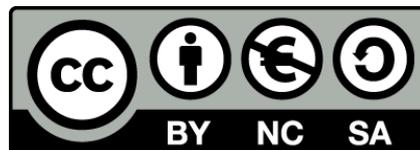




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudio de los microRNAs en la fisiopatología de la hepatitis alcohólica

Delia Blaya Diez de Revenga



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# ESTUDIO DE LOS MICRORNAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA HEPATITIS ALCOHÓLICA

Tesis presentada por:

**Delia Blaya Diez de Revenga**

Para obtener el título de doctora por la Universitat de Barcelona

Trabajo realizado bajo la supervisión de:

Pau Sancho Bru

Pere Ginès Gibert

Programa de doctorat Medicina

Universitat de Barcelona

2017



Health Universitat de  
Barcelona  
Campus

**B:KC** Barcelona  
Knowledge  
Campus



*Quiero serenidad para aceptar todo aquello que no puedo cambiar,  
fortaleza para cambiar lo que soy capaz de cambiar  
y sabiduría para entender la diferencia.*



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

<b>ABREVIACIONES</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
1. FISIOPATOLOGÍA DEL HÍGADO	7
1.1. DAÑO HEPATOCELULAR	10
1.2. FIBROSIS HEPÁTICA	12
1.3. REGENARACIÓN HEPÁTICA	13
1.4. INFLAMACIÓN HEPÁTICA	16
1.4.1. RESPUESTA INNATA	16
1.4.1.1. Células presentadoras de antígenos	17
1.4.1.2. Neutrófilos	19
1.4.1.3. Células asesinas	20
1.4.1.4. Linfocitos $T\gamma\delta$	21
1.4.2. RESPUESTA ADAPTATIVA	22
1.4.2.1. Linfocitos T	22
1.4.2.2. Linfocitos B	25
1.5. ENFERMEDADES HEPÁTICAS	26
1.5.1. HEPATITIS ALCOHÓLICA	26
1.5.2. HEPATITIS AUTOINMUNE	30
2. MICRORNAS	33
2.1. BIOGÉNESIS DE LOS miRNAs	34
2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS miRNAs	38
2.3. REGULACIÓN DE LOS miRNAs	40
2.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS miRNAs	41
2.4.1. Métodos basados en hibridación (Arrays)	41
2.4.2. Métodos basados en PCR cuantitativa	42
2.4.3. Secuenciación de RNA	42
2.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS mRNA DIANA	43
2.5.1. Aproximaciones computacionales	43
2.5.2. Aproximaciones experimentales	44
2.5.3. Análisis integrativo	46
2.6. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LOS miRNAs	46
2.7. ROL DE LOS miRNAs EN EL HÍGADO	48
2.8. miRNAs IMPLICADOS EN ENFERMEDADES HEPÁTICAS	50

2.8.1. miRNAs en las enfermedades hepática por alcohol	54
2.9. miRNAs CIRCULANTES EN ENFERMEDADES HEPÁTICAS	56
2.10. LOS miRNAs COMO DIANAS TERAPEÚTICAS	57
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	61
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	65
1. PACIENTES	67
1.1. Pacientes de los que se obtuvo biopsia hepática	67
1.2. Pacientes de los que se obtuvieron células mononucleadas periféricas	70
2. MODELOS ANIMALES	73
2.1. Inhibición <i>in vivo</i> del miR-182	73
2.2. Modelos de daño agudo	75
2.2.1. Daño por Concanavalina A	75
2.2.2. Trasplante de médula ósea	75
2.2.3. Intoxicación por paracetamol	77
2.3. Modelos de daño crónico	77
2.3.1. Daño por tetracloruro de carbono	77
2.3.2. Dieta DDC	78
2.3.3. Dieta Lieber-DeCarli modificada	78
2.4. Modelos de daño agudo sobre crónico	79
2.4.1. Modelo de CCl <sub>4</sub> más etanol	79
2.4.2. Modelo de CCl <sub>4</sub> más lipopolisacárido	80
3. AISLAMIENTO DE CÉLULAS NO PARENQUIMALES HEPÁTICAS	80
3.1. Aislamiento mediante gradiente de densidad	80
3.2. Aislamiento mediante perfusión retrógrada más gradiente de densidad	81
4. CITOMETRÍA DE FLUJO	83
4.1. Clasificación de células activadas por fluorescencia	84
5. DETERMINACIONES EN SANGRE	85
5.1. Determinaciones bioquímicas en suero	85
5.2. Determinación del quimerismo en sangre total	86
6. DETERMINACIONES EN HÍGADO	86
6.1. Determinación de ácidos biliares	86
6.2. Determinación de la actividad de las caspasas 3 y 7	86
7. INMUNOHISTOQUÍMICA	87

8. CULTIVOS CELULARES	87
8.1. Células primarias	88
8.1.1. Aislamiento de células de la reacción ductular de ratón	88
8.1.2. Aislamiento de hepatocitos de ratón	89
8.1.3. Aislamiento de linfocitos T CD4+ de bazo de ratón	90
8.2. Líneas celulares	91
8.2.1. Colangiocitos humanos	91
8.2.2. Macrófagos de ratón	91
9. ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	91
9.1. Transfección con un mimic de miR-182	91
9.2. Detección de citoquinas en sobrenadante	92
10. EXTRACCIÓN DE RNA	93
10.1. Extracción de miRNAs en suero	93
11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS miRNAs	93
11.1. Array de miRNAs	93
11.2. PCR cuantitativa a tiempo real	94
12. ANÁLISIS DE LA EXPRESION GÉNICA	94
12.1. Retrotranscripción	95
12.2. PCR cuantitativa a tiempo real	96
13. ANÁLISIS COMPUTACIONALES	97
13.1. Análisis de componentes principales	97
13.2. Integración de los perfiles miRNA-mRNA	97
13.3. Análisis funcional de los genes regulados por miRNAs	99
14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	100
<b>RESULTADOS</b>	101
PRIMER ESTUDIO: <i>La integración del perfil de microRNAs en la hepatitis alcohólica revela el papel del microRNA-182 en el daño hepático y la inflamación</i>	103
SEGUNDO ESTUDIO: <i>La expresión del microRNA-155 en las células mieloides modula la inflamación hepática en respuesta al daño</i>	125
<b>DISCUSIÓN</b>	146
<b>CONCLUSIONES</b>	158

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	162
<b>ANEXO</b>	187
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	199

<b>ABIC</b>	Age Billirubin INR Creatinin
<b>AGO</b>	Argonaute protein
<b>ALD</b>	Alcoholic Liver Disease
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>CCL</b>	C-C motif Ligand
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CH</b>	Cirrhosis
<b>CPH</b>	Células Progenitoras Hepáticas
<b>CXCL</b>	C-X-C motif Ligand
<b>Cy</b>	Cyanine
<b>CYP</b>	Cytochrome P450
<b>DAMP</b>	Danger-Associated Molecular Pattern
<b>EHA</b>	Enfermedad hepática por Alcohol
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FA</b>	Fosfatasa Alcalina
<b>FOXP3</b>	Forkhead box P3
<b>FXR</b>	Farnesoid X Receptor
<b>GFP</b>	Green Fluorescence Protein
<b>HA</b>	Hepatitis Alcohólica
<b>HAI</b>	Hepatitis Autoinmune
<b>HCV</b>	Hepatitis C Virus
<b>HBV</b>	Hepatitis B Virus
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>HSC</b>	Hepatic Stellate Cells
<b>ICAM-1</b>	Intercellular Adhesion Molecule 1
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>INR</b>	International Normalized Ratio
<b>LNA</b>	Locked Nucleic Acid

## ABREVIACIONES

<b>LDH</b>	Lactato Deshidrogenasa
<b>LKM-1</b>	Liver Kidney microsomal type 1
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LSEC</b>	Liver Sinuniod Endothelial Cell
<b>Mac-1</b>	Macrophage-1 antigen
<b>MELD</b>	Model for End-stage Liver Diseases
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>MO</b>	Médula Ósea
<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>NASH</b>	Non Alcoholic SteatoHepatitis
<b>ncRNA</b>	Non-coding RNA
<b>NFκB</b>	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>PAMP</b>	Pathogen-Associated Molecular Pattern
<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cells
<b>PD-L1</b>	Programmed death-ligand 1
<b>PPAR</b>	Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
<b>PPR</b>	Pattern recognition receptors
<b>PXR</b>	Pregnane X Receptor
<b>qPCR</b>	quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>RISC</b>	RNA-induced silencing complex
<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>RXR</b>	Receptor X Retinoide
<b>siRNA</b>	Short Interfering RNA
<b>SREBP</b>	Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription
<b>TCR</b>	T Cell Receptor
<b>TGF-β</b>	Transforming Growth Factor beta
<b>Th</b>	T helper cells

<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis-inducing ligand
<b>Treg</b>	Linfocitos T reguladores
<b>UTR</b>	Untranslated región
<b>VCAM-1</b>	Vascular cell adhesion protein 1
<b>YFP</b>	Yellow Fluorescent Protein



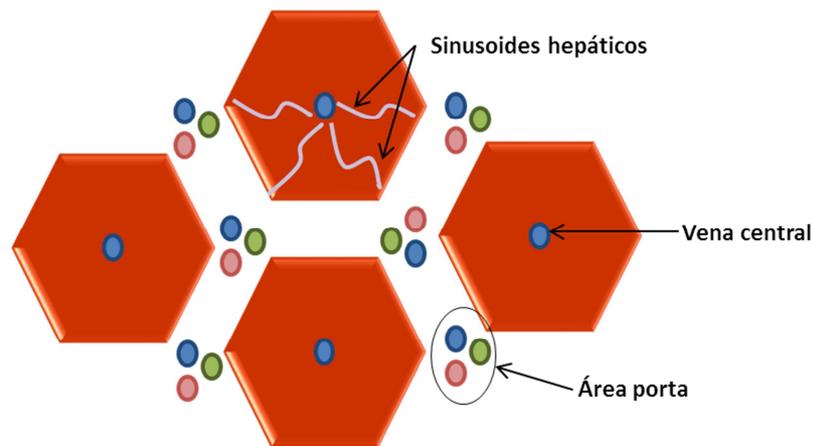
# INTRODUCCIÓN

---



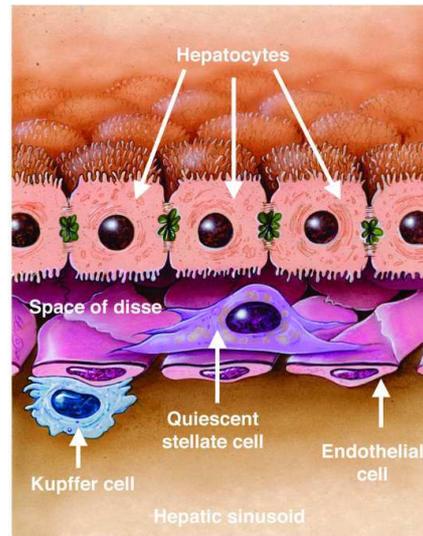
## 1. FISIOPATOLOGÍA DEL HÍGADO

El hígado es uno de los órganos sólidos más grandes del cuerpo humano. Funcionalmente está organizado en lobulillos hepáticos que son estructuras hexagonales con una vena central y delimitados periféricamente por espacios porta. El espacio porta está compuesto por canalículos biliares, ramas de la arteria hepática y ramas de la vena porta. La sangre fluye desde los espacios porta hasta la vena central a través de los sinusoides hepáticos, unos capilares que se sitúan entre los hepatocitos.



**Ilustración 1. Estructura lobulillar del hígado**

Los sinusoides hepáticos están compuestos por las células endoteliales del sinusoides hepático (conocidas como LSEC por las singlas en inglés de *Liver Sinusoidal Endothelial Cells*). Entre las LSEC y los hepatocitos existe un espacio, denominado espacio de Dissé, donde se disponen las células estrelladas hepáticas. Dentro del propio sinusoides encontramos las células de Kupffer, que son macrófagos residentes del hígado los cuales participan en la reparación tisular, la regeneración hepática y la defensa innata del hígado.



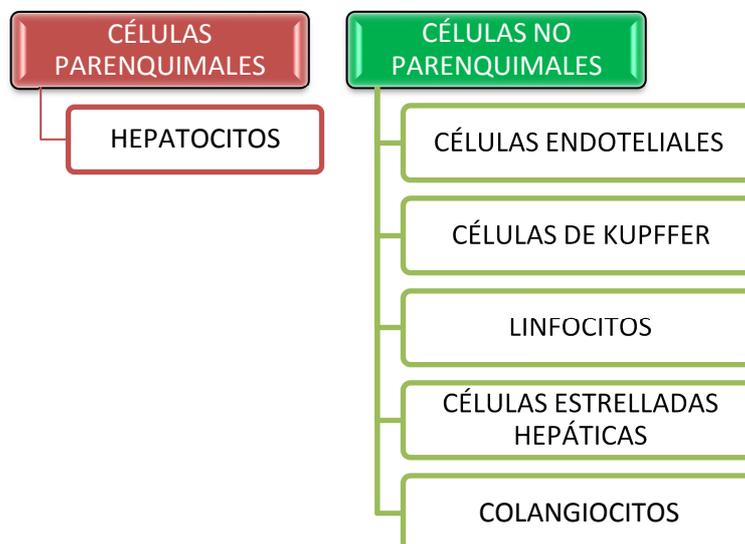
**Ilustración 2. Representación de un sinusoides hepático.** Imagen extraída de Friedman SL, *Journal of Clinical Investigation*, 2005.

El hígado es el único órgano del cuerpo humano que recibe a la vez sangre arterial y sangre venosa. Esto se debe a su posición clave dentro de la circulación sistémica, recibiendo sangre oxigenada de las arterias hepáticas derecha e izquierda y al mismo tiempo sangre venosa a través de la vena porta hepática. La sangre venosa viene desde el tracto intestinal y el bazo, lo que hace que llegue cargada de componentes de la dieta, patógenos exógenos y xenobióticos, incluyendo drogas y toxinas. Para asegurar la llegada de todos estos componentes hasta el parénquima hepático, donde serán procesados, el hígado posee una vasculatura única compuesta por los sinusoides hepáticos. Las células de los sinusoides, las LSEC poseen una membrana fenestrada, con poros [1]. La estructura fenestrada junto a la falta de lámina basal permite el paso de moléculas de gran tamaño y facilita la extravasación de células.

Funcionalmente el hígado realiza un gran número de procesos metabólicos como la síntesis y el catabolismo de proteínas, el metabolismo de los aminoácidos, carbohidratos, lípidos, ácidos biliares y vitaminas. Es también responsable de la detoxificación de toxinas y productos de deshecho además de la eliminación de patógenos exógenos. El hígado está compuesto por una gran variedad de células. Las células hepáticas están divididas principalmente en dos categorías: células parenquimales y no parenquimales. Las células parenquimales son los hepatocitos, que

constituyen entre el 70-80% de toda la masa hepática. Las células no parenquimales están compuestas por diversos tipos celulares: las células endoteliales que son cerca del 50% de todas las células no parenquimales, las células de Kupffer que son macrófagos residentes en el hígado, que representan aproximadamente el 20%, los linfocitos (~25%) divididos a su vez en varias subpoblaciones y las células estrelladas hepáticas (~5%).

Dentro de la estructura hepática tenemos el árbol biliar, una compleja red de conductos de diversos tamaños, responsables de llevar los ácidos biliares desde los hepatocitos hasta la vesícula biliar. Los conductos biliares están formados por unas células epiteliales especializadas denominadas colangiocitos. La principal función fisiológica de los colangiocitos es la modificación de la bilis proveniente de los hepatocitos. Dentro del árbol biliar tenemos los canales de Hering que son los conductos más pequeños, formados tanto por hepatocitos como por colangiocitos, representando la transición fisiológica entre el parénquima hepático y el árbol biliar.



**Ilustración 3. Tipos de células hepáticas**

## 1.1. DAÑO HEPATOCELULAR

El daño hepatocelular es un término que acoge todos los procesos por los cuales se compromete la función de las células del hígado (principalmente de su célula mayoritaria, el hepatocito) llegando incluso a la muerte celular por apoptosis o necrosis. Si el daño hepatocelular es exacerbado o se mantiene en el tiempo se alteran las funciones hepáticas pudiendo dar lugar a fallo hepático.

