.H., Gores G.J. (1999). Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 103(1): 137-145.

Fazius E., Shelest V., Shelest E. (2011). SiTaR: a novel tool for transcription factor binding site prediction. *Bioinformatics* 27(20): 2806-2811.

Feldmann G. (1986). *El hígado. Histología y citología*.

Ferdinandusse S., Denis S., Dacremont G., Wanders R.J. (2009). Toxicity of peroxisomal C27-bile acid intermediates. *Mol Genet Metab* 96(3): 121-128.

Ferdinandusse S., Denis S., van Roermund C.W.T., Preece M.A., Koster J., Ebberink M.S., Waterham H.R., Wanders R.J.A. (2018). A novel case of ACOX2 deficiency leads to recognition of a third human peroxisomal acyl-CoA oxidase. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864(3): 952-958.

Ferdinandusse S., Jimenez-Sanchez G., Koster J., Denis S., Van Roermund C.W., Silva-Zolezzi I., Moser A.B., Visser W.F., Gulluoglu M., Durmaz O., Demirkol M., Waterham H.R., Gokcay G., Wanders R.J., Valle D. (2015). A novel bile acid biosynthesis defect due to a deficiency of peroxisomal ABCD3. *Hum Mol Genet* 24(2): 361-370.

Ferdinandusse S., Overmars H., Denis S., Waterham H.R., Wanders R.J., Vreken P. (2001). Plasma analysis of di- and trihydroxycholestanoic acid diastereoisomers in peroxisomal alpha-methylacyl-CoA racemase deficiency. *J Lipid Res* 42(1): 137-141.

Fickert P., Wagner M. (2017). Biliary bile acids in hepatobiliary injury - What is the link? *J Hepatol* 67(3): 619-631.

Finn R.D., Bateman A., Clements J., Coggill P., Eberhardt R.Y., Eddy S.R., Heger A., Hetherington K., Holm L., Mistry J., Sonnhammer E.L., Tate J., Punta M. (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42(Database issue): D222-230.

Fisher K., Vuppalanchi R., Saxena R. (2015). Drug-Induced Liver Injury. *Arch Pathol Lab Med* 139(7): 876-887.

Forbes S.J., Newsome P.N. (2016). Liver regeneration - mechanisms and models to clinical application. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13(8): 473-485.

Fotbolcu H., Zorlu E. (2016). Nonalcoholic fatty liver disease as a multi-systemic disease. *World J Gastroenterol* 22(16): 4079-4090.

Foufelle F., Fromenty B. (2016). Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacol Res Perspect* 4(1): e00211.

Franceschelli S., Moltedo O., Amodio G., Tajana G., Remondelli P. (2011). In the Huh7 Hepatoma Cells Diclofenac and Indomethacin Activate Differently the Unfolded Protein Response and Induce ER Stress Apoptosis. *Open Biochem J* 5: 45-51.

Fredriksson L., Wink S., Herpers B., Benedetti G., Hadi M., de Bont H., Groothuis G., Luijten M., Danen E., de Graauw M., Meerman J., van de Water B. (2014). Drug-induced endoplasmic reticulum and oxidative stress responses independently sensitize toward TNFalpha-mediated hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 140(1): 144-159.

Gaudio E., Carpino G., Cardinale V., Franchitto A., Onori P., Alvaro D. (2009). New insights into liver stem cells. *Dig Liver Dis* 41(7): 455-462.

Gbaguidi G.F., Agellon L.B. (2004). The inhibition of the human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) promoter by fibrates in cultured cells is mediated via the liver x receptor alpha and peroxisome proliferator-activated receptor alpha heterodimer. *Nucleic Acids Res* 32(3): 1113-1121.

Geer L.Y., Marchler-Bauer A., Geer R.C., Han L., He J., He S., Liu C., Shi W., Bryant S.H. (2010). The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res* 38(Database issue): D492-496.

Gerasimenko J.V., Flowerdew S.E., Voronina S.G., Sukhomlin T.K., Tepikin A.V., Petersen O.H., Gerasimenko O.V. (2006). Bile acids induce Ca²⁺ release from both the endoplasmic reticulum and acidic intracellular calcium stores through activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors. *J Biol Chem* 281(52): 40154-40163.

Gong Y.Z., Everett E.T., Schwartz D.A., Norris J.S., Wilson F.A. (1994). Molecular cloning, tissue distribution, and expression of a 14-kDa bile acid-binding protein from rat ileal cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11): 4741-4745.

Gonzales E., Cresteil D., Baussan C., Dabadie A., Gerhardt M.F., Jacquemin E. (2004). SRD5B1 (AKR1D1) gene analysis in delta(4)-3-oxosteroid 5beta-reductase deficiency: evidence for primary genetic defect. *J Hepatol* 40(4): 716-718.

Goodwin B., Jones S.A., Price R.R., Watson M.A., McKee D.D., Moore L.B., Galardi C., Wilson J.G., Lewis M.C., Roth M.E., Maloney P.R., Willson T.M., Kliewer S.A. (2000). A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 6(3): 517-526.

Grabe N. (2002). AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. *In Silico Biol* 2(1): S1-15.

Gripon P., Rumin S., Urban S., Le Seyec J., Glaise D., Cannie I., Guyomard C., Lucas J., Trepo C., Guguen-Guillouzo C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15655-15660.

Hagenbuch B., Dawson P. (2004a). The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch* 447(5): 566-570.

Hagenbuch B., Meier P.J. (2004b). Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447(5): 653-665.

Hall J.E. (2016). *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica.*

Han S., Chiang J.Y. (2009). Mechanism of vitamin D receptor inhibition of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 37(3): 469-478.

Han S., Li T., Ellis E., Strom S., Chiang J.Y. (2010). A novel bile acid-activated vitamin D receptor signaling in human hepatocytes. *Mol Endocrinol* 24(6): 1151-1164.

Hayashi H., De Bellis L., Yamaguchi K., Kato A., Hayashi M., Nishimura M. (1998). Molecular characterization of a glyoxysomal long chain acyl-CoA oxidase that is synthesized as a precursor of higher molecular mass in pumpkin. *J Biol Chem* 273(14): 8301-8307.

Hetz C., Papa F.R. (2018). The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell* 69(2): 169-181.

Hodo Y., Hashimoto S., Honda M., Yamashita T., Suzuki Y., Sugano S., Kaneko S., Matsushima K. (2010). Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. *Genomics* 95(4): 217-223.

Hofmann A.F. (1976). The enterohepatic circulation of bile acids in man. *Adv Intern Med* 21: 501-534.

Hofmann A.F. (1977). The enterohepatic circulation of bile acids in man. *Clin Gastroenterol* 6(1): 3-24.

Hofmann A.F., Hagey L.R. (2008). Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 65(16): 2461-2483.

Hofmann A.F., Hagey L.R., Krasowski M.D. (2010). Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. *J Lipid Res* 51(2): 226-246.

Hofmann A.F., Roda A. (1984). Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *J Lipid Res* 25(13): 1477-1489.

Holt J.A., Luo G., Billin A.N., Bisi J., McNeill Y.Y., Kozarsky K.F., Donahee M., Wang D.Y., Mansfield T.A., Kliewer S.A., Goodwin B., Jones S.A. (2003). Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev* 17(13): 1581-1591.

Hoshino R., Chatani Y., Yamori T., Tsuruo T., Oka H., Yoshida O., Shimada Y., Ari-i S., Wada H., Fujimoto J., Kohno M. (1999). Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18(3): 813-822.

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

Ichimiya H., Egestad B., Nazer H., Baginski E.S., Clayton P.T., Sjovall J. (1991). Bile acids and bile alcohols in a child with hepatic 3 beta-hydroxy-delta 5-C27-steroid dehydrogenase deficiency: effects of chenodeoxycholic acid treatment. *J Lipid Res* 32(5): 829-841.

Ihunnah C.A., Jiang M., Xie W. (2011). Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochim Biophys Acta* 1812(8): 956-963.

Inagaki T., Moschetta A., Lee Y.K., Peng L., Zhao G., Downes M., Yu R.T., Shelton J.M., Richardson J.A., Repa J.J., Mangelsdorf D.J., Kliewer S.A. (2006). Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10): 3920-3925.

Inoue Y., Yu A.M., Yim S.H., Ma X., Krausz K.W., Inoue J., Xiang C.C., Brownstein M.J., Eggertsen G., Bjorkhem I., Gonzalez F.J. (2006). Regulation of bile acid biosynthesis by hepatocyte nuclear factor 4alpha. *J Lipid Res* 47(1): 215-227.

Izukura M., Hashimoto T., Gomez G., Uchida T., Greeley G.H., Jr., Thompson J.C. (1991). Intracolonic infusion of bile salt stimulates release of peptide YY and inhibits cholecystokinin-stimulated pancreatic exocrine secretion in conscious dogs. *Pancreas* 6(4): 427-432.

Jahn D., Geier A. (2018). Bile acids in nonalcoholic steatohepatitis: Pathophysiological driving force or innocent bystanders? *Hepatology* 67(2): 464-466.

Janowski B.A., Willy P.J., Devi T.R., Falck J.R., Mangelsdorf D.J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383(6602): 728-731.

Jansen P.L., Sturm E. (2003). Genetic cholestasis, causes and consequences for hepatobiliary transport. *Liver Int* 23(5): 315-322.

Kaliyaperumal K., Grove J.I., Delahay R.M., Griffiths W.J.H., Duckworth A., Aithal G.P. (2018). Pharmacogenomics of drug-induced liver injury (DILI): Molecular biology to clinical applications. *J Hepatol* 69(4): 948-957.

Kaneko M., Niinuma Y., Nomura Y. (2003). Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol Pharm Bull* 26(7): 931-935.

Kaplowitz N., Ji C. (2006). Unfolding new mechanisms of alcoholic liver disease in the endoplasmic reticulum. *J Gastroenterol Hepatol* 21 Suppl 3: S7-9.

Kawamata Y., Fujii R., Hosoya M., Harada M., Yoshida H., Miwa M., Fukusumi S., Habata Y., Itoh T., Shintani Y., Hinuma S., Fujisawa Y., Fujino M. (2003). A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 278(11): 9435-9440.

Kim J.J., Wang M., Paschke R. (1993). Crystal structures of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria with and without substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(16): 7523-7527.

Kuroda H., Kutner R.H., Bazan N.G., Reiser J. (2009). Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection. *J Virol Methods* 157(2): 113-121.

Laible M., Boonrod K. (2009). Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids. *J Vis Exp*(27).

Le Vee M., Gripon P., Stieger B., Fardel O. (2008). Down-regulation of organic anion transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokine interleukin 1beta. *Drug Metab Dispos* 36(2): 217-222.

Le Vee M., Jouan E., Stieger B., Lecureur V., Fardel O. (2011). Regulation of drug transporter expression by oncostatin M in human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 82(3): 304-311.

Lefebvre P., Cariou B., Lien F., Kuipers F., Staels B. (2009). Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 89(1): 147-191.

Lehmann J.M., Kliewer S.A., Moore L.B., Smith-Oliver T.A., Oliver B.B., Su J.L., Sundseth S.S., Winegar D.A., Blanchard D.E., Spencer T.A., Willson T.M. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 272(6): 3137-3140.