Uno de los mediadores del daño hepatocelular es la generación desregulada de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas del inglés *reactive oxygen species*) lo que da lugar a estrés oxidativo. Las ROS se producen en varias situaciones por ejemplo en hipoxia, por isquemia/reperfusión y también durante el metabolismo del etanol. En los hepatocitos, las ROS se forman principalmente mediante el metabolismo mitocondrial o la actividad del citocromo P450. El estrés oxidativo puede dar lugar a la activación de varias vías de muerte celular.

El daño hepatocelular puede dar lugar a la muerte celular por necrosis o apoptosis. La necrosis se caracteriza por un hinchamiento de la célula al no poder mantener la homeostasis iónica terminando con una rotura de la membrana celular y del núcleo. En cambio, la apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que se caracteriza por una contracción del citoplasma, la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo. En el daño hepático pueden presentarse ambas formas o la combinación de ambas.

Principalmente existen dos vías responsables de poner en funcionamiento el proceso apoptótico: la vía extrínseca o vía de los receptores de muerte y la vía intrínseca o vía mitocondrial. Ambas vías confluyen en la activación de proteasas intracelulares como las caspasas o endonucleasas.

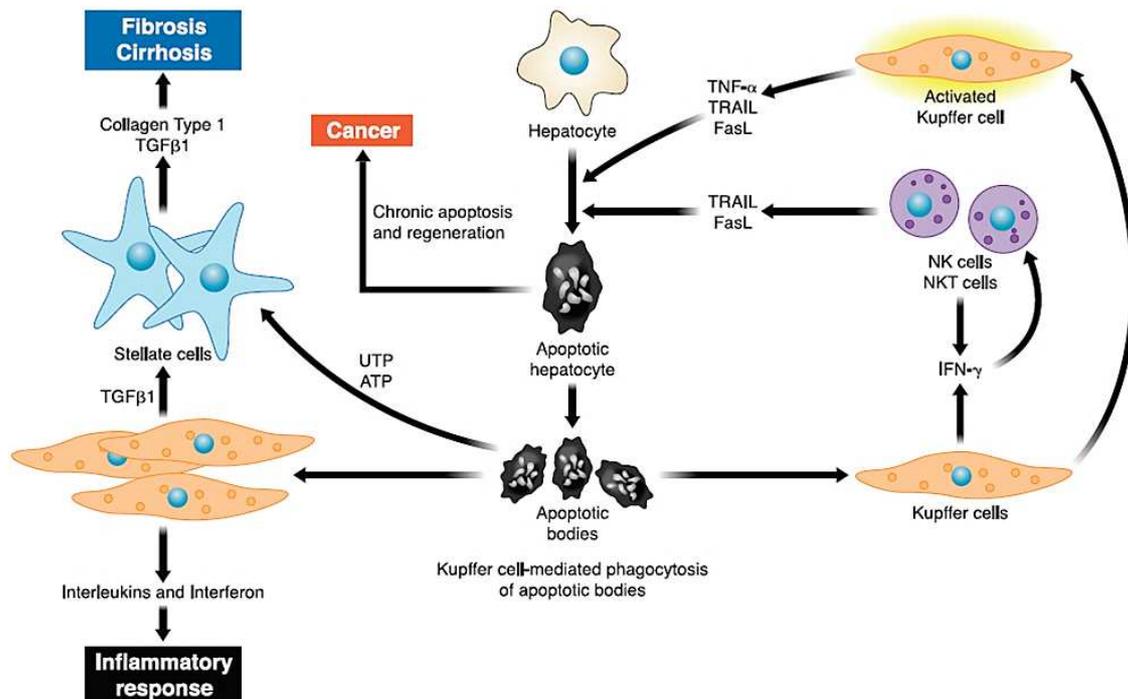
La vía extrínseca comienza en la membrana celular cuando alguno de los ligandos como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , abreviatura del inglés *tumor necrosis factor*), el ligando de Fas (FasL) o el ligando inductor de la apoptosis relacionada con TNF (TRAIL, abreviatura del inglés *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) se unen a sus respectivos receptores TNF-R1, Fas (o CD95) y TRAIL-R1 o TRAIL-R2 conocidos como receptores de muerte [2]. Al activarse, estos receptores oligomerizan (se unen varias

subunidades) y reclutan proteínas adaptadoras capaces a su vez de activar la vía de las caspasas.

Por otra parte, la vía intrínseca está mediada por las mitocondrias. Las cuales están íntimamente ligadas a la muerte celular ya que aíslan una gran cantidad de proteínas proapoptóticas en el espacio intermembrana. La permeabilización de la membrana mitocondrial exterior provoca la liberación de mediadores de apoptosis (como citocromo c, endonucleasa G, factor inductor de apoptosis, etc.) que a su vez activan las caspasas [3].

Las caspasas son proteínas claves en la apoptosis. Son proteasas que a su vez necesitan escindir-se para ser funcionales, dando lugar una cascada de activación. Las caspasas pueden dividirse en dos grupos: las caspasas iniciadoras y las efectoras. Las caspasas iniciadoras pueden activarse por los receptores de muerte celular, como las caspasas 8 y 10, o por disfunción mitocondrial, como la 9. Estas caspasas activadoras rompen a las caspasas efectoras, como la 3, 6 y 7 que a su vez procesarán otros sustratos dando lugar a la apoptosis [4].

Un aumento de la apoptosis de los hepatocitos suele ir ligado a inflamación y a fibrosis ya que los cuerpos apoptóticos activan tanto a las células de la respuesta innata como a las células estrelladas hepáticas [5], como se muestra en la ilustración 4.



**Ilustración 4. Mecanismos de daño hepático, fibrosis e inflamación.** Imagen extraída de Malhi *et al*, *Physiol Rev*, 2010.

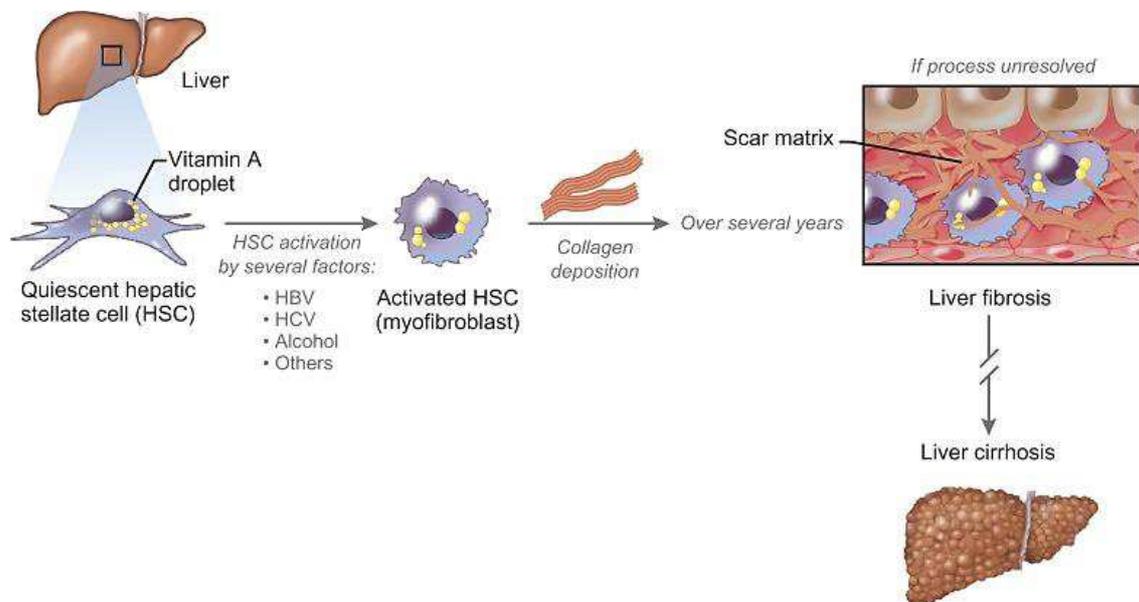
## 1.2. FIBROSIS HEPÁTICA

La fibrosis hepática es el resultado de una desregularización de los procesos de reparación del daño tisular, y conlleva la deposición y acumulación de matriz extracelular, compuesta principalmente por colágeno fibrilar [6]. Ante un daño la deposición de matriz extracelular participa en la restauración del parénquima. Si el daño se prolonga provoca una acumulación excesiva de matriz y una inflamación crónica que dan lugar a la sustitución del parénquima por tejido fibroso, pudiendo desembocar en cirrosis. Las cirrosis es la etapa final del proceso fibrótico, está caracterizada por la desestructuración del parénquima hepático, y se asocia a hipertensión portal y eventualmente al fallo hepático [7].

Las principales células responsables de la fibrogénesis son las células estrelladas hepáticas. Las células estrelladas son los pericitos del hígado y se encuentran en los espacios de Dissé entre los hepatocitos y las células endoteliales. En un hígado sano, las células estrelladas se encuentran en un fenotipo quiescente, caracterizándose por la acumulación de vitamina A en gotas lipídicas y por regular la matriz extracelular en

el espacio de Dissé mediante la expresión de componentes no fibrilares así como por la modulación de los inhibidores de metaloproteinasas.

Cuando hay un daño hepático, las células estrelladas adquieren un fenotipo activado, en el que pierden parte del contenido lipídico, y adquieren características de los miofibroblastos, obteniendo capacidades contráctiles, proliferativas y de migración. Además, las células estrelladas activadas producen y excretan proteínas fibrilares de la matriz extracelular, como colágeno, creando tejido fibroso; a su vez inhiben las metaloproteinasas de la matriz extracelular [8]. Las células estrelladas son también capaces de secretar factores proinflamatorios y profibrogénicos.



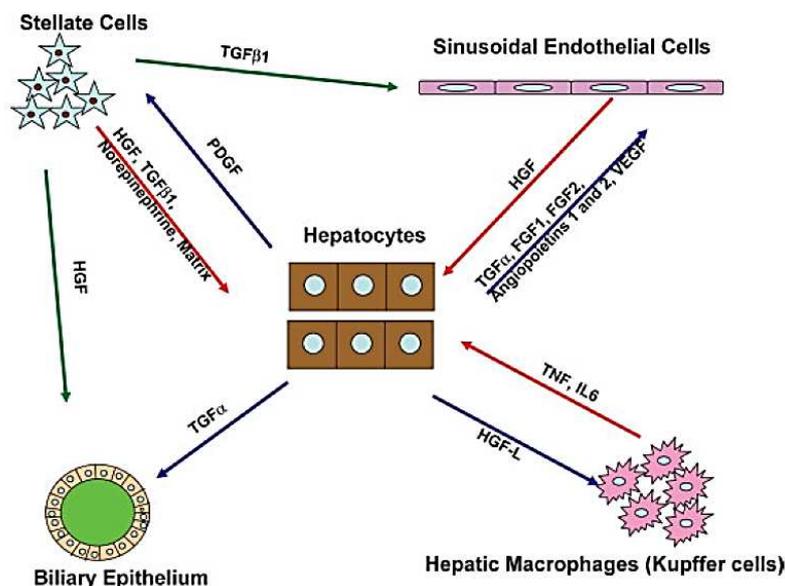
**Ilustración 5. Representación de la fibrogénesis hepática.** Imagen extraída de Ismail y Pinzani, *Hepat Med*, 2011.

### 1.3. REGENERACIÓN HEPÁTICA

El hígado tiene una capacidad única de regenerarse frente al daño hepático. Tanto por una pérdida masiva de masa hepática por hepatectomía, como por daños agudos o daños crónicos, el hígado es capaz de restituir la masa hepatocitaria para restablecer su función.

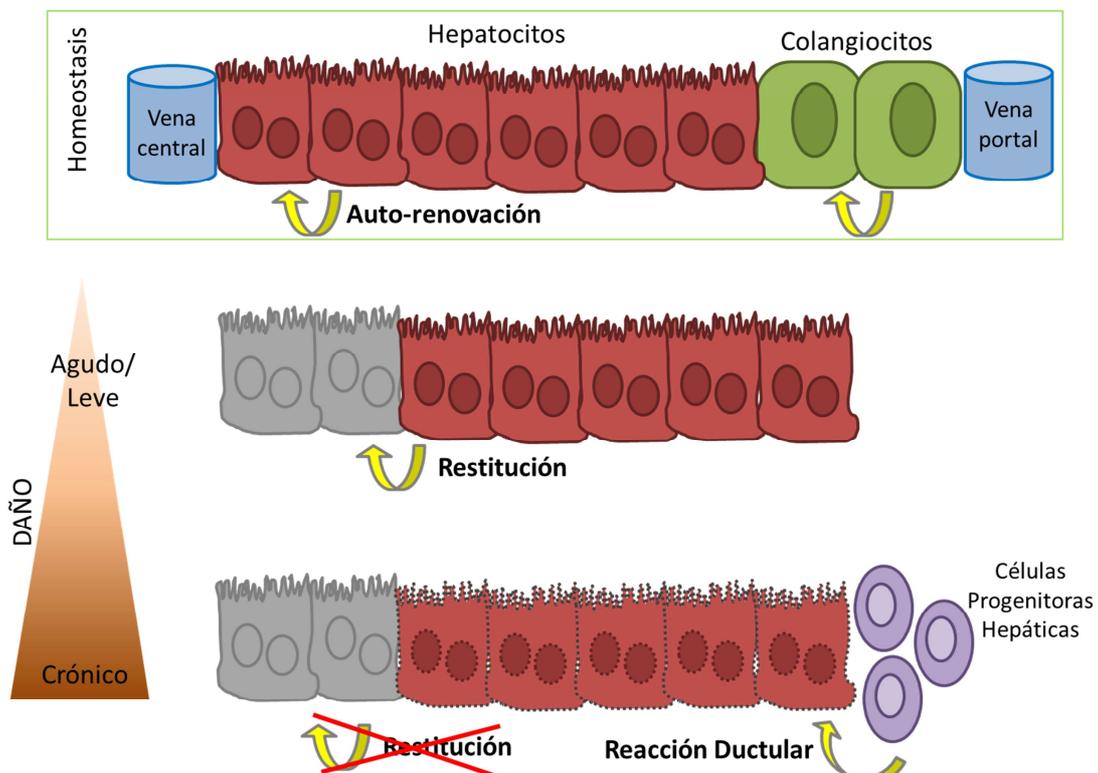
En el caso de una hepatectomía donde la replicación de los hepatocitos no está afectada, estos son capaces de regenerar toda la masa perdida. Los hepatocitos son los primeros en entrar en mitosis, el 60% de los hepatocitos divide su DNA en las primeras 24 horas. Tras lo cual, un pequeño porcentaje vuelve a entrar en síntesis de DNA, finalizando con la apoptosis de algunos hepatocitos, como mecanismo compensatorio de un posible exceso de proliferación [9]. Este proceso se inicia gracias a la activación de más de 100 genes, inmediatamente después de la hepatectomía. Una de las citoquinas responsables es la IL-6 la cual activa más del 40% de los genes [10].

La activación de los hepatocitos se da gracias a la interacción con varios tipos celulares. Por un lado, las células endoteliales y las células estrelladas secretan el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, abreviatura del inglés *Hepatocyte Growth Factor*) que es un potente mitógeno. A su vez los hepatocitos secretan factores de crecimiento para la proliferación de células estrelladas y células endoteliales [10]. Por otro lado la respuesta inmune innata, principalmente las células de Kupffer, secretan TNF $\alpha$  e IL-6, que son capaces de activar el factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B, abreviación del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3, abreviación de *Signal transducer and activator of transcription 3*) en los hepatocitos, induciendo vías de proliferación.



**Ilustración 6. Red de señalización intercelular durante la regeneración hepática.** Imagen extraída de Michalopoulos, *J. Cell. Physiol.*, 2007.