Lerner A.G., Upton J.P., Praveen P.V., Ghosh R., Nakagawa Y., Igarria A., Shen S., Nguyen V., Backes B.J., Heiman M., Heintz N., Greengard P., Hui S., Tang Q., Trusina A., Oakes S.A., Papa F.R. (2012). IRE1alpha induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab* 16(2): 250-264.

Levy M.T., Trojanowska M., Reuben A. (2000). Oncostatin M: a cytokine upregulated in human cirrhosis, increases collagen production by human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 32(2): 218-226.

Li H., Chen F., Shang Q., Pan L., Shneider B.L., Chiang J.Y., Forman B.M., Ananthanarayanan M., Tint G.S., Salen G., Xu G. (2005a). FXR-activating ligands inhibit rabbit ASBT expression via FXR-SHP-FTF cascade. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(1): G60-66.

Li L., Zhao G.D., Shi Z., Qi L.L., Zhou L.Y., Fu Z.X. (2016). The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC. *Oncol Lett* 12(5): 3045-3050.

Li M., Cai S.Y., Boyer J.L. (2017). Mechanisms of bile acid mediated inflammation in the liver. *Mol Aspects Med* 56: 45-53.

Li T., Chiang J.Y. (2005b). Mechanism of rifampicin and pregnane X receptor inhibition of human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(1): G74-84.

Li T., Chiang J.Y. (2007). A novel role of transforming growth factor beta1 in transcriptional repression of human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene. *Gastroenterology* 133(5): 1660-1669.

Li T., Jahan A., Chiang J.Y. (2006a). Bile acids and cytokines inhibit the human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene via the JNK/c-jun pathway in human liver cells. *Hepatology* 43(6): 1202-1210.

Li T., Kong X., Owsley E., Ellis E., Strom S., Chiang J.Y. (2006b). Insulin regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase expression in human hepatocytes: roles of forkhead box O1 and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem* 281(39): 28745-28754.

Liu Y., Shoji-Kawata S., Sumpter R.M., Jr., Wei Y., Ginet V., Zhang L., Posner B., Tran K.A., Green D.R., Xavier R.J., Shaw S.Y., Clarke P.G., Puyal J., Levine B. (2013). Autosis is a Na⁺,K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(51): 20364-20371.

LiverTox (2019). "Drug Record: Diclofenac. LiverTox. Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury.". Consultado 08/07/2019, en <https://livertox.nlm.nih.gov/Diclofenac.htm>.

Lo Sasso G., Petruzzelli M., Moschetta A. (2008). A translational view on the biliary lipid secretory network. *Biochim Biophys Acta* 1781(3): 79-96.

Maeda Y., Seidel S.D., Wei G., Liu X., Sladek F.M. (2002). Repression of hepatocyte nuclear factor 4alpha tumor suppressor p53: involvement of the ligand-binding domain and histone deacetylase activity. *Mol Endocrinol* 16(2): 402-410.

Makishima M., Lu T.T., Xie W., Whitfield G.K., Domoto H., Evans R.M., Haussler M.R., Mangelsdorf D.J. (2002). Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 296(5571): 1313-1316.

Makishima M., Okamoto A.Y., Repa J.J., Tu H., Learned R.M., Luk A., Hull M.V., Lustig K.D., Mangelsdorf D.J., Shan B. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284(5418): 1362-1365.

Marin J.J., Macias R.I., Briz O., Banales J.M., Monte M.J. (2015). Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. *Curr Drug Metab* 17(1): 4-29.

Markwell M.A., Haas S.M., Bieber L.L., Tolbert N.E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87(1): 206-210.

Marrapodi M., Chiang J.Y. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and agonist inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *J Lipid Res* 41(4): 514-520.

Mathis U., Karlaganis G., Preisig R. (1983). Monohydroxy bile salt sulfates: tauro-3 beta-hydroxy-5-cholenoate-3-sulfate induces intrahepatic cholestasis in rats. *Gastroenterology* 85(3): 674-681.

Matys V., Kel-Margoulis O.V., Fricke E., Liebich I., Land S., Barre-Dirrie A., Reuter I., Chekmenev D., Krull M., Hornischer K., Voss N., Stegmaier P., Lewicki-Potapov B., Saxel H., Kel A.E., Wingender E. (2006). TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 34(Database issue): D108-110.

McGill M.R. (2016). The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI J* 15: 817-828.

McInnes I.B. (2017). Cytokines. Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology **1**: 396-407.

Meier P.J. (1988). Transport polarity of hepatocytes. *Semin Liver Dis* 8(4): 293-307.

Mendoza M.E., Monte M.J., Serrano M.A., Pastor-Anglada M., Stieger B., Meier P.J., Medarde M., Marin J.J. (2003). Physiological characteristics of allo-cholic acid. *J Lipid Res* 44(1): 84-92.

Miao J., Fang S., Bae Y., Kemper J.K. (2006). Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1alpha. *J Biol Chem* 281(21): 14537-14546.

Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. (1997). Liver regeneration. *Science* 276(5309): 60-66.

Miyake J.H., Wang S.L., Davis R.A. (2000). Bile acid induction of cytokine expression by macrophages correlates with repression of hepatic cholesterol 7alpha-hydroxylase. *J Biol Chem* 275(29): 21805-21808.

Mizuochi T., Kimura A., Suzuki M., Ueki I., Takei H., Nittono H., Kakiuchi T., Shigeta T., Sakamoto S., Fukuda A., Nakazawa A., Shimizu T., Kurosawa T., Kasahara M. (2011). Successful heterozygous living donor liver transplantation for an oxysterol 7alpha-hydroxylase deficiency in a Japanese patient. *Liver Transpl* 17(9): 1059-1065.

Mizushima N. (2011). Autophagy in protein and organelle turnover. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76: 397-402.

Monte M.J., Badia M.D., Serrano M.A., Sacristan M.P., Cassio D., Marin J.J. (2001). Predominance of human versus rat phenotype in the metabolic pathways for bile acid synthesis by hybrid WIF-B9 cells. *Biochim Biophys Acta* 1534(1): 45-55.

Nadanaciva S., Aleo M.D., Strock C.J., Stedman D.B., Wang H., Will Y. (2013). Toxicity assessments of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in isolated mitochondria, rat hepatocytes, and zebrafish show good concordance across chemical classes. *Toxicol Appl Pharmacol* 272(2): 272-280.

Nagahashi M., Takabe K., Liu R., Peng K., Wang X., Wang Y., Hait N.C., Allegood J.C., Yamada A., Aoyagi T., Liang J., Pandak W.M., Spiegel S., Hylemon P.B., Zhou H. (2015). Conjugated bile acid-activated S1P receptor 2 is a key regulator of sphingosine kinase 2 and hepatic gene expression. *Hepatology* 61(4): 1216-1226.

Nakagawa M., Setchell K.D. (1990). Bile acid metabolism in early life: studies of amniotic fluid. *J Lipid Res* 31(6): 1089-1098.

Nakajima Y., Miyahara I., Hirotsu K., Nishina Y., Shiga K., Setoyama C., Tamaoki H., Miura R. (2002). Three-dimensional structure of the flavoenzyme acyl-CoA oxidase-II from rat liver, the peroxisomal counterpart of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenase. *J Biochem* 131(3): 365-374.

Nakashima T., Sakamoto Y., Inaba K., Mitsuyoshi H., Ishikawa H., Nakajima Y., Sakai M., Shima T., Kashima K. (1999). A paucity of unusual trihydroxy bile acids in the urine of patients with severe liver diseases. *Hepatology* 29(5): 1518-1522.

Nauseef W.M. (2008). Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *J Biol Chem* 283(25): 16961-16965.

Nembaware V., Lupindo B., Schouest K., Spillane C., Scheffler K., Seoighe C. (2008). Genome-wide survey of allele-specific splicing in humans. *BMC Genomics* 9: 265.

Nishimaki-Mogami T., Une M., Fujino T., Sato Y., Tamehiro N., Kawahara Y., Shudo K., Inoue K. (2004). Identification of intermediates in the bile acid synthetic pathway as ligands for the farnesoid X receptor. *J Lipid Res* 45(8): 1538-1545.

OMIM® (2019). "Online Mendelian Inheritance in Man." Consultado 12/02/2019 en <https://omim.org/>.

Otao R., Beppu T., Isiko T., Mima K., Okabe H., Hayashi H., Masuda T., Chikamoto A., Takamori H., Baba H. (2012). External biliary drainage and liver regeneration after major hepatectomy. *Br J Surg* 99(11): 1569-1574.

Parks D.J., Blanchard S.G., Bledsoe R.K., Chandra G., Consler T.G., Kliewer S.A., Stimmel J.B., Willson T.M., Zavacki A.M., Moore D.D., Lehmann J.M. (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284(5418): 1365-1368.

Pedersen L., Henriksen A. (2005). Acyl-CoA oxidase 1 from *Arabidopsis thaliana*. Structure of a key enzyme in plant lipid metabolism. *J Mol Biol* 345(3): 487-500.

Pérez-Silva L. (2014). Papel del factor de transcripción SOX17 en el desarrollo de quimiorresistencia en tumores hepáticos y digestivos. Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca. **Grado en Salamanca**.

Perez M.J., Briz O. (2009). Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 15(14): 1677-1689.

Pineda Torra I., Claudel T., Duval C., Kosykh V., Fruchart J.C., Staels B. (2003). Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene via activation of the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol* 17(2): 259-272.

Pircher P.C., Kitto J.L., Petrowski M.L., Tangirala R.K., Bischoff E.D., Schulman I.G., Westin S.K. (2003). Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J Biol Chem* 278(30): 27703-27711.

Portincasa P., Di Ciaula A., Wang H.H., Moschetta A., Wang D.Q. (2009). Medicinal treatments of cholesterol gallstones: old, current and new perspectives. *Curr Med Chem* 16(12): 1531-1542.

Possel H., Noack H., Augustin W., Keilhoff G., Wolf G. (1997). 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Lett* 416(2): 175-178.

Protein-Atlas (2019). Consultado 08/04/2019, en <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168306-ACOX2/tissue>.

Pullinger C.R., Eng C., Salen G., Shefer S., Batta A.K., Erickson S.K., Verhagen A., Rivera C.R., Mulvihill S.J., Malloy M.J., Kane J.P. (2002). Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest* 110(1): 109-117.

Quinn C.M., Jessup W., Wong J., Kritharides L., Brown A.J. (2005). Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPAR γ ligands. *Biochem J* 385(Pt 3): 823-830.

Rao R.V., Ellerby H.M., Bredesen D.E. (2004). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11(4): 372-380.

Reece R.J. (2004). *Analysis of Genes and Genomes*.

Ridlon J.M., Kang D.J., Hylemon P.B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 47(2): 241-259.

Rogue A., Lambert C., Josse R., Antherieu S., Spire C., Claude N., Guillouzo A. (2011). Comparative gene expression profiles induced by PPAR γ and PPAR α / γ agonists in human hepatocytes. *PLoS One* 6(4): e18816.

Ron D., Walter P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 519-529.

Roth R.A., Maiuri A.R., Ganey P.E. (2017). Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury: Is Drug-Cytokine Interaction the Linchpin? *J Pharmacol Exp Ther* 360(2): 461-470.

Russell D.W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 72: 137-174.