En situaciones de daño severo o en el contexto de enfermedades crónicas del hígado se produce una pérdida de la capacidad regenerativa de los hepatocitos. En este contexto se produce una proliferación de células con una expresión mixta de genes hepáticos y biliares, denominadas células ovals en roedores o células de la reacción ductular en humanos. Estas células también se engloban bajo el nombre de células progenitoras hepáticas (CPH), por su plasticidad celular que les permite diferenciarse a hepatocitos o a colangiocitos [11]. En las enfermedades hepáticas crónicas avanzadas, la reacción ductular se asocia a un peor pronóstico de los pacientes [12]. Sin embargo, el papel y la contribución de las CPH a la restauración del parénquima es un tema muy controvertido y difícil de elucidar. A lo largo de varios años se han presentado estudios de linaje celular en diferentes modelos animales intentando determinar la contribución de estas células; en conjunto se podría concluir que su contribución es limitada y depende de la extensión y el tipo de daño hepático [13,14].



**Ilustración 7. Regeneración a lo largo de diferentes situaciones hepáticas.** En homeostasis el hígado tiene una baja tasa de renovación de hepatocitos, en cambio en situaciones de daño los hepatocitos existentes proliferan rápidamente para restituir el parénquima. Sin embargo, cuando el daño se cronifica, la capacidad proliferativa de los hepatocitos se compromete y aparecen mecanismos compensatorios como la reacción ductular.

## **1.4. INFLAMACIÓN HEPÁTICA**

El hígado lleva a cabo importantes tareas en la homeostasis inflamatoria del cuerpo ayudando a crear un ambiente tolerogénico (de tolerancia inmunológica) frente a factores externos no patógenos. No obstante, su implicación en la respuesta y la defensa frente a agentes tóxicos y patógenos es crucial. La posición del hígado dentro del torrente sanguíneo, sumado a las características únicas de su endotelio, hacen que el hígado esté constantemente en contacto con sangre rica en patógenos u otras señales inflamatorias. Por ello es responsable de mantener un equilibrio entre la tolerancia a moléculas no dañinas y la respuesta a patógenos.

Para desempeñar este papel el hígado tiene un gran número de células inmunes, propias y/o reclutadas, que contribuyen a la homeostasis en situaciones normales, pero también a la progresión del daño o la resolución en situaciones patológicas. La composición y localización de dichas poblaciones dentro del hígado varía entre especies y también a lo largo del tiempo, pero sobretodo sufre cambios drásticos en situaciones de daño hepático [15].

Clásicamente la respuesta inmune se divide en 2 grandes bloques: la inmunidad innata que es aquella de respuesta más rápida e inespecífica y la inmunidad adaptativa que es específica, persiste a largo plazo y es capaz de “recordar” los patógenos.

### **1.4.1. RESPUESTA INNATA**

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra todos los ataques de patógenos, tóxicos o incluso de células malignas propias. Esta defensa se lleva a cabo a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, de las siglas en inglés *Pattern Recognition Receptors*) que captan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, de las siglas en inglés *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, de las siglas en inglés *Danger-Associated Molecular Pattern*). En el caso del hígado, los receptores PRRs están ampliamente expresados en varios tipos celulares: hepatocitos, colangiocitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y células estrelladas [16].

#### 1.4.1.1. Células presentadoras de antígenos

Dentro de la respuesta innata las primeras células a las que se enfrentan las moléculas patógenas son las células presentadoras de antígenos. Este tipo celular es capaz de captar patógenos, procesarlos y seguidamente presentarlos a través de los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC, abreviatura de *Major Histocompatibility Complex*). Los linfocitos T reconocen los complejos a través de los receptores de células T (TCR, por su abreviatura del inglés *T Cell Receptor*) activando una respuesta inmune contra el patógeno presentado. En el caso del hígado hablamos de varios tipos celulares diferentes: las células presentadoras de antígenos profesionales como las células Kupffer, las células dendríticas o los neutrófilos; y por otro lado las no profesionales como las células endoteliales del sinusoides hepático y las células estrelladas hepáticas.

Dentro de las células presentadoras de antígenos profesionales tenemos los macrófagos residentes del hígado o células de Kupffer. Representan entre el 80-90% de los macrófagos residentes en tejidos del cuerpo humano. Dentro del hígado se sitúan en el espacio sinusoidal, principalmente en zonas periportales y desde aquí son capaces de captar y fagocitar patógenos o fragmentos celulares. En condiciones normales las células de Kupffer participan en la formación de un ambiente tolerogénico mediante la secreción de IL-10 y de PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*, que significa ligando de muerte programada-1) que inhiben la respuesta de los linfocitos T y estimulan los Treg [17]. Además de formar parte de esta primera defensa innata del hígado, las células de Kupffer están involucradas en la reparación tisular, la regeneración hepática [18], en la vigilancia antitumoral [19] y en la regulación de la respuesta inmune liberando citoquinas y mediadores pro-inflamatorios que llevan a la apoptosis y necrosis de los hepatocitos. Esta función inmunomoduladora, ha sido ampliamente descrita como parte de la fisiopatología de varias enfermedades hepáticas como la esteatohepatitis no alcohólica y la enfermedad alcohólica [20,21].

En la enfermedad hepática por alcohol existe un incremento de translocación bacteriana desde el intestino, produciéndose un aumento de lipopolisacárido (LPS) en

sangre. El LPS activa a las células de Kupffer a través de receptor TLR4, promoviendo la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, y varias citoquinas[22].

Una de las características más interesantes de las células de Kupffer es su plasticidad fenotípica, la cual permite que estas células puedan ser tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. El fenotipo M1 (o fenotipo clásico) es aquel de características proinflamatorias, el cual contribuye a la esteatosis, la fibrogénesis y el reclutamiento de otras poblaciones inflamatorias [23]. En el otro extremo tenemos el fenotipo M2 (o fenotipo alternativo) el cual se ha descrito como antiinflamatorio y resolutorio de la inflamación y el daño tisular [24].

Otro tipo celular especializado en la presentación de antígenos son las células dendríticas. Siendo las células presentadoras de antígenos más potentes del sistema inmune. Son una población muy compleja con gran variedad de subpoblaciones. En el hígado sano se pueden encontrar dendríticas mieloides y dendríticas plasmocitoides.

Las células dendríticas participan en la formación de un ambiente tolerogénico en el hígado [25]. Las células de Kupffer permiten la formación de un ambiente único mediante la liberación constitutiva de IL-10 y de factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$  por sus siglas en inglés *Transforming Growth Factor- $\beta$* ), donde las células dendríticas residentes pueden mantenerse tolerogénicas. Por ello, se consideran fenotípicamente inmaduras, siendo aun así capaces de estimular la respuesta de los linfocitos T [26,27]. En el caso de las enfermedades hepáticas por alcohol se ha observado un empeoramiento de la función de las células dendríticas [28], sin embargo el efecto directo de las células dendríticas sobre la patofisiología del daño hepático por alcohol es desconocido.

En el hígado también existen otros tipos celulares que no están especializados en la captación de antígenos pero que sin embargo ayudan en esta función. Estas células podrían englobarse bajo el nombre de células presentadoras de antígenos no profesionales. Pertenecen a esta clase las células endoteliales del sinusoides hepático (LSEC) y las células estrelladas hepáticas.

Las *LSEC* son capaces de expresar moléculas captadoras de antígenos y moléculas que promueven la presentación de antígenos, aunque su eficiencia como células presentadoras de antígenos ha sido ampliamente discutida [29]. Sin embargo, estudios con células endoteliales de hígados fibróticos demuestran la inducción de células T a producir citoquinas proinflamatorias [30].

Por otro lado tenemos las células estrelladas hepáticas. Estas células que se localizan en el sinusoides hepático se han propuesto recientemente como células hepáticas presentadoras de antígenos, observándose la expresión de receptores MHC-II y CD11c en un modelo de fibrogénesis [31], así como la expresión de citoquinas reclutadoras de linfocitos T: CXCL9 y CXCL10 [32]. No obstante, las evidencias de esta nueva función en las células estrelladas son todavía escasas.

#### **1.4.1.2. Neutrófilos**

Son un componente clave de la inmunidad innata en el hígado. Tienen un rol clave en la defensa contra patógenos y a su vez pueden ser causantes de daño hepático si se sobreactivan, son por tanto un arma de doble filo.

La infiltración de neutrófilos dentro del parénquima hepático se ha observado en todos los tipos de daño hepático. El reclutamiento se produce debido a la liberación de un gran número de citoquinas o mediadores de la inflamación (como TNF- $\alpha$ , interleuquinas, quemoquinas de la familia CXCL, debris celulares, producto de células dañadas, etc. [33]). Esto provoca la acumulación de los neutrófilos en los sinusoides y en los espacios perisinusoidales, seguido de un rodamiento y unión a las células endoteliales. La unión neutrófilo-endotelio se produce entre las integrinas  $\beta 2$  y las selectinas del neutrófilo, a las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 del endotelio [34]. Esta interacción permite la extravasación del neutrófilo, pero además induce su completa activación [35]. Una vez en el parénquima, se ha propuesto que el receptor Mac-1 de los neutrófilos interaccionaría con ICAM-1 en los hepatocitos [36] dejándolos expuestos al contenido de los gránulos del neutrófilo y al estrés oxidativo por la producción de ROS. Esta degranulación y producción de ROS ayuda a combatir los patógenos pero también provoca daño celular y necrosis [37]. Otro mecanismo

propuesto es la activación del sistema de muerte celular Fas/FasL, el cual parece tener un peso importante en la inflamación hepática [38].

Los neutrófilos juegan un papel clave en la progresión del daño. En las enfermedades hepáticas crónicas como la hepatitis alcohólica el reclutamiento de neutrófilos es una de las características más importantes. El desencadenante por el cual el alcohol aumenta el reclutamiento podría deberse al aumento de la translocación del LPS desde el intestino hasta el hígado, lo cual activa a las células de Kupffer que reclutan los neutrófilos hasta el hígado [39]. La relación entre los neutrófilos y daño hepático por alcohol es todavía desconocido, habiendo únicamente algunas evidencias, por ejemplo la correlación entre la necrosis hepatocitaria y la infiltración de neutrófilos [40].

#### **1.4.1.3. Células asesinas (NK y NKT)**

Las células asesinas (NK, del inglés *Natural Killer*) son unas células linfoides que se encargan de eliminar células infectadas por virus y células tumorales. Son células de acción rápida, que actúan independientemente del reconocimiento de antígenos y en general no dan lugar a memoria inmunológica.

Por otro lado tenemos las células NKT que son un grupo heterogéneo de linfocitos T los cuales comparten receptores y características de las células NK. Las células NKT, en contraste con las células T clásicas, expresan un repertorio muy limitado de receptores TCR (casi exclusivamente de  $V\alpha 14/J\alpha 281$ ) que se unen a lípidos y glicolípidos, además son capaces de reconocer el receptor MHC atípico denominado CD1d [41].

Ambos tipos celulares se sitúan en los sinusoides hepáticos, normalmente en contacto con las células de Kupffer, formando parte de esa primera barrera inmunológica encargada de eliminar patógenos, tóxicos y células tumorales.

En situaciones de daño hepático las NK se encargan de matar hepatocitos que expresan ligandos activadores; tras activarse, las NK liberan TRAIL y/o granzima B provocando la apoptosis hepatocitaria. En cambio las NKT producen daño mayoritariamente por la producción de citoquinas como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-4, IL-5 o TNF $\alpha$ . Aunque también son capaces de matar hepatocitos liberando FasL [42]

En el caso del daño hepático por alcohol, se ha descrito en varios estudios que las células NK tienen deprimida su función [43]. Hay varios mecanismos implicados en esta inhibición, primero se produce una disminución de TRAIL e IFN- $\gamma$  en las NK hepáticas [44]; segundo, el alcohol bloquea la salida de las células NK desde la médula ósea y tercero, el alcohol aumenta los niveles de corticosterona que inhibe las NK. Por otro lado esta inhibición provoca una mayor fibrosis al reducirse la producción de IFN- $\gamma$  de las NK y por tanto se reduce la parada y apoptosis de las células estrelladas hepáticas. Además la inhibición de las NK provoca una aceleración de la hepatitis viral en pacientes alcohólicos.

#### **1.4.1.4. Linfocitos T no convencionales: T $\gamma\delta$**

Los linfocitos T  $\gamma\delta$  (T $^{\gamma\delta}$ ) son unos linfocitos que expresan receptores TCR del tipo  $\gamma\delta$ , en vez de los clásicos  $\alpha\beta$ . Son una subpoblación no convencional que posee características de la respuesta innata y de la respuesta adaptativa. En el hígado son una población que representa 15-25% de los linfocitos T hepáticos, sugiriendo una función importante en la homeostasis hepática. Sin embargo, su función en el daño hepático parece estar muy condicionada al tipo de daño, pudiendo tener tanto efectos deletéreos como protectores [45].

### **1.4.2. RESPUESTA ADAPTATIVA**

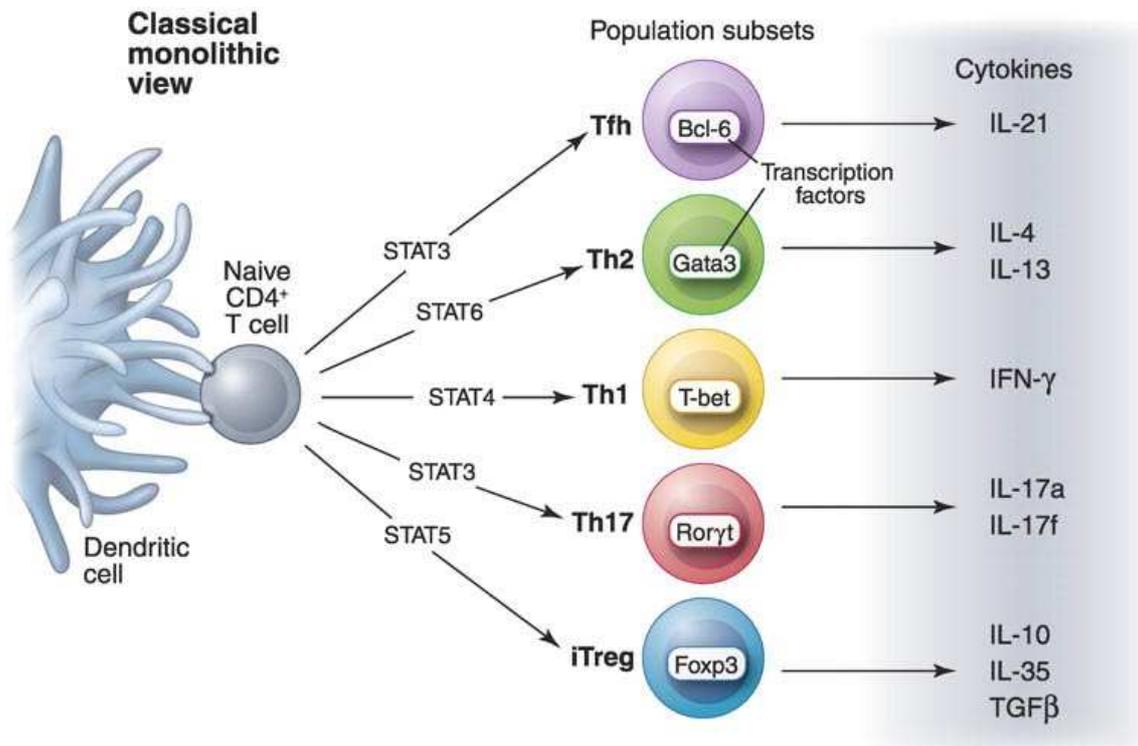
La inmunidad adaptativa es una parte muy importante del sistema inmune, altamente específico para cada patógeno y muy organizado. Por ello es capaz de desarrollar una respuesta inmune con memoria y a largo plazo.

Dentro de la inmunidad adaptativa se presentan dos grandes grupos celulares: los linfocitos T y los linfocitos B.

#### **1.4.2.1. Linfocitos T**

Los linfocitos T son una población altamente compleja con un gran número de subpoblaciones fenotípica y funcionalmente diferentes. Clásicamente son divididos en base al clúster de diferenciación (CD, de sus siglas en inglés) que expresen en la membrana. Los linfocitos T que expresan CD4 son denominados cooperadores ya que se encargan de modular la respuesta hacia una actividad pro o antiinflamatoria dependiendo del contexto. Por otro lado tenemos los linfocitos T que expresan CD8 denominados efectores o citotóxicos ya que son los encargados de provocar la apoptosis en células infectadas o tumorales.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o cooperadores inicialmente se encuentran en un estado inactivo comúnmente denominado *naive*, el cual no ha entrado en contacto con ningún antígeno y tiene la capacidad de convertirse en cualquier subtipo de linfocito cooperador. Dependiendo del ambiente inflamatorio y de la señal que reciba puede evolucionar a cualquiera de los subtipos que existen. Clásicamente existían dos subgrupos, sin embargo el número de subtipos existentes ha ido creciendo a lo largo de los años conforme se ha ampliado el conocimiento de estos linfocitos. Además, estos linfocitos son “plásticos”, lo que quiere decir que aunque hayan adoptado un fenotipo determinado pueden virar hacia otro fenotipo si se dan cambios en el ambiente o entran en contacto con otras células.



**Ilustración 8. Clasificación de los linfocitos cooperadores.** Imagen extraída desde O'Shea &Paul, *Science*, 2010.

Los 4 subtipos principales en los que se dividen son:

- Th1: considerados proinflamatorios, los cuales secretan citoquinas como IFN-γ y TNF estimulando macrófagos y linfocitos T efectores.
- Th2: capaces de secretar IL-4, IL-5 o IL-13, implicados en la defensa contra patógenos extracelulares y con reacciones alérgicas. Son además capaces de inhibir a los Th1 y Th17.
- Th17: activan a las células de la respuesta innata a través de la secreción de IL-17 y IL-22, así como a los neutrófilos con la liberación de IL-1β, IL-6 y TNF.
- Treg: denominados así por su función reguladora ya que secreta citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF-β. La característica más específica de las Treg es la expresión del factor de transcripción *FoxP3*.

Esta plasticidad celular se reproduce en los linfocitos hepáticos, los cuales realizan funciones tanto pro como antiinflamatorias. En homeostasis es muy importante mantener un equilibrio entre estas acciones contrapuestas, manteniendo un balance celular.

Las enfermedades hepáticas crónicas, las cuales tienen un componente inflamatorio importante, están influenciadas por un desequilibrio entre los linfocitos proinflamatorios y los antiinflamatorios. Concretamente en pacientes con HA se ha observado un aumento del infiltrado hepático de células Th17, con un incremento de IL-17 en sangre [46]. Además se ha encontrado una menor frecuencia de células Treg en sangre de pacientes con HA [47], lo cual podría ser debido al estrés oxidativo y la esteatosis [48].

Asimismo, en el daño hepático por alcohol se ha observado una supresión global de la respuesta de células T con un aumento de receptores inhibitorios, una menor producción de IFN- $\gamma$  y un incremento de IL-10. Estos efectos son debidos, seguramente, a la prolongada exposición a endotoxinas [49], lo que parece limitar la respuesta antimicrobiana en pacientes alcohólicos haciendo que sean más susceptibles a infecciones.

Otro gran subtipo celular de linfocitos T son los denominados efectores o citotóxicos. Los linfocitos CD8<sup>+</sup> son las células asesinas de la respuesta inflamatoria adaptativa. Su función es eliminar las células infectadas o dañadas mediante la secreción de granzinas y perforinas, además de secretar IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17 e IL-21. A su vez, promueven la respuesta de los Th2 en situación de alergia y pueden estimular respuestas autoinmunes.

En la sangre los linfocitos CD4<sup>+</sup> suelen doblar en número a los CD8<sup>+</sup>, sin embargo en el caso del hígado este ratio está invertido habiendo el doble de CD8<sup>+</sup> que de CD4<sup>+</sup>. En la hepatitis autoinmune (HAI) la célula inflamatoria con mayor peso en su fisiopatología son los linfocitos T, con un ratio CD8/CD4 muy elevado. Este gran número de células CD8<sup>+</sup> expresan CXCR3 y CCR6 facilitando su reclutamiento en el hígado gracias la

expresión de ligandos clave como CXCL9 y CCL20 [50]. Los linfocitos CD8<sup>+</sup> también juegan un papel clave en las hepatitis víricas eliminando las células infectadas con los virus de las hepatitis por virus B o C.

#### **1.4.2.2. Linfocitos B**

Son los responsables de la producción de las inmunoglobulinas, las cuales pueden presentarse en su membrana como receptores o bien secretarse en forma de anticuerpos una vez que los linfocitos B maduran y se convierten en células plasmáticas.

Comparadas con las células T, los linfocitos B han sido poco estudiados en las enfermedades hepáticas. En hígados sanos el número de células B es bajo. Sin embargo, la presencia de células plasmáticas intrahepáticas es una importante característica de la HAI. Además, determinar el tipo de inmunoglobulinas específicas de las células plasmáticas es importante para el diagnóstico de la HAI.

Al igual que en la HAI, en pacientes alcohólicos crónicos se da un proceso autoinmune donde aparecen auto-anticuerpos circulantes contra antígenos resultantes del daño por alcohol [51]. Además se observa un aumento en la producción de las inmunoglobulinas [52] aunque paradójicamente hay una bajada del número total de células B.

## **1.5. ENFERMEDADES HEPÁTICAS**

Bajo el nombre de enfermedades hepáticas encontramos un extenso espectro de enfermedades con diversos orígenes. En base al agente causante podemos dividir las hepatitis infecciosas causadas por virus o bacterias, y las hepatitis no infecciosas causadas por agentes estériles como obesidad, alcohol, drogas, tóxicos, isquemia/reperfusión o por respuesta anómala del sistema inmune.

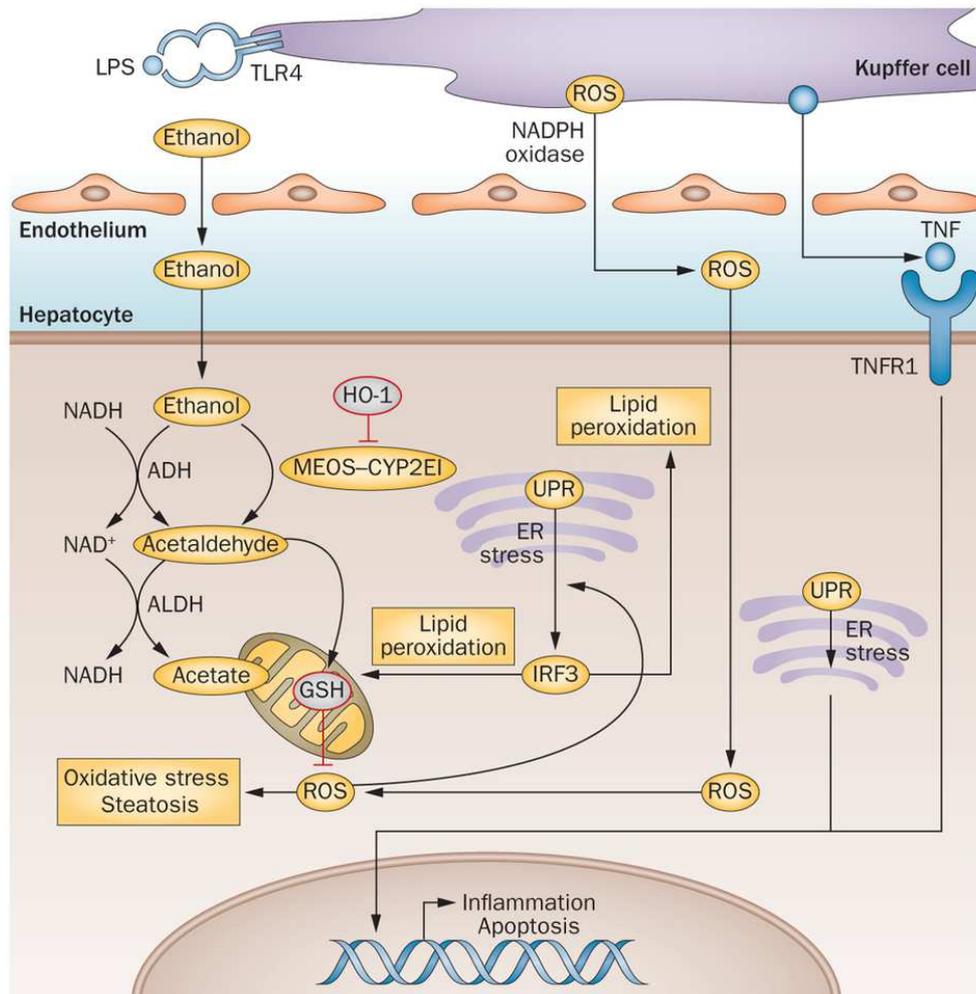
Las enfermedades hepáticas son habitualmente clasificadas en base a su duración. Las enfermedades hepáticas agudas son aquellas que se presentan como consecuencia de un brote aislado (por ejemplo una intoxicación por drogas, brote de hepatitis autoinmune, etc.) y la duración del brote dependerá de su etiología o gravedad. Por otro lado, las enfermedades hepáticas crónicas son aquellas cuyo agente causante se mantiene en el tiempo y van deteriorando la función hepática gradualmente (por ejemplo la infección por virus C, el consumo de alcohol, la obesidad, etc.). Por último, existe un último escenario donde se produce un episodio agudo sobre un hígado con daño crónico, siendo estas situaciones de alto riesgo ya que el hígado no puede responder apropiadamente al insulto agudo al tener su función muy alterada debido al daño crónico. Entre los episodios de daño agudos sobre crónicos se incluiría la hepatitis alcohólica ya que presenta un brote inflamatorio agudo dentro del contexto de una enfermedad hepática alcohólica.

En el transcurso de los estudios aquí presentados, se han estudiado varias de estas enfermedades hepáticas, con especial ahínco en la hepatitis alcohólica seguida de la cirrosis por enfermedad alcohólica y la hepatitis autoinmune.

### **1.5.1. HEPATITIS ALCOHÓLICA**

La hepatitis alcohólica está englobada dentro de las enfermedades hepáticas por abuso de alcohol, representando su condición más severa. La enfermedad hepática por alcohol (EHA) supone una de las principales causas de enfermedad hepática en el mundo.

La fisiopatología de la EHA está compuesta por varios procesos como fibrosis, acumulación excesiva de lípidos, inflamación y necrosis hepatocitaria. Por ello, dentro de la EHA se presentan varios estadios que van desde el hígado graso (esteatosis hepática), esteatohepatitis, fibrosis y cirrosis hepática, pudiendo llegar eventualmente a la aparición de hepatocarcinoma [53,54].



**Ilustración 9. Metabolismo del etanol.** Imagen extraída de Louvet y Mathurin, *Nature Review Gastroenterology & Hepatology*, 2015.

El etanol es una molécula muy pequeña pudiendo atravesar las membranas celulares. El metabolismo del etanol se produce en los hepatocitos; comienza con su conversión a acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa y seguidamente el acetaldehído pasa a acetato. También puede haber una oxidación del etanol a través del citocromo

P450, particularmente el CYP2E1. Estos procesos dan lugar a la acumulación de ROS principalmente en las mitocondrias y en el retículo endoplasmático de los hepatocitos, así como en las células de Kupffer.

Los efectos tóxicos del metabolismo alcohólico y la producción de ROS llevan al estrés y la muerte hepatocitaria. El daño hepatocitario provoca la síntesis de moléculas proinflamatorias y la muerte celular permite la salida de moléculas asociadas a daño, las DAMPs. Estos mecanismos conllevan la activación de macrófagos y neutrófilos, y a la estimulación de procesos fibrogénicos y de regeneración hepática. Otras células como las estrelladas hepáticas también participan en la liberación de citoquinas proinflamatorias. Además, se produce un mayor reclutamiento de leucocitos, sobretodo de neutrófilos, pero también de linfocitos T y NKT.

El abuso crónico de alcohol también promueve la esteatosis, mediante la distorsión del proceso metabólico de lípidos en el hígado a través de proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs) y receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR).

Otras características de las EHA es el aumento de productos bacterianos en la sangre, como el LPS, debido a que la barrera intestinal se ve comprometida a causa del alcohol [55]. Los productos bacterianos activan las células de Kupffer produciendo moléculas de adhesión, citoquinas y quemoquinas proinflamatorias.

Los pacientes con una enfermedad hepática por alcohol en un estado avanzado y que siguen bebiendo activamente pueden desarrollar un episodio agudo sobreañadido al daño crónico que se denomina hepatitis alcohólica (HA). Las formas más severas de HA se asocian al fallo hepático, un peor pronóstico y mayor mortalidad a corto plazo (2-3 meses) [56]. La HA tiene una tasa de mortalidad un 25-30% más elevada respecto a la EHA.

Las características histológicas más importantes de la HA incluyen: hepatocitos centrilobulares hinchados, infiltración de neutrófilos, cuerpos de Mallory (o hialina alcohólica), esteatosis, fibrosis e incluso cirrosis. En estudios recientes se han descrito nuevas características como la aparición de megamitocondrias en los hepatocitos, el

grado de billirubinostasis [57] y la reacción ductular [12] como factores de la HA asociados a mortalidad a los 90 días.

La reacción ductular es una de las características más importantes de la HA. Cuando se produce en el hígado un daño masivo o crónico que dificulta la regeneración hepática por parte de los hepatocitos, se produce una proliferación de las células progenitoras hepáticas dando lugar a lo que se conoce como reacción ductular. La reacción ductular constituye una población heterogénea de células proliferativas que van desde células que expresan marcadores de células madre con un fenotipo inmaduro, hasta células más comprometidas con un fenotipo hepatobiliar intermedio [58,59]. Se ha demostrado que la aparición de reacción ductular es una característica que se puede asociar a parámetros clínicos y a un peor pronóstico en los pacientes con HA [12].

Otra de las características más relevantes de la HA es el componente inflamatorio. La HA presenta una disfunción inmune caracterizada por una ineficaz respuesta a patógenos. Principalmente esta disfunción se ha descrito en neutrófilos, donde a pesar de aumentar en número en la HA, se ha observado un fallo en el estallido oxidativo (más conocido por la expresión inglesa *oxidative burst*) [60]. Estos neutrófilos aunque parecen estar preparados para desarrollar su función, en presencia de una señal inflamatoria no responden adecuadamente, ya que no están debidamente activos. Otra población que se ha observado afectada en la HA son los linfocitos T; en un reciente estudio se describe que pacientes con HA aguda presentan linfocitos T con mayor número de receptores inhibidores de la inflamación y mayor producción de citoquinas antiinflamatorias [61]. Ambos estudios especulan que esta disfunción inmune estaría relacionada con una exposición crónica a endotoxinas.

Actualmente el único tratamiento disponible para la HA es la administración de corticosteroides, para modular la respuesta inflamatoria. Sin embargo, un 40% de los pacientes con HA no responden a este tratamiento [62].

Por otro lado, ensayos clínicos han evaluado nuevas terapias como la administración de drogas anti-TNF $\alpha$  en pacientes con HA. Sin embargo los resultados hasta la fecha no han sido satisfactorios, aumentando la mortalidad en estos pacientes [63].

Debido al mal pronóstico de los pacientes con HA y la escasez de terapias, es crucial seguir estudiando los mecanismos moleculares que componen el complejo escenario de la HA e investigar posibles diana terapéuticas para su tratamiento.

En esta tesis doctoral hemos intentado aportar luz al estudio de la fisiopatología de la HA a través del estudio de reguladores post-transcripcionales denominados microRNAs.

### **1.5.2. HEPATITIS AUTOINMUNE**

Aunque esta tesis doctoral versa principalmente sobre la hepatitis alcohólica, nuestro segundo estudio nos ha llevado a profundizar también en este desorden hepático.

La hepatitis autoinmune (HAI) es una enfermedad inflamatoria progresiva del hígado que se caracteriza por la presencia de varios tipos de auto-anticuerpos, elevados niveles de transaminasas, excesivo infiltrado de células plasmáticas y una hepatitis de interfase (que consiste en un denso infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en zonas portales y periportales llegando a invadir el parénquima).

Las causas de la HAI son multifactoriales teniendo componentes ambientales pero también genéticos.