Ryan R.E., Martin B., Mellor L., Jacob R.B., Tawara K., McDougal O.M., Oxford J.T., Joreyk C.L. (2015). Oncostatin M binds to extracellular matrix in a bioactive conformation: implications for inflammation and metastasis. *Cytokine* 72(1): 71-85.

Salen G., Shefer S., Cheng F.W., Dayal B., Batta A.K., Tint G.S. (1979). Cholic acid biosynthesis: the enzymatic defect in cerebrotendinous xanthomatosis. *J Clin Invest* 63(1): 38-44.

Schippers I.J., Moshage H., Roelofsen H., Muller M., Heymans H.S., Ruiters M., Kuipers F. (1997). Immortalized human hepatocytes as a tool for the study of hepatocytic (de-)differentiation. *Cell Biol Toxicol* 13(4-5): 375-386.

Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7): 671-675.

Sell S. (2001). Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 33(3): 738-750.

Setchell K.D., Dumaswala R., Colombo C., Ronchi M. (1988). Hepatic bile acid metabolism during early development revealed from the analysis of human fetal gallbladder bile. *J Biol Chem* 263(32): 16637-16644.

Setchell K.D., Heubi J.E., Shah S., Lavine J.E., Suskind D., Al-Edreesi M., Potter C., Russell D.W., O'Connell N.C., Wolfe B., Jha P., Zhang W., Bove K.E., Knisely A.S., Hofmann A.F., Rosenthal P., Bull L.N. (2013). Genetic defects in bile acid conjugation cause fat-soluble vitamin deficiency. *Gastroenterology* 144(5): 945-955 e946; quiz e914-945.

Setchell K.D., Lawson A.M., Tanida N., Sjovall J. (1983). General methods for the analysis of metabolic profiles of bile acids and related compounds in feces. *J Lipid Res* 24(8): 1085-1100.

Setchell K.D., Schwarz M., O'Connell N.C., Lund E.G., Davis D.L., Lathe R., Thompson H.R., Weslie Tyson R., Sokol R.J., Russell D.W. (1998). Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. *J Clin Invest* 102(9): 1690-1703.

Sharma V., Hiller M. (2018). Loss of Enzymes in the Bile Acid Synthesis Pathway Explains Differences in Bile Composition among Mammals. *Genome Biol Evol* 10(12): 3211-3217.

Shefer S., Cheng F.W., Dayal B., Hauser S., Tint G.S., Salen G., Mosbach E.H. (1976). A 25-hydroxylation pathway of cholic acid biosynthesis in man and rat. *J Clin Invest* 57(4): 897-903.

Shen J., Chen X., Hendershot L., Prywes R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* 3(1): 99-111.

Smit M.J., Kuipers F., Vonk R.J., Temmerman A.M., Jackle S., Windler E.E. (1993). Effects of dietary cholesterol on bile formation and hepatic processing of chylomicron remnant cholesterol in the rat. *Hepatology* 17(3): 445-454.

Sommerfeld A., Reinehr R., Haussinger D. (2009). Bile acid-induced epidermal growth factor receptor activation in quiescent rat hepatic stellate cells can trigger both proliferation and apoptosis. *J Biol Chem* 284(33): 22173-22183.

Song K.H., Chiang J.Y. (2006). Glucagon and cAMP inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) gene expression in human hepatocytes: discordant regulation of bile acid synthesis and gluconeogenesis. *Hepatology* 43(1): 117-125.

Song K.H., Ellis E., Strom S., Chiang J.Y. (2007). Hepatocyte growth factor signaling pathway inhibits cholesterol 7alpha-hydroxylase and bile acid synthesis in human hepatocytes. *Hepatology* 46(6): 1993-2002.

Song K.H., Li T., Owsley E., Strom S., Chiang J.Y. (2009). Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene expression. *Hepatology* 49(1): 297-305.

Steinberg S.J., Dodt G., Raymond G.V., Braverman N.E., Moser A.B., Moser H.W. (2006). Peroxisome biogenesis disorders. *Biochim Biophys Acta* 1763(12): 1733-1748.

Stephens J.M., Elks C.M. (2017). Oncostatin M: Potential Implications for Malignancy and Metabolism. *Curr Pharm Des* 23(25): 3645-3657.

Stojavljevic S., Gomercic Palcic M., Virovic Jukic L., Smircic Duvnjak L., Duvnjak M. (2014). Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 20(48): 18070-18091.

Suga T., Yamaguchi H., Sato T., Maekawa M., Goto J., Mano N. (2017). Preference of Conjugated Bile Acids over Unconjugated Bile Acids as Substrates for OATP1B1 and OATP1B3. *PLoS One* 12(1): e0169719.

Szekeres M., Viskolcz B., Posa M., Csanadi J., Skoric D., Illes E., Toth I.Y., Tombacz E. (2014). The effect of hydroxyl moieties and their oxosubstitution on bile acid association studied in floating monolayers. *ScientificWorldJournal* 2014: 152972.

Tait S.W., Ichim G., Green D.R. (2014). Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci* 127(Pt 10): 2135-2144.

Thomas C., Auwerx J., Schoonjans K. (2008). Bile acids and the membrane bile acid receptor TGR5--connecting nutrition and metabolism. *Thyroid* 18(2): 167-174.

Thomas C., Gioiello A., Noriega L., Strehle A., Oury J., Rizzo G., Macchiarulo A., Yamamoto H., Matakis C., Pruzanski M., Pellicciari R., Auwerx J., Schoonjans K. (2009). TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* 10(3): 167-177.

Trauner M., Boyer J.L. (2003). Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83(2): 633-671.

Tsaousidou M.K., Ouahchi K., Warner T.T., Yang Y., Simpson M.A., Laing N.G., Wilkinson P.A., Madrid R.E., Patel H., Hentati F., Patton M.A., Hentati A., Lamont P.J., Siddique T., Crosby A.H. (2008). Sequence alterations within CYP7B1 implicate defective cholesterol homeostasis in motor-neuron degeneration. *Am J Hum Genet* 82(2): 510-515.

Ueda J., Chijiwa K., Nakano K., Zhao G., Tanaka M. (2002). Lack of intestinal bile results in delayed liver regeneration of normal rat liver after hepatectomy accompanied by impaired cyclin E-associated kinase activity. *Surgery* 131(5): 564-573.

Ueki I., Kimura A., Nishiyori A., Chen H.L., Takei H., Nittono H., Kurosawa T. (2008). Neonatal cholestatic liver disease in an Asian patient with a homozygous mutation in the oxysterol 7 α -hydroxylase gene. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 46(4): 465-469.

Urano F., Wang X., Bertolotti A., Zhang Y., Chung P., Harding H.P., Ron D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287(5453): 664-666.

Urrea H., Dufey E., Lisbona F., Rojas-Rivera D., Hetz C. (2013). When ER stress reaches a dead end. *Biochim Biophys Acta* 1833(12): 3507-3517.

Valdez I.H., Fox P.C. (1991). Interactions of the salivary and gastrointestinal systems. II. Effects of salivary gland dysfunction on the gastrointestinal tract. *Dig Dis* 9(4): 210-218.

Vasavan T., Ferraro E., Ibrahim E., Dixon P., Gorelik J., Williamson C. (2018). Heart and bile acids - Clinical consequences of altered bile acid metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864(4 Pt B): 1345-1355.

Vaz F.M., Ferdinandusse S. (2017). Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis. *Mol Aspects Med* 56: 10-24.

Vilarinho S., Sari S., Mazzacuva F., Bilguvar K., Esendagli-Yilmaz G., Jain D., Akyol G., Dalgic B., Gunel M., Clayton P.T., Lifton R.P. (2016). ACOX2 deficiency: A disorder of bile acid synthesis with transaminase elevation, liver fibrosis, ataxia, and cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(40): 11289-11293.

Wanders R.J., Ferdinandusse S. (2012). Peroxisomes, peroxisomal diseases, and the hepatotoxicity induced by peroxisomal metabolites. *Curr Drug Metab* 13(10): 1401-1411.

Wanders R.J., Waterham H.R. (2005). Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clin Genet* 67(2): 107-133.

Waterham H.R., Ebberink M.S. (2012). Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. *Biochim Biophys Acta* 1822(9): 1430-1441.

Waterhouse A.M., Procter J.B., Martin D.M., Clamp M., Barton G.J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25(9): 1189-1191.

Willson T.M., Jones S.A., Moore J.T., Kliwer S.A. (2001). Chemical genomics: functional analysis of orphan nuclear receptors in the regulation of bile acid metabolism. *Med Res Rev* 21(6): 513-522.

Wrobel J., Steffan R., Bowen S.M., Magolda R., Matelan E., Unwalla R., Basso M., Clerin V., Gardell S.J., Nambi P., Quinet E., Reminick J.I., Vlasuk G.P., Wang S., Feingold I., Huselton C., Bonn T., Farnegardh M., Hansson T., Nilsson A.G., Wilhelmsson A., Zamaratski E., Evans M.J. (2008). Indazole-based liver X receptor

(LXR) modulators with maintained atherosclerotic lesion reduction activity but diminished stimulation of hepatic triglyceride synthesis. *J Med Chem* 51(22): 7161-7168.

Xie W., Radomska-Pandya A., Shi Y., Simon C.M., Nelson M.C., Ong E.S., Waxman D.J., Evans R.M. (2001). An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3375-3380.

Ye L., Liu S., Wang M., Shao Y., Ding M. (2007). High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 860(1): 10-17.

Yoshik Amuro K.K., Eiji Aoki, Noboru Ueki, Toshikazu Hada, Kiyohisa Uchida, Kazuya Higashino (1994). Bile acid synthesis by the HuH-7 cell line derived from a human hepatocellular carcinoma. *International Hepatology Communications* 2(1): 21-28.

Zhang J., Huang W., Qatanani M., Evans R.M., Moore D.D. (2004). The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. *J Biol Chem* 279(47): 49517-49522.

Zhang M., Chiang J.Y. (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* 276(45): 41690-41699.

Zhao Y., Meng C., Wang Y., Huang H., Liu W., Zhang J.F., Zhao H., Feng B., Leung P.S., Xia Y. (2016). IL-1beta inhibits beta-Klotho expression and FGF19 signaling in hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 310(4): E289-300.

Zhou M., Yang H., Learned R.M., Tian H., Ling L. (2017). Non-cell-autonomous activation of IL-6/STAT3 signaling mediates FGF19-driven hepatocarcinogenesis. *Nat Commun* 8: 15433.

5. ENGLISH SUMMARY

UNIVERSITY OF SALAMANCA

FACULTY OF BIOLOGY

DEPARTAMENT OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY



**IDENTIFICATION OF A NEW GENETIC DEFECT IN BILE ACID
SYNTHESIS: ACOX2 PARTIAL DEFICIENCY. MOLECULAR BASES,
PATHOPHYSIOLOGY AND IMPLICATION IN IDIOPATHIC
HEPATOCELLULAR DISEASE**

Presented by **Marta Alonso Peña** to obtain the PhD degree in the University of
Salamanca

2019

AIMS

Bile acids (BAs) play a key role in the digestive and excretory functions of the liver. Their active bile secretion is essential for the generation of bile flow by osmotic filtration. In addition, BAs are important mediators involved in the regulation of energy, sugar and lipids metabolism, but also in the inflammatory and regenerative processes of the liver.

There is a great variety of pathologies associated with failures in BA metabolism. In most cases, these are very severe and infrequent conditions that affect not only liver tissue, but also cause neurological, renal and endocrine disorders due to the accumulation of potentially toxic intermediary metabolites. The complex relationship among the biosynthetic routes of BAs, fatty acids and steroid hormones, all molecules derived from cholesterol, and the importance of all these molecules in the physiology, are probably the cause of the great variety and symptomatic severity of this group of diseases. Moreover, the detergent properties of BAs, a key characteristic for their fat solubilizing function, constitutes an important risk for cellular damage when they accumulate in tissues. This Doctoral Thesis was started to elucidate the etiopathogenesis of a clinical case concerning an adolescent patient seen in the consultation by Dr. Jesús Prieto Valtuille, a specialist in Internal Medicine and Hepatology at the University of Navarra, who reported episodes of intrahepatic cholestasis of unknown cause in this patient. The most important clinical sign was the elevation of serum transaminase levels, maintained over time, after an episode of severe hepatotoxicity related to the treatment with ibuprofen and diclofenac of an inflammatory process due to a traumatic knee injury. After ruling out the most common pathologies associated with hepatic damage, genetic analysis made it possible to identify in the patient's genome a mutation (c.673C>T) in homozygosis in the coding region of the *ACOX2* gene, which encodes acyl-CoA oxidase 2 (*ACOX2*), a peroxisomal enzyme involved in the side chain shortening during the *de novo* BAs synthesis.

The hypothesis of this project was that a functional alteration affecting ACOX2 can cause a deficiency of primary BAs and the accumulation of hepatotoxic precursors, thus compromising the detoxifying and regenerative capacities of the liver. This alteration could be present in other cases of persistent hypertransaminasemia of non-filiated cause, as well as constituting a predisposing factor to drug-induced liver injury (DILI) and even increased risk of cirrhosis and, subsequently, hepatocellular carcinoma development.

With this background, the **global aim** of this Doctoral Thesis was to identify the molecular bases of this new genetic defect in the metabolism of BAs, to define the transmission patterns, to study the concomitant factors that induce its development, to characterize its pathophysiology and to evaluate its possible role in idiosyncratic DILI (iDILI) and in other hepatic diseases of incompletely defined etiology, such as non-alcoholic steatohepatitis (NASH) or the hepatocellular carcinoma that rarely develops on apparently healthy liver.

Accordingly, we initially defined the following **partial aims**:

Aim 1: To describe the clinical condition of the patient with ACOX2 partial deficiency (APD), as well as to identify the genetic bases and to elaborate the family tree of the alteration.

Aim 2: To develop an *in vitro* model of ACOX2 overexpression in liver cells for the functional evaluation of ACOX2 variants.

Aim 3: To carry out an *in silico* study to screen for additional ACOX2 variants that could lead to functional disorders, and to develop *in vitro* models.

Aim 4: To assess the etiological mechanisms of damage induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in patients with APD.

Aim 5: To investigate the physiological and pathophysiological mechanisms involved in the regulation of ACOX2 activity.

Aim 6: To develop, using CRISPR/Cas9 gene editing tools, a mouse model of the disease that can mimic the phenotypic characteristics of APD identified in the patient.



ACOX2 deficiency: An inborn error of bile acid synthesis identified in an adolescent with persistent hypertransaminasemia

Maria J. Monte^{1,3}, Marta Alonso-Peña¹, Oscar Briz^{1,3}, Elisa Herraes^{1,3}, Carmen Berasain^{2,3}, Josepmaria Argemi², Jesus Prieto^{2,3,*}, Jose J.G. Marin^{1,3,*}

¹Experimental Hepatology and Drug Targeting (HEVEFARM), Institute for Biomedical Research (IBSAL), University of Salamanca, Salamanca, Spain; ²Department of Medicine, Clinica Universidad de Navarra and Center for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra, Pamplona, Spain; ³Center for the Study of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBERehd), Carlos III National Institute of Health, Spain

Background & Aims: Acyl-CoA oxidase (ACOX2) is involved in the shortening of C27 cholesterol derivatives to generate C24 bile acids. Inborn errors affecting the rest of peroxisomal enzymes involved in bile acid biosynthesis have been described. Here we aimed at investigating the case of an adolescent boy with persistent hypertransaminasemia of unknown origin and suspected dysfunction in bile acid metabolism.

Methods: Serum and urine samples were taken from the patient, his sister and parents and underwent HPLC-MS/MS and HPLC-TOF analyses. Coding exons in genes of interest were amplified by high-fidelity PCR and sequenced. Wild-type or mutated (mutACOX2) variants were overexpressed in human hepatoblastoma HepG2 cells to determine ACOX2 enzymatic activity, expression and subcellular location.

Results: The patient's serum and urine showed negligible amounts of C24 bile acids, but augmented levels of C27 intermediates, mainly tauroconjugated trihydroxycholestanic acid (THCA). Genetic analysis of enzymes potentially involved revealed a homozygous missense mutation (c.673C>T; R225W) in ACOX2. His only sister was also homozygous for this mutation and exhibited similar alterations in bile acid profiles. Both parents were heterozygous and presented normal C24 and C27 bile acid levels. Immunofluorescence studies showed similar protein size and peroxisomal localization for both normal and mutated variants. THCA biotransformation into cholic acid was enhanced in cells overexpressing ACOX2, but not in those overexpressing mutACOX2. Both cell types showed similar sensitivity to oxidative stress caused by C24 bile acids. In contrast, THCA-induced oxidative stress and cell death were reduced by overexpressing ACOX2, but not mutACOX2.

Conclusion: ACOX2 deficiency, a condition characterized by accumulation of toxic C27 bile acid intermediates, is a novel cause of isolated persistent hypertransaminasemia.

Lay summary: Elevation of serum transaminases is a biochemical sign of liver damage due to multiplicity of causes (viruses, toxins, autoimmunity, metabolic disorders). In rare cases the origin of this alteration remains unknown. We have identified by the first time in a young patient and his only sister a familiar genetic defect of an enzyme called ACOX2, which participates in the transformation of cholesterol into bile acids as a cause of increased serum transaminases in the absence of any other symptomatology. This treatable condition should be considered in the diagnosis of those patients where the cause of elevated transaminases remains obscure.

© 2016 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Bile acids play essential digestive functions and are critical signaling molecules that modulate intermediate metabolism and liver tissue homeostasis. They are synthesized by hepatocytes from cholesterol [1,2] through two main pathways involving enzymes located at the endoplasmic reticulum, cytosol, mitochondria and peroxisomes. These enzymes are responsible for modifying the sterol nucleus of cholesterol and shortening its side-chain [3,4]. Inborn errors of bile acid synthesis are rare autosomal recessive diseases accounting for 1–2% of cholestatic disorders in children [5]. Although progressive cholestasis of infancy is the most common clinical presentation, neonatal hepatitis or the development of liver disease in later childhood can also occur [5]. However, certain cholestatic liver diseases in adults have also been associated with an inherited defect on bile acid synthesis [6].

Peroxisomes play a crucial role in bile acid synthesis [7]. In the classic biosynthetic pathway, the C27-bile acid intermediates 3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholestanic acid (DHCA) and 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholestanic acid (THCA), precursors of C24 mature bile acids chenodeoxycholic acid (CDCA) and cholic acid (CA), respectively, undergo β -oxidation of their side-chain in a process mediated by four peroxisomal enzymes: alpha methylacyl-CoA racemase (AMACR), ACOX2, D-bifunctional protein (DBP) and sterol carrier protein X (SCPx) (Fig. 1A). Finally,

Keywords: Bile acid metabolism; Cholestatic liver diseases; Drug-induced hepatotoxicity; Genetic disorder.

Received 1 August 2016; received in revised form 27 October 2016; accepted 2 November 2016; available online 21 November 2016

* Corresponding authors. Addresses: Department of Physiology and Pharmacology, Campus Miguel de Unamuno E.I.D. S-09, 37007-Salamanca, Spain (J.J.G. Marin), or Clinica Universidad de Navarra, Avenida Pio XII, 36, 31008-Pamplona, Spain (J. Prieto).

E-mail addresses: jprieto@unav.es (J. Prieto), jjgmarin@usal.es (J.J.G. Marin).



ELSEVIER

Research Article

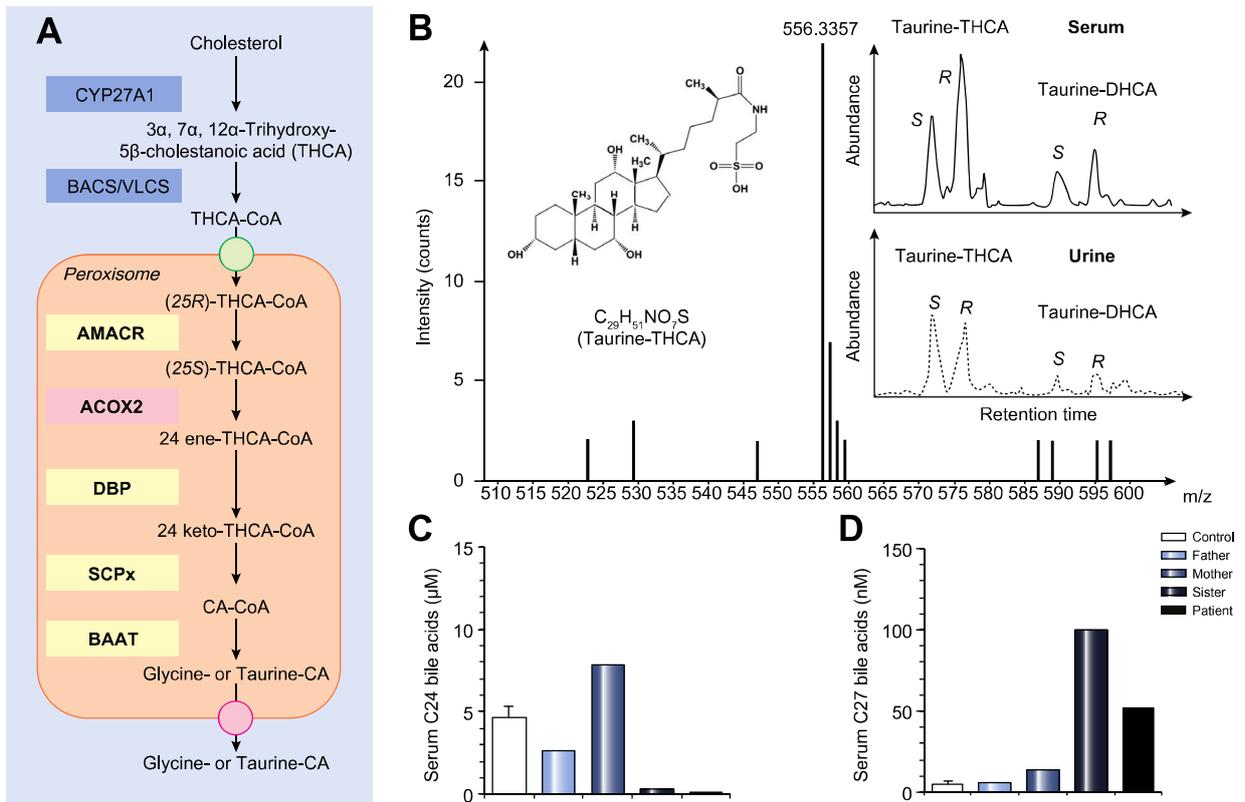


Fig. 1. Impaired bile acid synthesis due to ACOX2 deficiency. (A) Peroxisomal steps of bile acid synthesis. (B) HPLC-TOF mass spectrum of compound present in the patient serum. The exact mass 556.3357 matches that of taurine conjugated trihydroxy-5β-cholestanic acid (THCA). Inset: Representative chromatograms obtained by HPLC-MS/MS in MRM mode showing double peaks of m/z transition 556.3 to 80.2, corresponding to taurine-conjugated (25S)- and (25R)-THCA, and 540.3 to 80.2, corresponding to taurine-conjugated (25S)- and (25R)-dihydroxy-5β-cholestanic acid (DHCA) in serum and urine. Serum concentrations in healthy control volunteers (n = 5) and the affected family of C24 bile acids (in μM) (C) and C27 bile acids (in nM) (D). ACOX2, acyl-CoA oxidase 2; AMACR, alpha methylacyl-CoA racemase; BAAT, bile acid CoA, amino acid N-acyltransferase; BACS, bile acid CoA synthetase; DBP, D-bifunctional protein; CYP27A1, sterol 27-hydroxylase; SCPx, sterol carrier protein X; VLCS, very long chain acyl-CoA synthetase. (This figure appears in colour on the web.)

the newly formed bile acids are amidated with glycine or taurine by bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase (BAAT) also located in peroxisomes (Fig. 1A). Inborn errors affecting peroxisomal enzymes accounting for bile acid synthesis are usually characterized by serious hepatic and/or neurologic alterations [8,9]. In the present paper we identified ACOX2 deficiency as a novel cause of sustained elevation of serum transaminases without any other accompanying symptomatology.