La HAI se puede dividir en dos tipos dependiendo del tipo de auto-anticuerpo presente. La HAI-1 presenta auto-anticuerpos anti-musculo liso o anti-nucleares; mientras que la HAI-2 presenta anticuerpos anti-microsomales tipo 1 de hígado y riñón (anti LKM-1, por sus siglas en inglés *Liver kidney microsomal type 1*) y anti-citosólico tipo 1 de hígado. El 75% de los pacientes de HAI son mujeres y la edad de aparición suele ser temprana, apareciendo en gran proporción en niños o adolescentes [64]. Además, es una enfermedad de difícil diagnóstico ya que ciertas características

serológicas e histológicas están compartidas con las hepatitis por virus C y B, la enfermedad de Wilson, la esteatohepatitis no alcohólica e incluso el daño hepático por drogas.

La inflamación de la HAI es una característica muy relevante. La mayoría del infiltrado inflamatorio está compuesto por células  $T\alpha\beta$ , especialmente por linfocitos T  $CD4^+$ . Las células presentadoras de antígenos presentan el antígeno en el complejo HLA-II a células  $CD4^+$  *naive* que en condiciones normales tienden a una respuesta tolerogénica. En la HAI estos linfocitos cooperadores son los que dirigen el daño hepático al reconocer como extraños, antígenos propios del hígado. Los  $CD4^+$  Th0 en presencia de IFN- $\gamma$  e IL-12 se diferencian a Th1 produciendo más IFN- $\gamma$ , esto lleva a la sobreexpresión de MHC-I y MHC-II en los hepatocitos, con una mayor activación de las células  $CD4^+$  y  $CD8^+$ ; todo esto provoca un mayor daño hepático.

No obstante, una de las poblaciones inflamatorias más estudiadas en la HAI son las células T reguladoras. Las Treg juegan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis inhibiendo la proliferación y función de las células efectoras. Tanto en pacientes como en modelos animales se han descrito discapacidades funcionales en las células Treg. Estudios recientes observan un descenso en el número de Treg circulantes y una menor producción de IL-10 con menor capacidad de suprimir células  $CD4^+$  diana [65]. Además se observa un incremento en la producción de IFN- $\gamma$  e IL-17 en células Treg de pacientes con HAI, lo que supone que estas células tienden a contribuir al pool de células efectoras y por tanto a perpetuar el daño hepático [66].

Los tratamientos actuales para la HAI se basan en fármacos inmunosupresores no específicos. La terapia estándar se compone de prednisona y azatiopirina, la cual consigue normalizar las transaminasas hepáticas en un 70% de los pacientes. Aunque la mayoría de los pacientes muestran una respuesta a largo plazo al tratamiento, en el 10-20% de los casos aparece progresión hacia la cirrosis y fallo hepático.

Las nuevas estrategias que se están desarrollando intentan restaurar la tolerancia a los autoantígenos hepáticos. Por un lado, estudios clínicos han probado el uso de

anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  (infliximab) o fármacos que eliminan las células B (rituximab). Por otro lado, existen estudios en modelos animales probando la supresión de células T y B o la infusión de células T reguladoras. Algunos estudios clínicos, aunque con bajos números de pacientes, han mostrado resultados prometedores [67].

## 2. MICRORNAs

Se estima que el genoma humano se transcribe a ácido ribonucleico (RNA, del inglés *Ribonucleic Acid*) en un 75-90%; sin embargo, únicamente un 1-2% de la totalidad de los RNAs transcritos se traducen a proteínas, siendo el resto RNA no codificantes (ncRNA del inglés *non-coding RNA*). Hay una gran variedad de ncRNA y su clasificación puede estar basada en su longitud (largos o pequeños), función (estructurales, reguladores, etc.) o su localización subcelular (nucleolares, ribosomales, etc.).

Los RNAs no codificantes pequeños son un grupo de RNAs con la función principal de regular la expresión génica, a través de la inhibición de la traducción del RNA mensajero (mRNA) a proteína. Estos ncRNAs se denominan pequeños porque tiene entre 20-30 nucleótidos de longitud. Pueden ser divididos en 3 categorías: microRNA (miRNA), RNA cortos de interferencia (short interfering RNA; siRNA) y RNA asociados a piwi (piRNA).

**Tabla 1. Clasificación de los ncRNA pequeños.** Adaptada de Minju Ha and Narry Kim, *Nature Reviews*, 2014.

	miRNA	siRNA	piRNA
<b>Longitud</b>	~22 nucleótidos	~21 nucleótidos	24-30 nucleótidos
<b>Mecanismo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición transcripcional</li> <li>• Degradación del RNA mensajero</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ruptura del RNA mensajero</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición transcripcional de transposones</li> <li>• Epigenética en nematodos</li> </ul>
<b>Función</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulación de genes codificantes para proteínas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulación de genes codificantes para proteínas y transposones</li> <li>• Defensa antiviral</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Silenciamiento de transposones</li> </ul>

Los miRNAs son el grupo de ncRNAs de interés en esta tesis doctoral, porque los miRNA son los principales reguladores epigenéticos de los genes endógenos que codifican proteínas.

El primer miRNA fue descubierto por Ambros y colaboradores mientras estudiaban el desarrollo larvario del nematodo *Caenorhabditis elegans* en 1993. Durante su estudio encontraron un regulador génico relacionado con las transiciones del desarrollo larvario, al cual llamaron *lin-4*. Cuando aislaron *lin-4* no encontraron un RNA mensajero sino un RNA no codificante con complementariedad con múltiples secuencias en la zona 3'-UTR (abreviación de *Untranslated región*, región no traducida) del mRNA del gen *lin-14* [68]. Varios años más tarde los investigadores Fire y Melo, individualmente, describieron que estos RNAs exógenos de doble cadena (dsRNA) silenciaban genes, específicamente, a través de un mecanismo denominado interferencia por RNA (RNAi) [69,70]. Gracias a la descripción de este mecanismo ambos recibieron el premio Nobel de Fisiología y Medicina en el año 2006.

Inicialmente los miRNAs se denominaron pequeños RNA temporales (stRNA), años más tarde se descubrió un mayor número de estos pequeños reguladores con el mismo mecanismo de acción y con secuencias conservadas entre invertebrados y vertebrados. Al considerarse como una categoría independiente y en base a sus características fueron renombrados con el nombre de microRNAs [71].

Desde su descubrimiento, se dedicaron grandes esfuerzos a clonar e identificar nuevos miRNAs en plantas y animales, llegando a obtener un gran número. En 2003 fue creado un catálogo para facilitar la asignación de nombre a los nuevos miRNAs [72].

### **2.1. BIOGÉNESIS DE LOS miRNAs**

Los miRNAs se transcriben a partir de genes. Los genes de miRNAs son una de las familias de genes más abundantes y más ampliamente distribuida en animales, plantas, protistas y virus. En la última versión del *miRbase*, la base de datos más fiable y usada de miRNAs, se recogen 24.521 loci de miRNAs de 206 especies, que al

procesarse dan lugar a 30.424 miRNAs maduros [73]. Aproximadamente 2.588 son de humanos, aunque se desconoce la función de muchos de ellos.

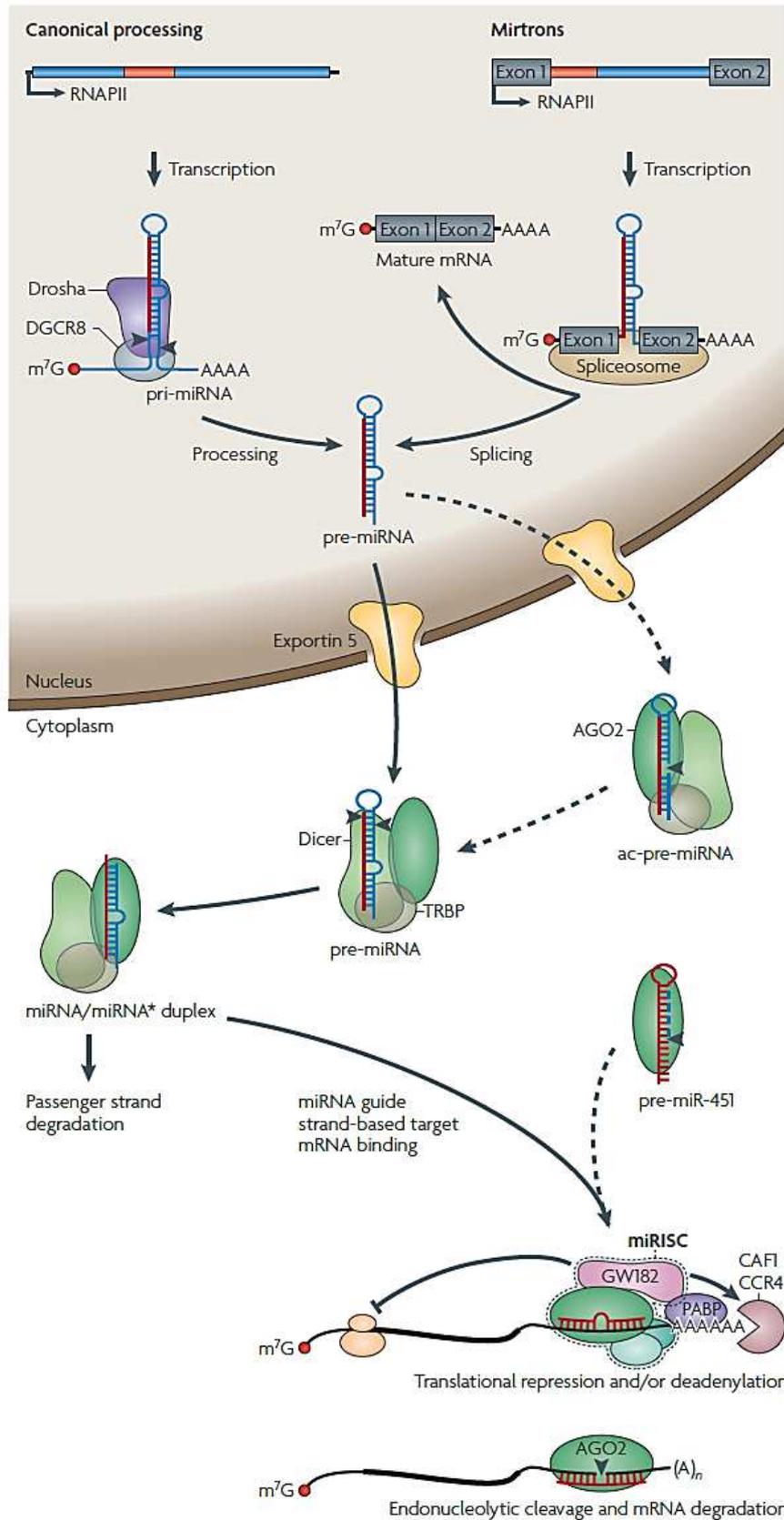
En humanos, la mayoría de los genes de miRNAs están situados dentro de la región intrónica de RNA mensajeros, mientras que la minoría están codificados en exones [74]. Aquellos miRNAs que se encuentran dentro de los intrones de mRNA codificantes pueden compartir promotor con el gen huésped pero también se ha observado una regulación independiente teniendo por tanto una actividad promotora propia [75]. Por otro lado, existen miRNAs cuyos loci se agrupan constituyendo una unidad policistrónica de transcripción, siendo transcritos juntos [76].

Los genes de miRNAs se transcriben gracias a la RNA-polimerasa II [77]. La transcripción da lugar a un precursor llamado pri-miRNA que contiene aproximadamente 1Kb y forma una estructura en horquilla. Seguidamente, el pri-miRNA es captado por una endonucleasa de RNA tipo III denominada Drosha y su factor esencial DGCR8 [78]. Ambos forman un complejo denominado *Microprocessor*. Drosha es la encargada de cortar el pri-miRNA dejando una estructura de unos 65 nucleótidos, aún con forma de horquilla, llamado pre-miRNA. Dicho pre-miRNA es exportado al citoplasma gracias a la proteína Exportina5.

Una vez en el citoplasma es captado por otra endonucleasa de RNA tipo III llamada Dicer [79,80]. Dicer se une, preferentemente, al extremo tres nucleótidos más largo del pre-miRNA previamente generado por Drosha. La función de Dicer es cortar el pre-miRNA liberando un pequeño dúplex de RNA termodinámicamente inestable. Posteriormente, el dúplex es cargado en una proteína Argonauta (AGO) para dar comienzo a la formación del complejo de silenciamiento inducido por RNA denominado RISC (por las siglas del inglés *RNA-induced silencing complex*). Las proteínas AGO poseen una actividad endonucleasa similar a las RNAsas H, que catalizan la rotura de cadenas de RNA mediante un mecanismo hidrolítico. Existen 8 tipos de proteínas AGO en humanos siendo las 4 primeras las que se asocian en el complejo RISC. Aunque cualquiera de ellas puede acoger un dúplex de RNA (tanto siRNAs como miRNAs), AGO2 es la responsable de guiar la escisión del mRNA diana junto al miRNA [81].

El inestable duplex de RNA está formado por dos cadenas, la cadena guía y la cadena pasajera. La cadena guía constituye el miRNA maduro. Normalmente es la cadena con un terminal 5' termodinámicamente más inestable la que es seleccionada como la cadena guía [82]. La cadena pasajera (o miRNA\*) no suele tener actividad inhibitoria y es degradada. Sin embargo en ocasiones presenta actividad silenciadora aunque menos potente que la cadena guía.

Una vez que el complejo pre-RISC libera la cadena pasajera, se une la proteína GW182 llamada así por ser rica en repeticiones de glicina y triptófano, y por su peso molecular. GW182 es un factor clave en el ensamblaje y la función de RISC [83]. Una vez formado el complejo RISC conteniendo el miRNA maduro, este complejo capta al mRNA diana quedando unido al miRNA por complementariedad de secuencia. Esta unión evita su traducción a proteína por inhibición de la traducción o por degradación del mRNA.

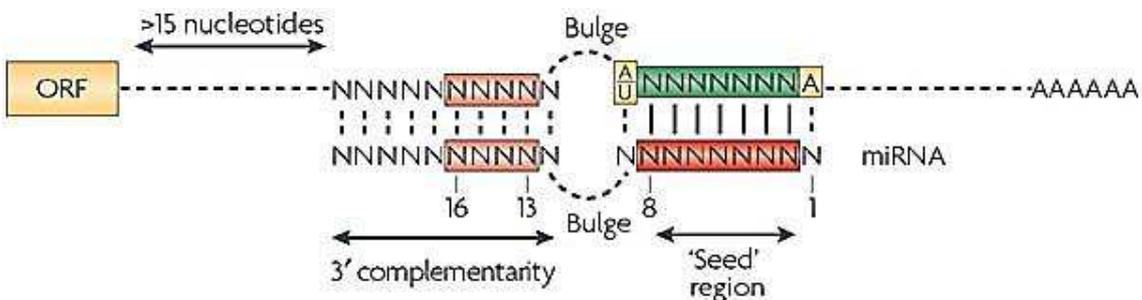


**Ilustración 10. Biogénesis de los miRNAs.** Imagen extraída desde Krol, Loedje y Filipowicz, *Nature Review Genetics*, 2010.

## 2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS miRNAs

Los miRNAs son reguladores post-transcripcionales de la expresión génica mediante inhibición de la traducción o facilitando la degradación del mRNA diana.

Cuando el mRNA diana es cargado en el complejo RISC se empareja con el miRNA por complementariedad de secuencia. En la interacción miRNA-mRNA se pueden diferenciar varias regiones. Las zonas más relevantes son: la zona 3'UTR del RNA mensajero denominado sitio de unión y una región en el miRNA, entre el nucleótido 2 y el 8, llamada secuencia semilla. El emparejamiento entre estas dos zonas ha de ser perfecto y cualquier defecto supondrá una menor eficacia en la represión. En la región adyacente podemos distinguir una zona donde hay un desemparejamiento, apareciendo una estructura abultada, situada en la zona central del dúplex. Este abultamiento facilita que la proteína AGO pueda realizar la escisión en el mRNA. Por último, la mitad 3' del miRNA debe volver a estar emparejada con el mRNA diana. La unión en esta región es relativamente importante ya que, aunque pueden darse errores, cuanto mayor sea el emparejamiento más eficaz será la formación del dúplex, sobre todo cuando la unión en la secuencia semilla no es óptima [84]. El sitio de unión de los miRNA suele estar repetido en la zona 3'UTR del mRNA, lo cual aumenta la eficacia de la inhibición. De hecho, el silenciamiento de un mRNA es facilitado por presentar sitios de unión para diferentes miRNAs en la zona 3'UTR.