Materials and methods

Reagents and cell lines

Cholic acid (CA), CDCA, deoxycholic acid (DCA), lithocholic acid (LCA), ursodeoxycholic acid (UDCA), as well as their tauroconjugate (TCA, TCDCA, TDCA, TLCA, TUDCA) and glycoconjugate (GCA, GCDCA, GDCA, GLCA, GUDCA) forms, and taurosulfolithocholic acid (TSLCA) were from Sigma-Aldrich (Madrid) and THCA, as a mixture of (25R)- and (25S)-isomers, was from Instruchemie (Groningen, The Netherlands). Cell lines HEK293T (human embryonic kidney) and HepG2 (human hepatoblastoma) were obtained from the American Type Culture Collection - ATCC- (Rockville, MD), tested to guarantee the absence of mycoplasma contamination (Mycoplasma Gel Form Kit, Biotools B&M Labs, Madrid, Spain) and cultured according to the supplier instructions.

Analytical methods

Serum and urine samples were collected after overnight fasting from the patient and his parents and sister and from five healthy male volunteers of similar age. An adaptation [10] of a previously described method [11] for bile acid measurement by HPLC-MS/MS was used in a 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). To investigate the presence of intermediate metabolites of bile acid synthesis both Scan and Precursor Ion modes were used. In Scan mode, 300–800 m/z ions were allowed to pass through MS1 and MS2 quadrupoles. In the Precursor Ion mode, MS1 was set to scan a mass range of 300–800 m/z while MS2 was fixed to scan ions 80.2 m/z, 74.0 m/z and 97.0 m/z for taurine-, glycine- and sulphate-conjugated BAs, respectively [12]. For confirmation of structure, exact mass determination was performed in a liquid chromatography-quadrupole time-of-flight (LC/TOF) apparatus (QSTAR XL, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Barcelona).

Genetic analysis

DNA was obtained from samples (two per individual) of oral epithelial cells collected with sterile buccal swabs (Omni Swabs, Whatman, Sigma-Aldrich) by using the DNeasy Blood & Tissue kit from Qiagen (Izasa, Madrid). The coding sequences of DBP, SCPx and ACOX2 were amplified by high-fidelity PCR by using AccuPrime Pfx DNA polymerase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). The amplified fragments containing both the exons and the exon-intron boundaries from at least two reactions (three if changes appeared) of PCR per exon were purified by agarose gel electrophoresis followed by extraction of DNA from the gel bands using

the illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Barcelona). Then, the amplicons were sequenced in both directions using forward and reverse primers (Supplementary Tables 1–3).

Stable expression of ACOX2 variants

The human ACOX2 open reading frame was amplified from total RNA isolated from healthy liver using RNeasy spin columns from GE Healthcare, followed by reverse transcription (SuperScript VILO cDNA Synthesis kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) and by high-fidelity PCR using specific primers (Forward: GCC ACC ATG GGC AGC CCA GTG CA; Reverse: TAG CTT GGA TCT CCA ACT TTG TAA AAG TGG T). The sequence of the wild-type ACOX2 cDNA was confirmed by sequencing and cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madrid), which was used to generate a pGEM-T vector containing the c.673C>T (R225W) ACOX2 variant by site-directed mutagenesis [13]. Both cDNA variants were cloned into the *PacI* site of the pWPI lentiviral vector, which had previously been modified by site-directed mutagenesis to include the C-terminal V5-tag. Recombinant lentiviruses were produced in host HEK293T cells as previously described [14]. The cells were transfected using a standard polyethylenimine (PEI) protocol with the transfer vectors pWPI-ACO2-V5, encoding both the desired ACOX2-V5 variant and EGFP or simply pWPI-V5 to generate Mock vectors, and the packaging plasmids psPAX2 and pMD2.G. Viral titer was determined by infection of HEK293T cells with serial dilutions of the viral suspension, and analysis of EGFP-positive cells was carried out with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Madrid). Lentiviral vectors were added to HepG2 target cells at a multiplicity of infection (MOI) of 10 infectious particles per cell in the presence of polybrene, and the infected cells were incubated for 4 days prior to analyses.

Determination of ACOX2 expression in cell lines

cDNA synthesized from total RNA was used as a template to determine ACOX2 expression by real-time quantitative PCR (qPCR) by using gene-specific primers spanning exon-exon junctions in the target mRNA (Forward: GAC AGA GTT GGG ACA TGG GAC ATA TCT T; Reverse: GCG TGG GGC TGT GTA TCA CAA A) and AmpliTaq Gold DNA polymerase in a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). The thermal cycling conditions were as follows: single cycles at 50 °C for 2 min and at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and at 60 °C for 60 s. Detection of amplification products was carried out using SYBR Green I. The mRNA abundance of ACOX2 in each sample was normalized on the basis of its GAPDH content.

Immunofluorescence and immunoblotting

Immunostaining of V5-tagged ACOX2 and mutACO2 was carried out in cells fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and permeabilized with 0.01% Triton X-100 for 10 min. Preparations were incubated for 1 h with mouse monoclonal primary antibody against V5 conjugated to DyLight 650 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) diluted 1:65. To co-localize ACOX2 or mutACO2 with a peroxisome marker, immunostaining was carried out, in cells fixed and permeabilized with ice-cold methanol, by using the V5 DyLight 650-conjugated antibody together with a primary antibody against PMP70 (1:250) (Abcam, Cambridge, UK) and Alexa Fluor-594 anti-mouse secondary antibody (1:1000) (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific). Nuclei were counter-stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Confocal laser scanning microscopy was performed using a Leica TCS SP2 confocal microscope. Immunoblotting analyses of boiled cell lysates were carried out with a primary monoclonal antibody against V5 (1:4000) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

Functional in vitro studies

ACO2 activity was assessed by studying the conversion of THCA into CA in HepG2 cells expressing wild-type ACO2 or its R225W variant (mutACO2). These cells were seeded in 3 cm diameter plates at ≈60% confluence and incubated with culture medium (MEM supplemented with sodium pyruvate and 10% fetal calf serum) containing 10 μM THCA for 48 h. Then, culture medium was collected and cells were lysed by incubation with water at 4 °C for 4 h, scrapped and sonicated. Both media and cell lysates were pooled together before bile acids were extracted with Sep-Pak Plus C18 cartridges (Waters, Barcelona). Biotransformation of THCA into CA was analysed by HPLC-MS/MS. Protein content was determined as previously described [15].

The production of reactive oxygen species (ROS) was analysed after exposure of cells to THCA for 72 h. CellROX[®] Orange Reagent (Molecular Probes) was added to cells cultured in 96-well plates at a concentration of 5 μM and incubated for

30 min at 37 °C. Then cells were trypsinized and fluorescence was measured by flow cytometry. Cell viability – determined by the MTT test by using thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich) – was studied after incubating HepG2 cells with increasing concentrations of THCA for 72 h. To compare the ability of THCA to induce oxidative stress with that of two major C24 bile acids with strong (DCA) and mild (CA) pro-oxidant activity, the cells were incubated in suspension with serum-free culture medium containing 2 μM 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (Sigma-Aldrich) at 37 °C for 15 min and then exposed to 250 μM bile acids for 30 min before measuring ROS production by flow cytometry. Previous experiments were carried out to set up the optimal 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate concentration and incubation time needed to obtain steady-state cell fluorescence (data not shown).

Statistical methods and tertiary structure prediction

Data are presented as means (SD). The Bonferroni method of multiple-range testing was used to calculate the statistical significance of differences among groups. The position in ACO2 protein tertiary structure of the active site, defined as this region of the protein that includes the residues interacting with FAD, the catalytic residues and their surrounding residues, was deduced from the crystal structure of rat acyl-CoA oxidase-II or ACO-II [16]. Sequences of human ACO2 (NP_003491) and rat ACO-II (2DDH_A) were aligned using protein blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and the conserved amino acids were depicted in the structure of ACO2 as predicted by the Phyre2 software [17].

Ethics

The research protocol conformed ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki, and it was reviewed and approved by the Human Ethical Committee of the Clinica Universidad de Navarra (Spain). Informed consent was obtained from the patient and family.

Results

Case report

We present the case of a 16 year old male who was first seen in 2009 because of unexplained hypertransaminasemia (2–5-fold upper normal limit, without any other symptoms) persisting for 2 years following a transient episode of acute ibuprofen/diclofenac-induced hepatitis. Hypertransaminasemia was moderate but showed occasional fluctuations with rises coinciding with the ingestion of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and D-penicillamine (Supplementary Table 4). Known causes of persisting hypertransaminasemia were excluded. Abdominal ultrasound demonstrated normal liver size and morphology and normal echogenicity. The gallbladder and the biliary tree were normal and cholelithiasis was excluded. A liver biopsy, performed in 2010, showed normal histology (Supplementary Fig. 1A) with only signs of mild intracellular cholestasis (Supplementary Fig. 1B). In 2012, serum transaminases reverted to normal coinciding with cholestyramine administration (Supplementary Table 4), which prompted analysis of bile acid profile.

Bile acid profile

Serum (Table 1) and urinary (Table 2) levels of C24 bile acid species were markedly lower in the patient than in five healthy controls. The most abundant C24 bile acid in the patient's serum was GCDCA followed by GCA and TCDCa. Other major bile acids, such as DCA, TCA, CA and CDCa were also present, whereas the remaining species were below detection limit (<1 nM) (Table 1). In the patient's urine TSLCA accounted for 70% of total bile acids, which also included GCA, TCA, CA, GCDCA, TCDCa and DCA (Table 2). The ratio of amidated to non-amidated bile acids was

Research Article

Table 1. Bile acid species in serum.