**Ilustración 11. Dúplex miRNA-mRNA diana.** Imagen extraída de Filipowicz et al, *Nature Review Genetics*, 2008.

El proceso completo de silenciamiento de un gen a través de la represión de su síntesis proteica no está completamente descrito en todas las especies. Sin embargo, el mecanismo más probable por el cual un miRNA silencia la expresión génica es mediante la inhibición durante la iniciación de la síntesis proteica.

Durante la iniciación el factor eucariota de iniciación de la traducción 4E (eIF4E) se une a la región 5' del mRNA donde se encuentra una caperuza o capuchón denominado *cap* (por su nombre en inglés). Esto da lugar a una cascada de uniones de diferentes factores de iniciación y finalmente a la unión de las subunidades ribosomales 40S y 60S llevando a la siguiente fase que es la elongación. Los miRNAs, dentro del complejo RISC, parecen actuar en este momento de la traducción proteica. Hay evidencias que sostienen que las proteínas AGO y las proteínas micro-ribonucleares (miRNP) bloquean la unión del eIF4E a la región de unión a *cap* [85,86]. Así, se bloquea la cascada de la iniciación y la unión del ribosoma.

Se han propuesto mecanismos alternativos como la represión en la unión de la subunidad ribosomal 60S, la desadenilación del mRNA, por la proteína GW182, llevando a una desestabilización y degradación del mRNA. Incluso se presentan mecanismos post-iniciación en los cuales se observa un desacoplamiento de los ribosomas o una proteólisis del péptido naciente [84].

Dejando a un lado la regulación post-transcripcional de mRNAs diana, también se ha investigado sobre la implicación de los miRNA en procesos que ocurren a nivel nuclear, donde podrían actuar como chaperonas alterando la estructura de los mRNAs o regular la interacción del mRNA con proteínas nucleares. Sorprendentemente, también hay evidencias de que ciertos miRNAs podrían actuar como reguladores positivos de la expresión génica [87,88].

### **2.3. REGULACIÓN DE LOS miRNAs**

La regulación de los miRNAs se produce a muchos niveles, empezando por su transcripción desde el genoma, pasando por su transporte al citoplasma o su procesamiento y terminando por su degradación. Existe un amplio espectro de mecanismos que regulan no sólo la síntesis del miRNA sino la de toda la maquinaria celular implicada, esto nos indica que la regulación de los miRNAs es un mecanismo altamente importante para un correcto funcionamiento celular.

La transcripción de los miRNAs se produce a través de la polimerasa de RNA II y constituye un importante punto de regulación. El promotor de los genes de miRNAs son similares a los promotores de genes de RNA mensajero, conteniendo la caja TATA, elementos iniciadores, elemento de modificación de histonas y también islas CpG [89]. Esto permite que diversos factores de transcripción puedan unirse a los promotores y controlar la expresión de los miRNAs. Factores de transcripción como p53, c-Myc, ZEB1 y ZEB2 son capaces de regular positiva o negativamente la expresión de miRNAs. Por ejemplo en el caso de la familia de miRNAs miR-17-92 se ha observado que c-Myc, entre otros, es capaz de unirse al promotor activando su transcripción [90]. Sorprendentemente tanto c-Myc como la familia miR-17-92 son ampliamente descritos por su implicación en el desarrollo de tumores. Además c-Myc provoca una represión de la expresión de algunos miRNAs supresores de tumores como miR-15a, miR-29 etc. [91]. En muchas ocasiones el miRNA regula directa o inversamente la transcripción de factores de transcripción implicados en su propia biogénesis, produciéndose un bucle regulatorio entre ambas partes.

La regulación de los miRNAs también se produce durante su procesamiento mediante la regulación de las enzimas esenciales para la maduración del miRNA como son Drosha, Dicer u otras proteínas adyacentes. Todas estas proteínas tienen regulada su expresión y su función [92].

La degradación de los miRNAs es un proceso menos conocido. Al igual que en el caso de la biogénesis parece que la degradación es un proceso individual para cada miRNA. Estímulos intra y extracelulares podrían alterar el proceso de degradación, como

ocurre en el caso del miR-122 cuya expresión desaparece en el hígado tras una hora después del tratamiento con interferón [93].

## **2.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS miRNAs**

Para comprender en su totalidad el escenario de los miRNAs en un proceso patofisiológico, se han desarrollado métodos de cribado que son una gran fuente de información. Estos métodos de cribado pretenden desvelar el perfil de miRNA presentes en una situación concreta.

### **2.4.1. Métodos basados en hibridación (Arrays)**

Los arrays son técnicas de hibridación genómica que han sido ampliamente utilizados para desvelar el perfil de expresión genética en diversos procesos y enfermedades. Los arrays para miRNAs fueron los primeros métodos utilizados para averiguar perfiles de expresión de miRNAs a gran escala.

Esta técnica inicia con el etiquetado de los miRNAs presentes en la muestra, los cuales se unen en su extremo 3'-hidroxilo a un nucleótido conjugado con un fluorocromo. Una vez etiquetados, los miRNAs se hibridan con sondas de DNA por complementariedad de secuencia. Al hibridar los fluorocromos conjugados al miRNA son liberados emitiendo luz, lo que indica que dicho miRNA está presente en la muestra.

Los arrays para miRNAs son técnicas a gran escala con un precio asequible y están bien establecidas, esto permite el procesamiento de gran número de muestras. Sin embargo no tienen una gran especificidad y son difíciles de usar para cuantificaciones absolutas. Además no se pueden utilizar para descubrir nuevos miRNAs. Aun así los arrays son un método eficaz para hacer cuantificaciones relativas de perfiles de miRNAs entre dos o más estados, por ejemplo sano contra enfermo.

### **2.4.2. Métodos basados en PCR cuantitativa**

Consisten en la transcripción de todos los miRNAs, presentes en la muestra, a DNA complementario (cDNA) seguido de una PCR cuantitativa a tiempo real donde se monitoriza la amplificación del producto.

Para convertir este método en una técnica a media escala se han desarrollado placas comerciales donde las sondas para miRNAs están pre-fijadas y sólo se ha de incorporar la muestra y la mezcla enzimática.

Una de las ventajas de este método es su fácil utilización con los instrumentos de rutina de un laboratorio estándar. Además es una técnica bien establecida de alta sensibilidad y especificidad. Por último, este método permite la cuantificación absoluta de miRNAs.

No obstante, es una técnica algo más costosa que el array, y es de media escala, ya que en el transcurso de un día no se puede procesar un gran número de muestras; tampoco permite el descubrimiento de nuevos miRNAs.

### **2.4.3. Secuenciación de RNA**

Las técnicas de secuenciación de nueva generación también se han utilizado para el estudio de los miRNAs. Esta técnica comienza por la construcción de una librería de cDNA a partir de los miRNAs en la muestra. A continuación, se procede a una secuenciación masiva en paralelo de toda la librería. Esta técnica permite por tanto la detección de miRNAs tanto conocido como desconocidos, así como la identificación de miRNAs con secuencias casi idénticas. Sin embargo, la detección de nuevas secuencias pequeñas de RNA resultan no ser miRNAs en algunas ocasiones, pudiendo ser el resultado de la degradación de otros RNAs. Además esta técnica tiene un alto coste y requiere de una gran infraestructura computacional para el procesado y análisis de los datos.

## **2.5. IDENTIFICACIÓN DE mRNA DIANA**

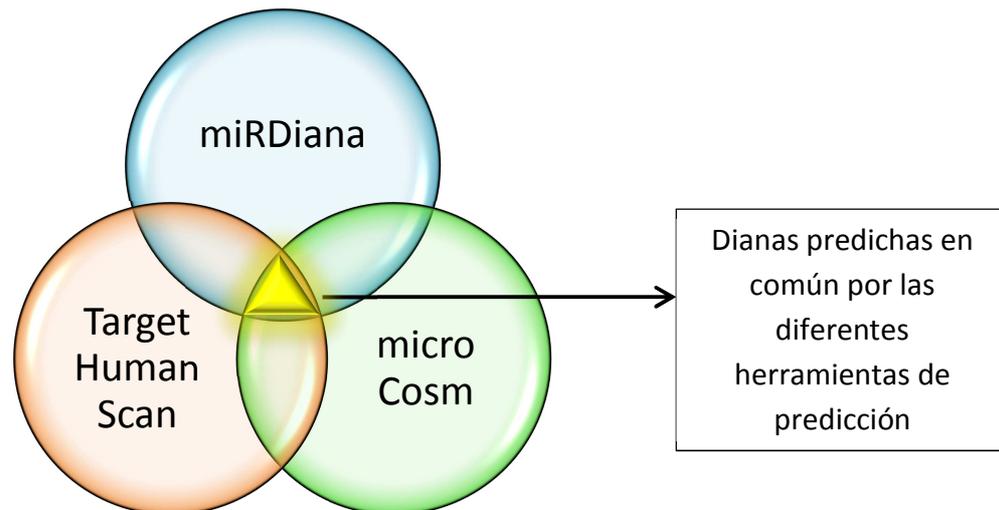
Para desvelar la función de un miRNA es imprescindible identificar sus mRNAs diana. Esta tarea es más fácil en plantas donde la interacción miRNA-mRNA es siempre perfectamente complementaria. Por ello, en animales se convierte en una tarea mucho más compleja ya que el emparejamiento no ha de ser totalmente complementario.

Para investigar cuales son las dianas de uno o varios miRNAs se pueden utilizar diferentes aproximaciones.

### **2.5.1. Aproximaciones computacionales**

Se han desarrollado gran número de herramientas bioinformáticas para la predicción de mRNA diana. La predicción se basa en reglas básicas extraídas de la interacción miRNA-diana como son: complementariedad perfecta y/o emparejamiento G-U entre la región 3'UTR del mRNA y la secuencia semilla del miRNA; la formación de una estructura en hetero-dúplex termodinámicamente estable y la conservación evolutiva de las secuencias de unión a miRNAs a lo largo de los metazoos.

Sin embargo, la región 3'UTR no es la única región a la que se puede unir el miRNA, también existen sitios de unión en la región 5'UTR o incluso dentro de la región que codifica para proteína. Por ello entre las herramientas de predicción que sólo consideran la región 3'UTR o aquellas que también consideran otras regiones, se obtienen resultados variables. La tasa de falsos positivos de las diferentes herramientas varía entre el 24-70%. Por ello se recomienda utilizar más de una herramienta de predicción e integrar los diversos resultados.



**Ilustración 12. Combinación de varias bases de datos para obtener potenciales mRNA dianas.**

Otra característica a tener en cuenta es la accesibilidad o ausencia de estructuras secundarias en el mRNA diana. La herramienta *mFold* ayuda a examinar las regiones que flanquean la región de unión al miRNA en busca de estructuras secundarias [94].

Las herramientas computacionales son de gran ayuda a la hora de disminuir las listas de posibles genes dianas, pero no deben utilizarse como única herramienta de identificación sino como complemento de las técnicas experimentales.

### **2.5.2. Aproximaciones experimentales**

Las aproximaciones experimentales nos permiten obtener información biológica sobre la situación celular o tisular frente a un determinado miRNA.

Se pueden seguir varias estrategias dependiendo de los recursos de que se dispongan eligiendo entre un cribado de todas las posibles diana o si se quiere determinar una interacción individual.

Para determinar los mRNA diana a gran escala, intentando así identificar todos los genes regulados por un miRNA, es realizar un análisis transcriptómico tras forzar la desregulación del miRNA en estudio. Primeramente se realiza una sobreexpresión del miRNA o por el contrario una inhibición, seguido del análisis de la expresión génica.

Todos los genes que se comporten de forma opuesta al miRNA son genes susceptibles de ser dianas; es decir, se seleccionan aquellos genes que disminuyan su expresión frente a la sobreexpresión del miRNA o que aumenten en el caso de la inhibición. La determinación de la expresión génica se hace mediante array para determinar simultáneamente todos los genes que han variado frente a la modulación del miRNA.

Otra aproximación es analizar la proteína traducida, en vez del mRNA, mediante técnicas de proteómica. Un método utiliza el etiquetado de aminoácidos mediante isótopos estables, que permite diferenciar entre desestabilización e inhibición del mRNA diana gracias a la intensidad de los péptidos en la espectrometría de masas. Otra técnica utilizada es la 2D-DIGE (*Diferencia en la fluorescencia en electroforesis bidimensional en gel*) donde se marcan las proteínas de dos situaciones diferentes con dos moléculas fluorescentes Cy3 y Cy5. Tras la digestión y espectrometría de masas, se calcula el ratio Cy3/Cy5.

Por último, hay aproximaciones bioquímicas que consisten en la inmunoprecipitación de proteínas del complejo RISC (sobretudo AGO) junto con los RNAs asociados, pudiendo desvelar así los mRNA diana. Los transcritos se analizan por array o secuenciación.

Otra aproximación experimental es la validación específica de una interacción miRNA-mRNA. El método más preciso para validar un mRNA diana es hacer un ensayo reportero. El más establecido es el ensayo que utiliza los genes reporteros de la luciferasa (*Photinus* o *Renilla*) [95] o de la proteína verde fluorescente (GFP). Este método consiste en el clonaje de la región 3'UTR del gen diana dentro de un plásmido, seguido de la secuencia del gen reportero. Seguidamente se realiza una transfección conjunta del miRNA y del plásmido reportero en una célula huésped y a continuación se mide la actividad luciferasa entre 24 o 48 horas después. A pesar de ser el método más eficaz, los métodos con plásmido reportero son muy laboriosos, dependen de la elección en la región 3'UTR clonada y pueden variar según el método de transfección.

También suelen utilizarse métodos de detección del mRNA diana a través de PCR cuantitativa a tiempo real (*qRT-PCR*) o por detección de la cantidad de proteína a través de *Western Blot*. Estos métodos siguen el mismo diseño que las aproximaciones transcripcionales o proteómicas usadas para la detección de dianas a gran escala descritas anteriormente. Sin embargo estas aproximaciones van dirigidas a estudiar un mRNA diana o proteína individual. Estos métodos están aceptados aunque no determinan si la relación miRNA-mRNA es directa o se debe a un efecto indirecto.

### **2.5.3. Análisis integrativo**

Por último, existe una aproximación que permite analizar a gran escala los genes regulados por los miRNAs en una situación concreta. Los análisis integrativos o integraciones consisten básicamente en ensamblar los datos en dos perfiles de expresión, la expresión de miRNAs y la expresión génica. Esta aproximación es muy útil para crear redes de interacción a gran escala, pero sobretodo nos permite tener en cuenta las interacciones miRNA-mRNA que se dan específicamente en el contexto de una fisiopatología.

Para llevar esto a cabo diversos grupos han desarrollado paquetes informáticos como MAGIA [96], mirConnX [97] o miRComb [98] entre otros.

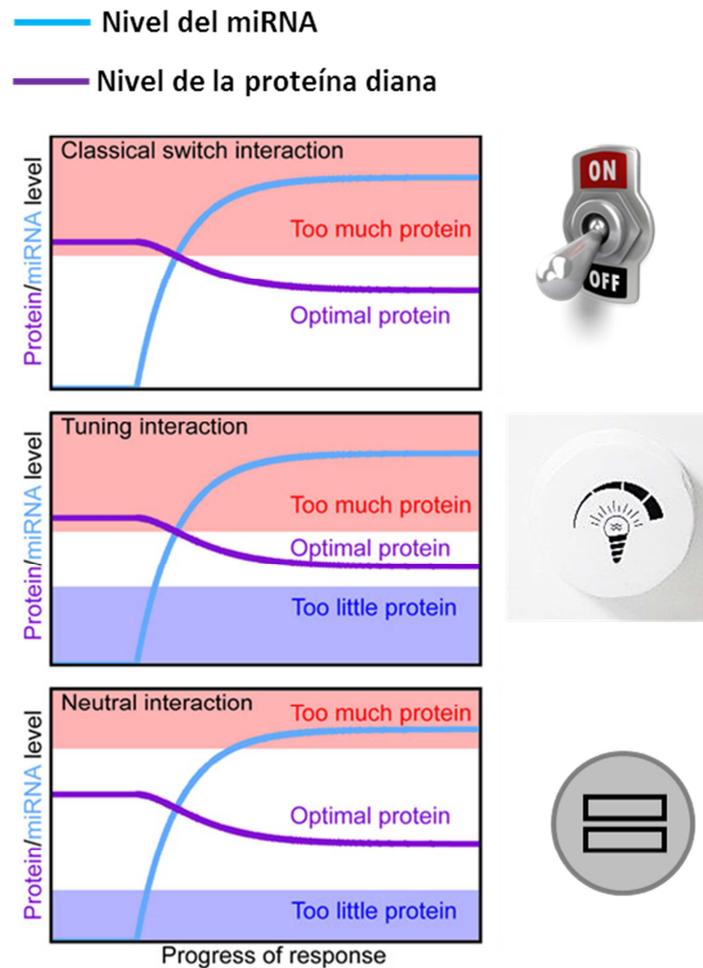
En esta tesis se han integrado los datos de transcriptómica en HA junto con el perfil de miRNAs gracias al paquete de R miRComb.