	Control (n = 5)	Patient	Sister	Father	Mother
Total C24 bile acids (μM)	4.68 (0.61)	0.06 (0.01)	0.28	2.57	7.84
Tauroconjugated (μM)	0.67 (0.08)	0.01 (0.01)	0.04	0.10	0.34
Glycoconjugated (μM)	2.37 (0.59)	0.04 (0.01)	0.11	0.90	3.53
Non-amidated (μM)	1.65 (0.33)	0.01 (0.01)	0.13	1.56	3.97
C24 Bile acid species (nM)					
Glycocholic	478 (111)	9 (3)	23	117	589
Glycochenodeoxycholic	1049 (278)	24 (1)	30	399	1867
Glycodeoxycholic	672 (199)	<1	42	215	877
Glycolithocholic	40 (19)	<1	<1	4	61
Glycoursodeoxycholic	127 (40)	<1	17	110	134
Taurocholic	136 (9)	3 (1)	3	13	49
Taurochenodeoxycholic	203 (53)	8 (4)	8	38	147
Taurodeoxycholic	129 (34)	<1	7	23	68
Tauroolithocholic	2 (1)	<1	<1	1	7
Taurooursodeoxycholic	23 (9)	<1	<1	3	2
Taurosulfolithocholic	96 (15)	<1	18	23	70
Cholic	242 (157)	2 (1)	19	586	1969
Chenodeoxycholic	604 (246)	1 (1)	9	161	709
Deoxycholic	529 (151)	6 (3)	76	691	1166
Lithocholic	145 (100)	<1	24	117	112
Ursodeoxycholic	42 (14)	<1	<1	9	16
Total C27 bile acids (nM)	3 (2)	52 (6)	100	6	14
Tauro-trihydroxycholestanic	3 (2)	32 (6)	56	6	14
Tauro-dihydroxycholestanic	<1	9 (1)	33	<1	<1
Trihydroxycholestanic	<1	11 (2)	11	<1	<1

Patient values are mean (SD) from measurements carried out by duplicate in two samples collected over a 6 month interval. Control samples were collected from healthy male subjects of comparable age. Result of serum concentrations of the sister, father and mother was calculated from two samples analysed in duplicate.

Table 2. Bile acid species in urine.

	Control (n = 5)	Patient
Total C24 bile acids (μM)	1.18 (0.13)	0.07 (0.02)
Tauroconjugated (μM)	0.28 (0.11)	0.06 (0.02)
Glycoconjugated (μM)	0.14 (0.02)	0.01 (0.01)
Non-amidated (μM)	0.76 (0.18)	0.01 (0.01)
C24 Bile acid species (nM)		
Glycocholic	71 (8)	6 (2)
Glycochenodeoxycholic	33 (8)	2 (1)
Glycodeoxycholic	23 (4)	<1
Glycolithocholic	<1	<1
Glycoursodeoxycholic	15 (5)	<1
Taurocholic	15 (4)	6 (5)
Taurochenodeoxycholic	6 (2)	1 (1)
Taurodeoxycholic	2 (1)	<1
Tauroolithocholic	<1	<1
Taurooursodeoxycholic	<1	<1
Taurosulfolithocholic	247 (115)	52 (15)
Cholic	572 (149)	3 (1)
Chenodeoxycholic	28 (9)	<1
Deoxycholic	105 (17)	1 (1)
Lithocholic	2 (1)	<1
Ursodeoxycholic	<1	<1
Total C27 bile acids (nM)	<1	6 (2)
Tauro-trihydroxycholestanic	<1	2 (1)
Tauro-dihydroxycholestanic	<1	1 (1)
Trihydroxycholestanic	<1	4 (1)

Patient values are means (SD) from measurements carried out by duplicate in two samples collected over a 6 month interval. Control samples were collected from healthy male subjects of comparable age.

higher in the patient than in controls (serum: 5.7 vs. 1.8; urine: 11.5 vs. 0.5).

HPLC-MS/MS analyses of patient's serum and urine combining Scan and Precursor Ion modes revealed that: i) in Scan mode a double peak of 556.3 m/z (8.9–9.3 min retention time) was detected in serum and urine of the patient but not in controls; ii) in Precursor Ion mode, both peaks produced ion 80.2 m/z corresponding to sulfonate functional group (SO₃), which suggested that the compounds accounting for these two peaks were (25R)- and (25S)-stereoisomers of the taurine conjugated of trihydroxycholestanic acid (tauro-THCA) (556.3 m/z). HPLC-TOF revealed a peak with exact mass of 556.3357, matching the mass (556.331349) of the [M-H]⁻¹ ion of tauro-THCA (Fig. 1B). Additional using multiple reaction monitoring (MRM) mode, searching for the predicted m/z transitions 556.3 to 80.2 for tauro-THCA, 540.3 to 80.2 for tauro-dihydroxycholestanic acid (tauro-DHCA), 449.6 to 449.6 for THCA and 433.6 to 433.6 for DHCA, showed double peaks in the patient's serum and urine seemingly corresponding to the stereoisomers of tauro-THCA (8.9–9.3 min retention time), tauro-DHCA (10.7–11.2 min retention time) and unconjugated THCA (13.5–13.7 min retention time).

Genetic studies

The observed low levels of C24 bile acids together with the accumulation of C27 bile acid intermediate THCA and to a much lesser extent of DHCA (Tables 1 and 2) led us to sequence the coding exonic and proximal intronic regions of *ACO2*, *DBP* and *SCP-X* for their potential involvement in the blockade of CA biosynthesis

at this level (Fig. 1A). Defects of other peroxisomal enzymes seemed unlikely as (25S)-isomers and amidated bile acids were detected, which excluded AMACR and BAAT deficiencies, respectively. The analysis of variants present in the three sequenced genes (Supplementary Table 5) revealed only a critical genetic alteration in ACOX2. This was a homozygous mutation (c.673C>T) in exon 6 (Fig. 2B), leading to arginine substitution by tryptophan at position 225 (R225W) (Fig. 2C). This SNP (rs150832314) has been reported by the NCBI SNP database to have a global minor allele frequency (MAF) of 0.04% with unknown phenotypic consequences.

Family studies

Both parents, born in two neighbouring valleys in northern Spain, were found to be heterozygous for R225W ACOX2, whereas the patient's only sister (3 years younger) was also homozygous with the same mutation (Fig. 2D). Serum bile acid profile was comparable in the parents and controls, while it was similar in both siblings. Thus, as observed in our patient, his sister exhibited markedly low concentrations of major C24 bile acids (Fig. 1C) and abnormally elevated levels of C27 bile acids (Fig. 1D). In the proband and his sister the proportion of THCA species with respect to total bile acids was 47.4 and 26.6% respectively, while

it was below 0.3% in both parents and controls. Interestingly, for the last 4 years of follow-up the sister showed normal serum transaminase levels, except for a ~2-fold rise above upper normal limit administration of NSAIDs during a flu-like episode (Supplementary Table 6). She also showed, similarly to her brother, a mild subclinical elevation of serum bilirubin (Supplementary Tables 4 and 6).

Functional evaluation of mutACOX2

Recombinant lentiviruses containing the wild-type cDNA of ACOX2 or its R225W variant (mutACOX2) were generated and employed to transduce human hepatoblastoma HepG2 cells, a cell line competent for bile acid synthesis [18,19]. The cells expressed similar amounts of wild-type and mutated ACOX2 mRNA (Fig. 3A) and protein (Fig. 3B) that were of similar molecular size as assessed by Western blot (Fig. 3B). Immunofluorescence studies showed that both forms of the enzyme equally localized at the peroxisome (Fig. 3C-E).

HPLC-MS/MS was used to evaluate bile acid biosynthesis by the transduced cells under basal conditions and upon incubation with THCA for 48 h. In the absence of any exogenous bile acid, control (Mock) HepG2 cells synthesized mainly CA, a process that was markedly increased (3-fold) in cells overexpressing ACOX2, while it was decreased in those transduced with mutACOX2 (Fig. 4A). These differences became more marked when THCA was added as a substrate. Under these conditions, CA synthesis

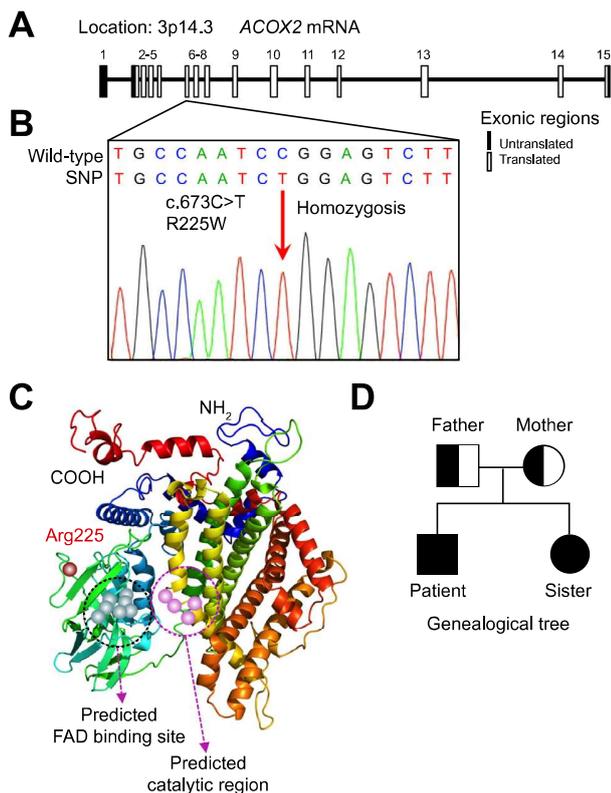


Fig. 2. Genetic bases of ACOX2 deficiency. (A) ACOX2 gene structure showing translated and untranslated exonic regions. (B) Electropherogram showing the homozygous missense mutation c.673C>T found. (C) Predicted tertiary structure of human ACOX2 showing the proximity of the replaced amino acid (R225W) as result of the mutation to the active site, i.e., the region of the protein that includes the residues interacting with FAD, the catalytic residues and their surrounding residues. (D) Genealogical tree of the affected family.

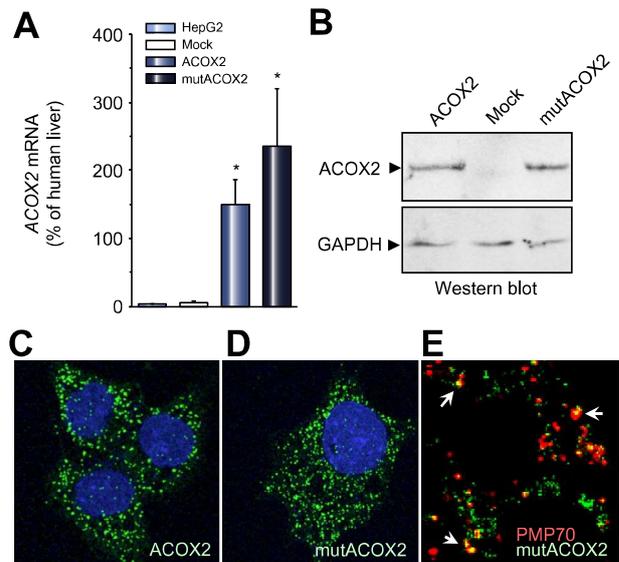


Fig. 3. Protein expression of mutated ACOX2 gene. (A) ACOX2 mRNA abundance in HepG2 cells before and after transduction with lentiviral vectors (MOI 10) either empty (Mock) or containing the open reading frame of wild-type ACOX2 or the mutated variant (mutACOX2). The amount of mRNA was determined by RT-QPCR and expressed as percentage of that found in human liver. Values are expressed as means (SD) from 4 independent experiments performed in triplicate. **p* < 0.05 compared with HepG2 cells by the Bonferroni method of multiple-range testing. (B) Representative Western blot of lysates from HepG2 cells transduced with lentiviruses containing V5-tagged ACOX2, mutACOX2 or only the V5 tag (Mock). Confocal fluorescence microscopy of HepG2 cells expressing V5-tagged ACOX2 (C) or mutACOX2 (D and E). Peroxisomes were labeled with an antibody against the 70 kDa peroxisomal membrane protein PMP70 (E).

Research Article

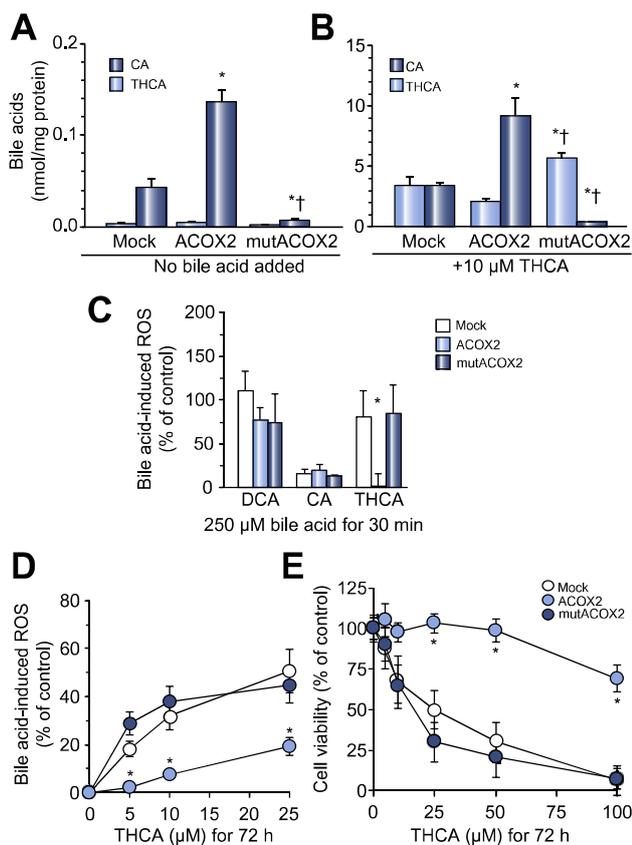


Fig. 4. In vitro evaluation of functional consequences of ACOX2 deficiency. Cholic acid (CA) synthesis by HepG2 cells incubated without (A) or with (B) 10 μM THCA for 48 h. Effect of THCA on reactive oxygen species (ROS) production (C, D) and cell viability (E). Control cultures were incubated in the absence of bile acids. Results are means (SD) from at least 9 determinations using three different cultures. * $p < 0.05$ compared with Mock; † $p < 0.05$ on comparing mutACOX2 with ACOX2 by the Bonferroni method of multiple-range testing. DCA, deoxycholic acid.

did not increase in mutACOX2 transduced cells while it was enhanced in Mock cells and even more in cells overexpressing ACOX2 (Fig. 4B).

Incubation of HepG2 cells with THCA for 72 h caused oxidative stress and cell death in a dose-dependent manner (Fig. 4C–E). These two effects were efficiently prevented by transduction of HepG2 cells with ACOX2 but not with mutACOX2. In contrast to THCA, the effect of C24 bile acids DCA or CA was similar in cells overexpressing either ACOX2 or mutACOX2 (Fig. 4C).

Discussion

Although most inborn errors of bile acid biosynthesis result in pediatric diseases [5], here we have identified a deficiency of ACOX2, a peroxisomal enzyme involved in the shortening of cholesterol side chain, in an adolescent boy with persistent mild elevation of serum transaminases. In this patient hypertransaminasemia evolved for 5 years following an episode of severe liver damage upon exposure to NSAIDs. The patient was found to be homozygous for a missense mutation in ACOX2 gene resulting in

R225W substitution. The same mutation was found in homozygosity in his only sister and in heterozygosity in both parents.

Whereas peroxisomal acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) is involved in oxidizing CoA esters of straight chain fatty acids and prostaglandins, ACOX2 oxidizes CoA esters of 2-methyl-branched fatty acids as well as those of the bile acid intermediates DHCA and THCA [20]. In addition, a gene encoding pristanoyl-CoA oxidase (ACOX3) has been identified in human genome [21]. Consistent with the role of ACOX2 in the shortening of the cholesterol side-chain, both the proband and his sister showed a marked decrease of mature C24 bile acids in association with an accumulation of C27 intermediates THCA and DHCA and their taurine conjugates. While C27 bile acids are abundant and play a major physiological role in reptiles and early evolving birds, they are efficiently removed by transformation into C24 bile acids in humans [22].

Human ACOX2 is a 76 kDa flavoprotein expressed in the liver but also in extrahepatic tissues, such as heart, kidney, skeletal muscle and pancreas [23]. Among the orthologs and paralogs in rat [24] of human ACOX2, only rat acyl-CoA oxidase-II or ACO-II crystal structure has been resolved and it has been shown that the enzyme works as a homodimer that contains one molecule of a noncovalently-bound FAD per subunit as the prosthetic group. The dimer formation is essential for FAD binding [16]. Based on the alignment of human ACOX2 and rat ACO-II amino acid sequences and the predicted three-dimensional structure of human ACOX2 (Fig. 2C) it could be hypothesized that the residue affected by the R225W substitution is located in a highly conserved β -domain in the proximity of the predicted FAD recognition site and the predicted catalytic region [16] (Fig. 2C). Indeed, although R225W does not modify ACOX2 molecular size and the subcellular targeting to the peroxisomes, it does interfere with its catalytic activity, resulting in impaired CA production from THCA in cells expressing the mutated ACOX2 and presumably accounting for the altered bile acid profile in homozygous individuals. We found that the endogenous ability of HepG2 cells to biotransform THCA into CA was reduced by overexpressing mutACOX2. These findings could be due either to the displacement of the endogenous enzyme by the overexpressed mutated one in the peroxisomes, or, it might reflect a dominant negative effect of mutACOX2. However, although the latter cannot be ruled out, the fact that bile acid profile was not altered in heterozygous individuals argues against mutACOX2 acting in a dominant negative way on normal ACOX2 *in vivo*.

The biotransformation rate of THCA by cell homogenates containing required supplements (ATP, $MgCl_2$, CoA, FAD^+ , NAD^+ , KCN and DTT) was too low to carry out accurate enzymatic activity analysis of ACOX2, mutACOX2 and the combination of both. Further investigations using specific substrates and purified protein variants are required to elucidate the effect of R225W mutation in ACOX2 dimerization and enzymatic activity.

The two siblings with ACOX2 deficiency reported in the present study share some characteristics with patients suffering from Zellweger syndrome, who lack functional peroxisomes, and patients with a defect of the peroxisomal enzymes AMACR, DBP or SCPx, in the fact that they have reduced levels of C24 mature bile acids together with increased levels of C27 bile acid intermediates DHCA and THCA [25]. These compounds and the metabolites originated from them are believed to be the main hepatotoxic compounds mediating liver injury in different peroxisomal disorders [7]. Supporting this notion, it has been shown

that conjugated and unconjugated C27-bile acids impaired mitochondrial respiratory function and boosted ROS production causing cell death in rat hepatoma cells [26]. Similarly, in the present study, we have observed that THCA induced in HepG2 cells a dose-related increase of ROS production with concomitant reduction of cell viability and that this effect could be efficiently prevented by overexpressing wild-type ACOX2 but not mutACOX2. Consistent with this observation we found that while wild-type ACOX2 accelerated CA production from THCA, the R225W variant failed to enhance CA generation in cells incubated with THCA. By contrast, neither ACOX2 nor mutACOX2 modified the cell toxicity mediated by C24 bile acids.

The case of ACOX2 deficiency described here differs phenotypically from other previously reported inborn errors affecting peroxisomal enzymes involved in bile acid biosynthesis. AMACR deficiency can have two very different phenotypic manifestations, either as early onset liver failure with cholestasis and fat-soluble vitamin deficiency [27] or as late onset neuropathy with encephalopathy, epilepsy, thalamic lesions, tremor, cataract, and/or pigmentary retinopathy, but no liver failure [8]. DBP deficiency results not only in impaired bile acid metabolism but also fatty acid β -oxidation and almost all patients display a severe phenotype dying early in life [28]. On the contrary, in the single patient with SCPx deficiency that has been described so far no apparent liver abnormalities were observed [29]. In our ACOX2 deficient patient the only clinical manifestation was a mild to moderate elevation in serum levels of transaminases, with no significant histological changes at the time of the study.

Likely the cause of hypertransaminasemia relates to the accumulation of C27 bile acids as resin cholestyramine reverted liver biochemistry to normal. Intriguingly in both the proband and his sister hypertransaminasemia peaked upon exposure to drugs, such as NSAIDs and D-penicillamine in the proband, and anti-flu medication in the case of the proband's sister. Whether ACOX2 deficiency may predispose to drug-induced liver injury or whether other xenobiotics may trigger THCA-induced hepatocellular damage is an issue deserving to be explored. It should be also noted that the proband's sister exhibited normal serum transaminases during most of the follow-up (4 years), a fact that might reflect sex-related sensitivity to toxic C27 bile acids or differences in the exposure to other hepatotoxicants.

It is somehow surprising that ACOX2 deficiency might coexist with normal transaminasemia (as in the case of the proband's sister), while THCA causes *in vitro* significant oxidative stress in ACOX2-deficient cultured cells. However, it should be considered that THCA was present at a constant concentration in the culture medium of cells expressing mutACOX2, whereas the intrahepatic levels of this compound in ACOX2 deficient subjects might be substantially lower if THCA is readily secreted into bile. It seems, thus, possible that, in these patients, hepatocellular damage might be triggered by exposure to compounds that compromise THCA biliary output. On the other hand, differences in the intensity of liver damage in patients with homozygous ACOX2 mutation might also reflect inter-individual variability of the compensatory anti-oxidant defense response. In addition, although our results demonstrated reduced ACOX2 function in individuals homozygous for R225W mutation, the existence of a residual activity cannot be ruled out.

Regarding treatment perspectives, it should be noted that despite the benefit afforded by resin cholestyramine, bile acid

replacement therapy, such as CDCA + UDCA combined administration, appears to be the best option for ACOX2 deficient patients as it would enrich the bile acid pool with C24 species while inhibiting endogenous bile acid synthesis hence reducing THCA generation.