## **2.6. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LOS miRNAs**

Más del 50% de los genes de mamíferos están bajo presión selectiva para conservar su secuencia de unión a miRNAs [99], por lo que se cree que los miRNAs están relacionados con todos los procesos y funciones biológicas. Los experimentos desarrollados a lo largo de los años han demostrado que los miRNAs tienen participación en el desarrollo, proliferación y supervivencia celular, por lo que se consideran importantes tanto en homeostasis como en enfermedad.

El modelo clásico que veía los microRNAs como interruptores de la expresión génica, donde desaparecía la diana en presencia del miRNA, ha sido muy discutido, sobre todo en organismos complejos. La ablación de un único miRNA suele tener pequeños efectos fenotípicos asociados con efectos moderados en sus dianas. Teniendo esto en cuenta, hay un creciente acuerdo de que la mayoría de los miRNAs actúan como afinadores de las decisiones celulares.

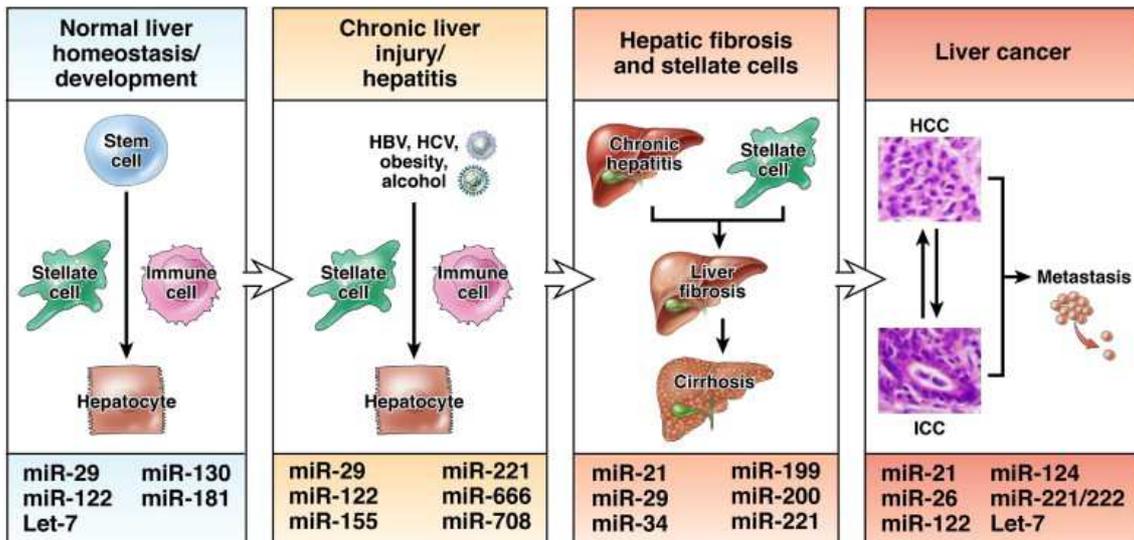
Uno de los modelos propuestos para explicar la influencia de los miRNAs en la expresión génica es el modelo de Bartel y Chen [100]. Estos investigadores postularon el modelo del “*micromanager*”, o sea el modelo del micro-administrador. Este modelo considera que los miRNAs crean un ambiente o entorno único para cada tipo de célula donde amortiguan la expresión de miles de RNA mensajeros, proporcionando además el contexto donde se producen las presiones selectivas de los genes. El modelo del *micromanager* nos hace considerar los miRNAs como reóstatos de un circuito eléctrico, los cuales modulan la intensidad del flujo eléctrico. En este caso los miRNAs serían reguladores de la intensidad proteica. Por lo tanto las dianas de los miRNAs son finalmente clasificadas en 3 categorías: las dianas “interruptor”, las dianas “afinadas” y las dianas neutras. Las dianas “interruptor” son aquellos genes cuya expresión no debe ser traducida en la célula y por tanto son “apagadas” sufriendo una reducción importante de proteína. Las dianas “afinadas” son aquellos genes cuya proteína requiere unos niveles óptimos en la célula, por ello su regulación es mucho más fina. Este tipo de mRNA diana afina su complementariedad con los miRNAs del ambiente celular a lo largo de la evolución, para conseguir una expresión óptima en cada tipo celular. Por último tenemos las dianas neutras que tienen complementariedad con los miRNAs por azar, pero su reducción es regulada por mecanismos de retroalimentación o simplemente no tiene efectos, esto provoca que la asociación miRNA-diana neutral no tenga ninguna presión selectiva.



**Ilustración 13. Categorías de la regulación de las dianas de miRNAs.** Imagen adaptada de Bartel, *Cell*, 2009

## 2.7. ROL DE LOS miRNAs EN EL HÍGADO

Los microRNAs están presentes en todos los procesos hepáticos, desde el desarrollo embrionario, pasando por el funcionamiento en el hígado adulto y por supuesto en las enfermedades hepáticas. Numerosos estudios en los últimos años han demostrado que alteraciones de los niveles de miRNAs se asocian con hepatitis víricas, enfermedades hepáticas por alcohol, daño hepático por drogas, esteatohepatitis no alcohólica, hepatitis autoinmune e incluso isquemia y reperfusión.



**Ilustración 14. Ejemplos de miRNAs descritos en la fisiología y en las enfermedades hepáticas.** Imagen extraída de Wang et al. *Gastroenterology*, 2013.

Para desvelar el papel de los miRNAs en el desarrollo hepático, Hand y colaboradores desarrollaron un ratón con hepatocitos deficientes en la enzima Dicer. En este estudio observaron que la falta de miRNAs maduros no es fatal para el desarrollo del hígado; sin embargo provocó una gran actividad proliferativa, inflamación y apoptosis hepatocitaria [101].

El miR-122 es uno de los miRNAs más abundantes y específicos del hígado, representando el 70% de los miRNAs expresados en el hígado [102]. Se detecta durante la embriogénesis y sigue estando altamente expresado en la edad adulta. El miR-122 se ha descrito que estimula directa o indirectamente la expresión de varios genes específicos de hepatocitos [102]; por ejemplo *HNF6*, *FOXA1* o *HNFA4* se encuentran en un círculo de retroalimentación positiva con el miR-122, sugiriendo que este miRNA es responsable de mantener un balance entre proliferación y diferenciación [103,104]. Otros miRNAs como el miR-33, miR-23b o la familia de los miR-30 también se han descrito en la proliferación y diferenciación de los hepatocitos o del árbol biliar [105].

Los miRNAs se han estudiado en los procesos metabólicos que se producen en el hígado como el metabolismo de la glucosa, de los lípidos, del hierro y en la detoxificación [105]. En el metabolismo de la glucosa, se ha descrito que el miR-34a y

el miR-181a son capaces de inhibir el gen *SIRT1*, que es un regulador positivo de la señalización de la insulina[106]. El miRNA let-7 también participa en el metabolismo de la glucosa provocando resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa mediante la represión de su gen diana *lin-28* [107].

Con respecto al metabolismo de lípidos, el miR-122 fue el primer miRNA relacionado con este proceso. La inhibición de miR-122 redujo los niveles de colesterol, la síntesis de ácidos grasos y el colesterol hepático [108]. A su vez, el miR-33 también es un importante regulador de la homeostasis del colesterol y el metabolismo de los ácidos grasos, a través de la regulación de genes como *ABCA1* [109]. Otros miRNAs han sido relacionados con una inhibición de la lipogénesis como el miR-1 y el miR-206 [110].

El metabolismo del hierro también parece estar regulado por miRNAs. Por ejemplo, una depleción del miR-122 provoca deficiencia de hierro al inhibir genes que controlan sus niveles [111].

Asimismo ciertos miRNAs se han descrito relacionados con procesos de detoxificación en el hígado, al observarse la regulación de diversos citocromos. El citocromo CYP3A4 cataliza la mayoría de las drogas que llegan al hígado, este citocromo está regulado por PXR que a su vez está inhibido por el miR-148a [112]. Por otra parte, el miR-34a y el miR-24 a través de la inhibición del factor de transcripción HNF4 $\alpha$  disminuyen los niveles de los citocromos CYP7A1 y CYP8B1 [113].

## **2.8. miRNAs IMPLICADOS EN ENFERMEDADES HEPÁTICAS**

La desregulación de los miRNAs es una característica de muchas enfermedades hepáticas, además ha sido ampliamente estudiada la relación de su desregulación con los procesos fisiopatológicos.

Los tumores hepáticos han sido ampliamente estudiados. El miR-151 y el miR-21 han sido descritos como miRNAs con potencial oncogénico u oncomiRs, entre otros. Por un lado, el miR-151 se ha relacionado con las metástasis hepáticas al activar genes como *RAC1* o *CDC42* que a su vez inhiben *RhoGDI A* que es un supresor de metástasis [114]. Asimismo, el miR-21 se ha encontrado sobreexpresado en el carcinoma hepatocelular

(HCC, del inglés *hepatocellular carcinoma*) y se ha descrito su papel en la progresión de este cáncer [115], así como en otros tumores de colon, pulmón, páncreas, próstata, etc. [116]. Por otro lado, algunos miRNAs se han descrito como supresores de tumores. Por ejemplo, la baja expresión del miR-199a/b-3p se ha correlacionado con un peor pronóstico en paciente con HCC y además la restauración de su expresión consiguió inhibir *PAK4* (gene promotor de tumores) suprimiendo el crecimiento del tumor [117]. El miR-26 también se ha confirmado como un supresor de tumores, siendo un buen candidato para el tratamiento del HCC, ya que la administración del miR-26 mediante adenovirus redujo significativamente los tumores en un modelo *in vivo* [118]. Otros miRNAs como let-7g y miR-122, entre otros, se han propuesto como supresores de metástasis en HCC [119,120].

Por otro lado, el miR-122 ha sido ampliamente estudiado por su implicación en la hepatitis por virus C (HCV). Este miRNA es un factor esencial para permitir la replicación del virus de la hepatitis C; mediante la unión del miR-122 al genoma viral lo protege del ataque de las exonucleasas [121]. Sin embargo, miR-122 no es el único miRNA estudiado en la HCV, miR-199a también está involucrado en la replicación del virus, pero en cambio provoca una baja de su replicación [122].

En lo que respecta a otras hepatitis víricas como la hepatitis por virus B (HBV) el miR-122 también se ha descrito como un factor que facilita la replicación del virus; no obstante en este caso es un efecto indirecto mediado por la ciclina D1 que es una diana del miR-122 [123]. Por otro lado se ha observado que una disminución del miR-199a-3p y el miR-210 suponen también una menor replicación del virus de la HBV [124].

La inflamación hepática está también regulada por miRNAs a lo largo de las diferentes enfermedades hepáticas. Por ejemplo el miR-132 está sobreexpresado en las células de Kupffer en ratones tratados con alcohol [125]; y en el caso del miR-122 se ha sugerido que tiene características anti-inflamatorias ya que su inhibición provocó un aumento de *Ccl2* y un mayor reclutamiento de células inflamatorias con mayor producción de *TNF* e *IL-6* [126]. Recientemente se ha descrito la sobreexpresión de los miRNAs miR-24 y miR-466i en hepatocitos cuando estos son tratados con LPS

sugiriendo su implicación en la inflamación hepática [127]. Otro miRNA relacionado con la inflamación hepática es el miR-155, este miRNA se ha encontrado sobreexpresado en macrófagos tratado con etanol, donde la sobreexpresión del miR-155 indirectamente aumentaba el factor proinflamatorio TNF $\alpha$  [128]. También se ha observado una desregulación del miR-155 en las células inflamatorias circulantes de pacientes con HCV [129] e incluso en el líquido ascítico de pacientes cirróticos con infección bacteriana [130]. En un modelo animal de enfermedad alcohólica se ha descrito el papel proinflamatorio del miR-155 al observar una bajada del reclutamiento de los macrófagos y una inclinación hacia un fenotipo menos inflamatorio en animales deficientes en miR-155 [131]. En otro estudio más reciente también se describe una menor inflamación hepática en ratones deficiente en miR-155 tras un trasplante hepático [132]. En esta tesis doctoral mostramos que el miR-155 en el caso de daño hepático agudo mediado por células inflamatorias, ayuda a aliviar el daño hepático y la inflamación.

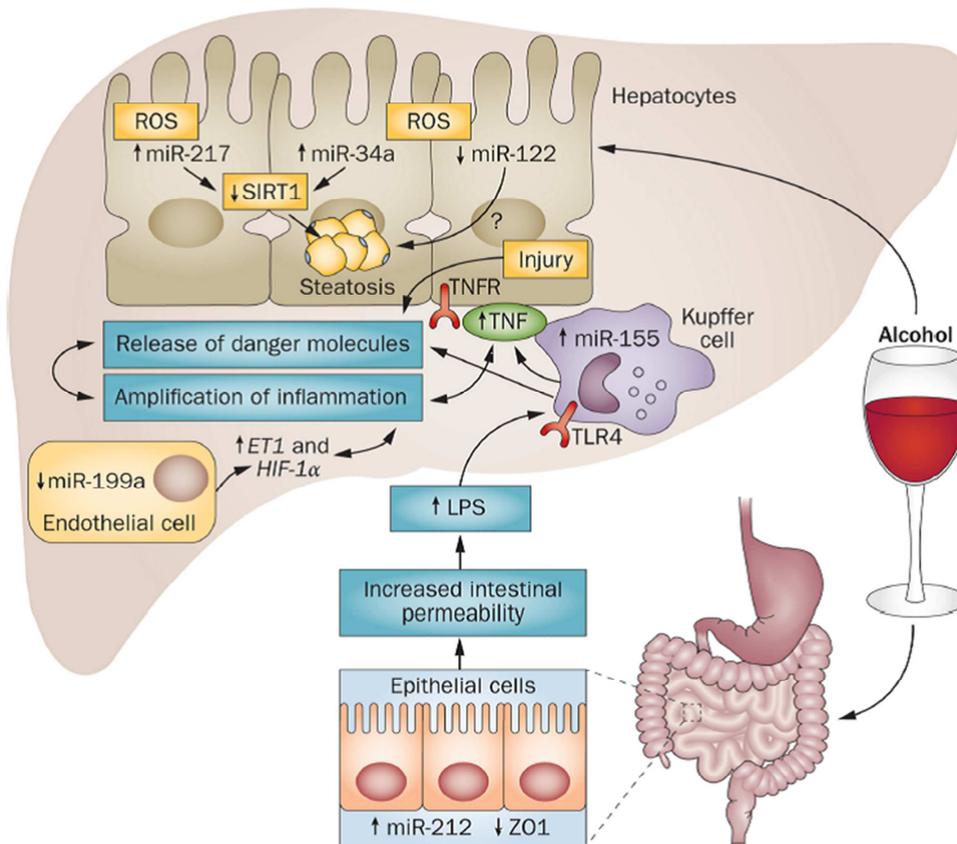
Los miRNAs también tienen un papel en la fibrosis hepática. Muchos de los estudios que han investigado esta relación se han centrado en los miRNAs desregulados en las células estrelladas hepáticas [133]. Se han encontrado miRNAs desregulados tanto en la fase quiescente como durante en la activación; por ejemplo el miR-192 se ha relacionado con la activación, proliferación y migración de las células estrelladas [134]. Otros estudios han relacionado ampliamente el miR-29 con la activación de las células estrelladas hepáticas, el TGF- $\beta$  es capaz de disminuir los niveles de este miRNA provocando una mayor activación de las células estrelladas y mayor deposición de matriz extracelular [135]. Un estudio más reciente ha descrito que la familia miR-378 esta infraexpresada en un modelo clásico de fibrosis, por tratamiento con tetracloruro de carbono. Además observaron que el miR-378a-3p era capaz de inhibir la activación de las células estrelladas hepáticas a través de la inhibición del gen *Gli3* y la inducción del gen de quiescencia *gfap* [136]. Por otro lado tenemos el miR-21, cuya sobreexpresión se ha relacionado con una mayor fibrogénesis. Un estudio ha descrito que esta relación puede deberse a una mayor activación de las células estrelladas hepáticas a través de la inhibición de *PTEN* por el miR-21 y por la activación indirecta de Akt [137]. En otro estudio se observó un circuito de retroalimentación positiva

entre miR-21, *PDCD4* y *AP-1* en las células estrelladas conllevando a un mantenimiento de la activación de estas células [138]. Reforzando la importancia del miR-21 en la fibrosis hepática, algunos estudios mediante inhibición *in vitro* o *in vivo* del miR-21 observan una disminución de la activación de las células estrelladas y/o disminución en la fibrosis hepática[139–141].