After the presentation of our case at the International Liver Congress™ – EASL (April 2016; Barcelona, Spain) and its publication in abstract form [30], in the period between the provisional and definitive acceptance of this paper, a second case of ACOX2 deficiency has been reported [31]. The affected individual was a Turkish boy of 8 years of age with a homozygous nonsense mutation (Y69*) in ACOX2 causing early stop codon leading to complete absence of the protein. The patient presented a mixed phenotype with mild to moderate hypertransaminasemia accompanied by ataxia and cognitive impairment similar to those already described for other peroxisomal disorders [8,9]. By contrast, our cases of ACOX2 deficiency due to homozygous missense mutation (R225W) showed a pure "liver phenotype" indicating that ACOX2 deficiency should be sought in cases of unexplained persistent hypertransaminasemia even in the absence of neurological symptoms. Whether the discrepancy in the severity of symptoms between the patients here reported and the Turkish child was due to complete lack of ACOX2 protein in the latter vs. residual ACOX2 activity in the more benign phenotype is a matter to be settled once more cases of ACOX2 deficiency are identified.

In summary, our study has revealed ACOX2 deficiency as a novel cause of persistent elevation of serum transaminases in otherwise asymptomatic patients. This entity should be considered in the diagnostic workout of patients with hypertransaminasemia of unknown origin.

Financial support

This study was supported by the Institute of Health Carlos III, Spain (Grants FIS PI11/00337 and PI15/00179); Ministry of Science and Innovation, Spain (SAF2013-40620-R); "Junta de Castilla y León", Spain (SA015U13 and BIO/SA52/15); "Fundacion Mutua Madrileña", Spain (Call 2015); and "Fundacion Samuel Solórzano Barruso", Spain (FS/10-2014). Marta Alonso-Peña is recipient of predoctoral fellowship from the Ministry of Education, Culture and Sport, Spain (BOE-A-2015-9456).

Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

Authors' contributions

J.P. and J.J.G.M. initiated the study; J.P., J.J.G.M., M.J.M., O.B. and E. H. contributed to the study design; M.J.M. run HPLC-MS/MS analyses; O.B., E.H. and M.A. carried out sequencing and *in vitro* experiments; C.B. and J.A. supplied human samples; J.P. and J.J.G.M. coordinated the work; M.J.M., J.P. and J.J.G.M. with feedback from all other authors analysed and interpreted the data, and prepared the manuscript.

Research Article

Acknowledgments

The authors thank N. Skinner for revision of the English spelling, grammar and style of the manuscript and Virginia Villar for sample collection.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.11.005>.

References

- [1] Marin JJ, Macias RI, Briz O, Banales JM, Monte MJ. Bile acids in physiology, pathology and pharmacology. *Curr Drug Metab* 2015;17:4–29.
- [2] Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 2009;15:804–816.
- [3] Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 2003;72:137–174.
- [4] Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol* 2004;40:539–551.
- [5] Bove KE, Heubi JE, Balistreri WF, Setchell KD. Bile acid synthetic defects and liver disease: a comprehensive review. *Pediatr Dev Pathol* 2004;7:315–334.
- [6] Fischler B, Bodin K, Stjernman H, Olin M, Hansson M, Sjovall J, et al. Cholestatic liver disease in adults may be due to an inherited defect in bile acid biosynthesis. *J Intern Med* 2007;262:254–262.
- [7] Wanders RJ, Ferdinandusse S. Peroxisomes, peroxisomal diseases, and the hepatotoxicity induced by peroxisomal metabolites. *Curr Drug Metab* 2012;13:1401–1411.
- [8] Waterham HR, Ferdinandusse S, Wanders RJ. Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863:922–933.
- [9] Baes M, Van Veldhoven PP. Hepatic dysfunction in peroxisomal disorders. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863:956–970.
- [10] Nytofte NS, Serrano MA, Monte MJ, Gonzalez-Sanchez E, Tumer Z, Ladefoged K, et al. A homozygous nonsense mutation (c.214C>A) in the biliverdin reductase alpha gene (BLVRA) results in accumulation of biliverdin during episodes of cholestasis. *J Med Genet* 2011;48:219–225.
- [11] Ye L, Liu S, Wang M, Shao Y, Ding M. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;860:10–17.
- [12] Haas D, Gan-Schreier H, Langhans CD, Rohrer T, Engelmann G, Heverin M, et al. Differential diagnosis in patients with suspected bile acid synthesis defects. *World J Gastroenterol* 2012;18:1067–1076.
- [13] Laible M, Boonrod K. Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids. *J Vis Exp* 2009;27:e1135. <http://dx.doi.org/10.3791/1135>.
- [14] Lozano E, Monte MJ, Briz O, Hernandez-Hernandez A, Banales JM, Marin JJ, et al. Enhanced antitumour drug delivery to cholangiocarcinoma through the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT). *J Control Release* 2015;216:93–102.
- [15] Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978;87:206–210.
- [16] Nakajima Y, Miyahara I, Hirotsu K, Nishina Y, Shiga K, Setoyama C, et al. Three-dimensional structure of the flavoenzyme acyl-CoA oxidase-II from rat liver, the peroxisomal counterpart of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenase. *J Biochem* 2002;131:365–374.
- [17] Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 2015;10:845–858.
- [18] Everson GT, Polokoff MA. HepG2. A human hepatoblastoma cell line exhibiting defects in bile acid synthesis and conjugation. *J Biol Chem* 1986;261:2197–2201.
- [19] Cooper AD, Craig WY, Taniguchi T, Everson GT. Characteristics and regulation of bile salt synthesis and secretion by human hepatoma HepG2 cells. *Hepatology* 1994;20:1522–1531.
- [20] Vanhove GF, Van Veldhoven PP, Franssen M, Denis S, Eysen HJ, Wanders RJ, et al. The CoA esters of 2-methyl-branched chain fatty acids and of the bile acid intermediates di- and trihydroxycoprostanic acids are oxidized by one single peroxisomal branched chain acyl-CoA oxidase in human liver and kidney. *J Biol Chem* 1993;268:10335–10344.
- [21] Vanhooren JC, Marynen P, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP. Evidence for the existence of a pristanoyl-CoA oxidase gene in man. *Biochem J* 1997;325:593–599.
- [22] Hofmann AF, Hagey LR, Krasowski MD. Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. *J Lipid Res* 2010;51:226–246.
- [23] Baumgart E, Vanhooren JC, Franssen M, Marynen P, Puype M, Vandekerckhove J, et al. Molecular characterization of the human peroxisomal branched-chain acyl-CoA oxidase: cDNA cloning, chromosomal assignment, tissue distribution, and evidence for the absence of the protein in Zellweger syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:13748–13753.
- [24] Baumgart E, Vanhooren JC, Franssen M, Van Leuven F, Fahimi HD, Van Veldhoven PP, et al. Molecular cloning and further characterization of rat peroxisomal trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *Biochem J* 1996;320:115–121.
- [25] Ferdinandusse S, Houten SM. Peroxisomes and bile acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:1427–1440.
- [26] Ferdinandusse S, Denis S, Dacremont G, Wanders RJ. Toxicity of peroxisomal C27-bile acid intermediates. *Mol Genet Metab* 2009;96:121–128.
- [27] Setchell KD, Heubi JE, Bove KE, O'Connell NC, Brewsaugh T, Steinberg SJ, et al. Liver disease caused by failure to racemize trihydroxycholestanic acid: gene mutation and effect of bile acid therapy. *Gastroenterology* 2003;124:217–232.
- [28] Ferdinandusse S, Ylianttila MS, Gloerich J, Koski MK, Oostheim W, Waterham HR, et al. Mutational spectrum of D-bifunctional protein deficiency and structure-based genotype-phenotype analysis. *Am J Hum Genet* 2006;78:112–124.
- [29] Ferdinandusse S, Kostopoulos P, Denis S, Rusch H, Overmars H, Dillmann U, et al. Mutations in the gene encoding peroxisomal sterol carrier protein X (SCPx) cause leukoencephalopathy with dystonia and motor neuropathy. *Am J Hum Genet* 2006;78:1046–1052.
- [30] Monte MJ, Alonso M, Briz O, Herraez E, Macias RIR, Perez MJ, et al. Identification of a new inborn error in the peroxisomal steps of bile acid synthesis resulting in accumulation of toxic bile acid intermediates and hepatocellular damage. *J Hepatol* 2016;64:S301.
- [31] Vilarinho S, Sari S, Mazzacuva F, Bilguvar K, Esendagli-Yilmaz G, Jain D, et al. ACOX2 deficiency: A disorder of bile acid synthesis with transaminase elevation, liver fibrosis, ataxia, and cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:11289–11293.

CONCLUSIONS

First conclusion:

ACOX2 partial deficiency (APD) is a peroxisomal disease characterized by the accumulation of C27 bile acid intermediates and the reduction of primary C24 bile acids, causing a persistent elevation of serum transaminases associated with treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. In contrast, total ACOX2 deficiency results in more severe phenotype, in which patients do not survive childhood, despite the activation of compensatory mechanisms that allow the synthesis of primary C24 bile acids.

Second conclusion:

In the identified patients with APD, a single nucleotide mutation in ACOX2 gene leading to the amino acid substitution p.Arg225Trp generates an alteration in the structure and activity of the enzyme, without affecting the molecular size and subcellular location of the protein. Based on the position of the affected amino acid, we hypothesized that the mutation probably changes the interaction with the cofactor (FAD) and/or the dimerization of the protein.

Third conclusion:

The presence of additional genetic variants in ACOX2 described in the population by massive sequencing approaches, suggest the possibility of the existence of other undiagnosed pathologies similar to APD. Thus, the preliminary functional studies carried out in vitro indicate that mutations p.Arg614Cys, p.Glu406Gln, p.Arg264Gly, p.Ile238Thr, p.Arg574Cys and p.Gly284Cys have a functional impact on ACOX2 activity. Genetic analyses of individuals suffering from hypertransaminasemia of unknown cause may permit to determine the epidemiology and severity of APD subtypes.

Fourth conclusion:

The absence in APD patients of biotransformation activity on C27 bile acids and its accumulation causes in liver cells both oxidative stress and endoplasmic reticulum stress, overcoming the hepatotoxicity of other hydrophobic bile acids such as chenodeoxycholic and deoxycholic acids. Thus, trihydroxycholestanic acid (THCA) and the metabolites originated from it are the main hepatotoxic compounds acting as

mediators of liver injury in APD. Moreover, diclofenac is able to interact with hepatotoxicity mechanisms induced by THCA. Accordingly, *ACOX2* mutations may act as predisposing factors for idiosyncratic drug-induced liver injury (iDILI) and other hepatic diseases.

Fifth conclusion:

FXR, the main nuclear receptor involved in the physiological regulation of CYP7A1, the rate-limiting enzyme in bile acids synthesis, does not appear to influence the expression of *ACOX2*. In contrast, cytokines have an important effect on the expression and overall activity of this enzyme. Our results revealed a decrease in the expression of *ACOX2* in patients with inflammatory-related hepatopathies. To elucidate whether *ACOX2* plays a role in the pathophysiology of these diseases requires further investigations.

Sixth conclusion:

Using CRISPR/Cas9 technology, the *Acox2* gene was edited in mouse embryos to mimic the mutation found in our patient and hence develop an *in vivo* model of APD. These animals share some of the traits of the APD human phenotype, such as the accumulation of C27 bile acids in liver tissue and bile, which occurs in the absence of any symptoms of liver damage. In spite of almost total absence of *Acox2* protein in liver tissue, an abundant amount of primary C24 bile acids was presence in homozygous carriers of the mutation, as has also been reported in patients with total *ACOX2* deficiency. This model constitutes a useful tool to carry out future studies aimed at investigating the pathophysiology of APD, the role of *ACOX2* in iDILI, and the development of new therapeutic strategies.