Otro proceso donde se ha estudiado la desregulación e implicación de los miRNAs es la acumulación excesiva de lípidos, conocido como esteatosis hepática. Si se agrava la esteatosis puede llevar a enfermedades hepáticas como la esteatohepatitis no alcohólica (NASH, del inglés *Non-Alcoholic Steatohepatitis*), en la cual también se ha observado la presencia de miRNAs desregulados. Por ejemplo, el miR-122 está implicado en la regulación del metabolismo de los lípidos en el hígado, y una deficiencia de esta miRNA supone un descenso de los niveles séricos de triglicéridos y colesterol, debido a una menor excreción por parte de los hepatocitos. En animales deficientes en el miR-122 se observó una acumulación excesiva de lípidos en los hepatocitos, desarrollando rápidamente una esteatohepatitis y consecutivamente daba lugar a la aparición de HCC [142,143]. Otro miRNA que se desregula según el contenido lipídico del hígado es el miR-34a, el cual está muy sobreexpresado en pacientes con NASH y en animales con dieta rica en grasa. El miR-34a silencia el gen *SIRT-1*, el cual es un factor clave en la regulación de la homeostasis energética [144]. Por otro lado, el miR-33 ha sido descrito en varios estudios por estar relacionado con la oxidación de los ácidos grasos, el colesterol y la regulación de los ácidos biliares. La ausencia del miR-33 provoca obesidad y esteatosis hepática debido a la inhibición de dos reguladores del metabolismo lipídico como son *SREBP-1* y *SREBP-2* [145]. Otro miRNA implicado es el miR-155, cuyo caso es controvertido ya que existe un estudio que postula que la falta de este miRNA aumenta la esteatosis hepática en un modelo de NASH [146]; mientras que otro estudio más reciente observa una reducción de triglicéridos y esteatosis en el hígado de animales deficientes en el miR-155 [147]. Recientemente se ha descrito una sobreexpresión del miR-132 en pacientes con NASH; además en este estudio se provocó un empeoramiento en ratones que sobreexpresaban el miR-132, mientras que su inhibición o de la de sus múltiples genes diana revertía el fenotipo con una disminución de la hiperlipidemia hepática [148].

### 2.8.1. miRNAs en las enfermedades hepáticas por alcohol

Las evidencias de una desregulación de los miRNAs en la enfermedad hepática por alcohol han crecido en los últimos años. La enfermedad hepática por alcohol se asocia a fibrosis, inflamación y esteatosis; por ello, se han encontrado desregulados muchos de los miRNAs mencionados anteriormente, implicados en estos procesos patofisiológicos. Por ejemplo, hemos señalado que el miR-155, el miR-132 o el miR-122 entre otros se han encontrado desregulados en modelos *in vivo* o *in vitro* de daño hepático por alcohol.



**Ilustración 15. Ejemplos de miRNAs desregulados en la enfermedad hepática por alcohol.** Imagen de Szabo y Bala, *Nat. Rev. Gastroenterol.*, 2013.

Por otro lado, en un modelo de ingesta de alcohol durante 4 semanas, se describió una infraexpresión de los miRNAs miR-27b, miR-214, miR-199-3p, miR-182, miR-200a y miR-322; mientras que los miRNAs miR-705 y miR-1224 se encontraron

sobreexpresado en el hígado de los ratones tratados con alcohol [149]. Por su parte, el miR-217 se ha relacionado con la acumulación lipídica en hepatocitos tratados con etanol, a través de la inhibición de *SIRT-1* [150]. Recientemente, el mismo grupo ha reportado que la sobreexpresión *in vivo* del miR-217 lleva a esteatosis e inflamación hepática inducida por etanol a través de la inhibición de la vía *SIRT-1* y *lipin1* [151]. También se ha descrito que el miR-214 es capaz de aumentar el estrés oxidativo, asociado a etanol, en células hepáticas [152]. Por otro lado, se ha propuesto que el consumo de alcohol provoca cambios en el miR-199 en las células endoteliales humanas y de rata, asociado a un aumento de *endothelium-1*, proteína relacionada con el mantenimiento del tono circulatorio [153]. El miR-26 también ha sido relacionado con el daño hepático por alcohol. En este caso se ha observado que el miR-26 aumenta la autofagia en las células hepáticas y por tanto una sobreexpresión de este miRNA alivia el daño [154].

Recientemente se ha descrito el papel del miR-223 en el daño hepático por alcohol. Mientras que se observa una bajada en la expresión hepática del miR-223 en pacientes alcohólicos, sus niveles en suero aumentan; además en ratones tratados con etanol, de forma aguda sobre crónica, obtienen los mismos resultados. Además observan un aumento de la expresión del miR-223 en neutrófilos. Finalmente la ablación del miR-223 supuso una exacerbación del daño hepático mediado por etanol, una mayor infiltración de neutrófilos y mayor producción de ROS [155].

También existen varios estudios que describen la desregulación de miRNAs sobre tejidos extra-hepáticos, provocado por el consumo de alcohol. Por ejemplo, en el intestino de pacientes alcohólicos se ha encontrado una disminución del miR-212, lo que se ha relacionado con un aumento de la permeabilidad intestinal [156]. En el caso de los monocitos circulantes, tenemos el miR-27a el cual regula la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2 en individuos voluntarios que ingirieron alcohol [157]. Además, hay varios estudios sobre el efecto del alcohol en miRNAs del cerebro; por ejemplo el miR-155 juega un papel en la inflamación del cerebelo en un modelo de ingesta crónica de alcohol [158]. Por otro lado, se ha descrito que el miR-29a participa en la apoptosis neuronal inducida por etanol, también en el cerebelo [159].

## 2.9. miRNAs CIRCULANTES EN ENFERMEDADES HEPÁTICAS

Los miRNAs pueden ser detectados en todos los fluidos biológicos ya que son altamente estables. En el torrente sanguíneo, esta notable estabilidad de los miRNAs es en parte debido a que pueden circular encapsulados en varios tipos de vesículas extracelulares: exosomas, micropartículas o cuerpos apoptóticos; además de poder circular asociados a complejos ribonucleoprotéicos, generalmente a la proteína Ago2 o a lipoproteínas. Por esta razón, los miRNAs se han considerado como prometedores biomarcadores no invasivos específicos de cada situación fisiopatológica del hígado.

Recientemente, se ha descrito que los niveles plasmáticos del miR-122 y miR-192 correlacionan estrechamente con los niveles de aminotransferasas, con el grado histológico de daño y con la dosis de paracetamol. Además los cambios en estos miRNAs fueron detectados antes incluso de la elevación de las transaminasas hepáticas [160].

Muchos estudios han dedicado sus esfuerzos a desvelar un perfil específico de miRNAs circulantes en las diversas enfermedades hepáticas como el carcinoma hepatocelular, daño hepático por drogas, esteatohepatitis no alcohólica, o las hepatitis víricas [161,162]. La enfermedad hepática por alcohol también ha sido estudiada; en ratones tratados con dieta rica en etanol se observó un aumento de los miR-122 y miR-155 circulantes [163].

Sin embargo, la utilización de los miRNAs como biomarcadores todavía necesita superar grandes obstáculos como la falta de estandarización en el procesamiento de las muestras, almacenaje, aislamiento de los miRNAs y su evaluación. La gran variabilidad de estos procedimientos hace difícil la comparación de resultados entre diferentes estudios. Otro gran reto para la utilización de los miRNAs como biomarcadores es la falta de un control interno para la normalización de la cantidad de miRNAs en la muestra. Actualmente el método más aceptado es la utilización de un miRNA sintético con la secuencia del miR-39a-3p de *Caenorhabditis elegans*, este miRNA se añade a la muestra antes de la extracción del RNA, permitiendo hacer un seguimiento en la eficiencia de la extracción y posteriormente normalizar la cantidad

de los miRNAs. Para el futuro es necesario establecer unas directrices estándar que aumente la reproducibilidad de estos estudios.

## **2.10. LOS miRNAs COMO DIANAS TERAPÉUTICAS**

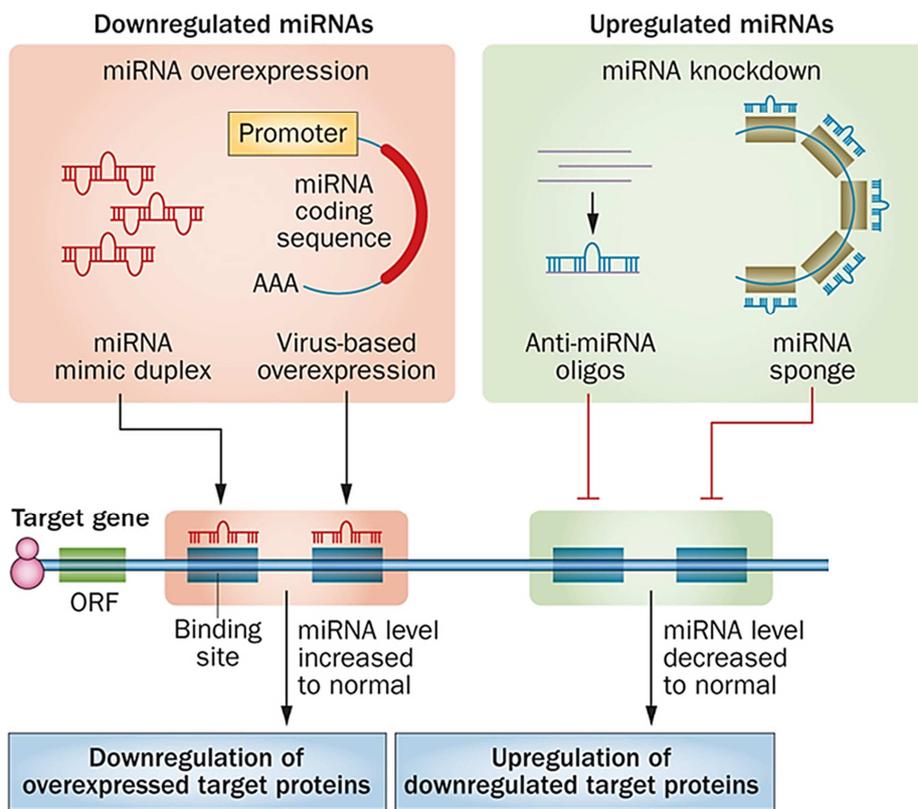
Los miRNAs están frecuentemente desregulados en las enfermedades humanas lo que sugiere que pueden ser dianas terapéuticas para el tratamiento de dichas enfermedades. Los miRNAs poseen varias características que los convierten en prometedores candidatos como el pequeño tamaño de las secuencias maduras de los miRNAs, su secuencia bien conocida y además habitualmente muy conservada entre especies.

Las estrategias farmacológicas desarrolladas hasta el momento tienen como objetivo modular la expresión de los miRNAs para restaurar los niveles de expresión fisiológicos, consiguiendo así restaurar su función y recuperando una correcta regulación de sus genes diana. Para ello, se han desarrollado moléculas sintéticas que aumentan o disminuyen los niveles de miRNAs. Algunos de los estudios de pérdida o ganancia de función de miRNAs en modelos animales han mostrado algunos resultados prometedores [118,164,165].

La primera aproximación es el restablecimiento de la función del miRNA con moléculas sintéticas de doble cadena denominados *mimics*, ya que mimetizan el miRNA. Esta molécula de doble cadena se compone de: la cadena de interés que dará lugar al miRNA maduro y la cadena pasajera que es menos estable. La cadena pasajera suele modificarse químicamente para aumentar la estabilidad y la captación celular del *mimic*. Por otro lado, se ha desarrollado diferentes vectores virales (lentivirus, adenovirus o virus asociados a adenovirus) que aseguran la llegada del *mimic* al tejido o la célula diana y evitan efectos secundarios en otros órganos. Además estos vectores pueden expresar el miRNA de forma continuada permitiendo una mejor restauración de la función del miRNA [118,166,167].

La segunda aproximación es la inhibición de la función del miRNA usando oligonucleótidos de secuencia complementaria denominados *antimiR*. Estos

oligonucleótidos también son químicamente modificados para aumentar la afinidad, bioestabilidad y las características farmacocinéticas. Existe una gran cantidad de cambios químicos posibles, como cambiar el puente fosfodiéster por un puente fosforotiato; o modificar el ácido nucleico cerrando el anillo (*LNA*, abreviatura del inglés *Locked Nucleic Acid*) [168]. Otra estrategia para bloquear los miRNAs es la construcción de “miRNA esponja” que son estructuras que contienen múltiples sitios de unión en tándem al miRNA de interés [169].



**Ilustración 16. Estrategias de regulación de los miRNA.** Imagen adaptada de Luo y Chang, *Nat.Rev. Cardiology*, 2015.

El desarrollo de estas moléculas ha hecho que los laboratorios e industrias farmacéuticas estén poniendo grandes esfuerzos en su desarrollo como nuevas compuestos terapéuticos. Entre los años 2000 y 2010 ha habido un gran aumento en el número de patentes relacionadas con aplicaciones de los miRNAs, lo cual refleja la cantidad de estudios que se llevan a cabo para el desarrollo de este campo. Además

algunos de estos compuestos para la regulación de los miRNA están ya testándose en ensayos clínicos.

**Tabla 2. Terapias con miRNAs en desarrollo**

COMPAÑÍA	MIRNA DIANA	EFFECTO	ENFERMEDAD	ESTADO
<b>REGULUS THERAPAUTICS</b>	miR-122	AntimiR	Hepatitis por virus C	Estudios preclínicos
	miR-221	AntimiR	Carcinoma hepatocelular	Estudios preclínicos
<b>SANTARIS PHARMA</b>	miR-122	AntimiR	Hepatitis por virus C	Fase IIA
<b>MIRNAS THERAPEUTICS</b>	miR-34	Mimic	Cáncer de hígado primario	Fase I
	miR-155	AntimiR	Neoplasias hematológicas	Estudios preclínicos completados

Una de las terapias con reguladores de miRNAs más desarrollada está dentro del campo de la hepatología, concretamente en el tratamiento de la hepatitis por virus C mediante la inhibición del miR-122. Este miRNA está implicado en la propagación del virus de la hepatitis C uniéndose a la región 5'-UTR del genoma viral, protegiéndolo de la degradación de las nucleasas [121]. *Miravirsen* es un inhibidor del miR-122 lo cual repercute en la replicación del virus en los hepatocitos y provoca una disminución de la carga viral en los pacientes. Este medicamento se encuentra en desarrollo en 2 compañías y está actualmente en fase IIA [170].

Todas estas evidencias demuestran la prometedora carrera de los miRNAs como nuevas dianas terapéuticas. Sin embargo, se han de tener en cuenta ciertas características de los miRNAs como la capacidad de un único miRNA para inhibir la traducción de varios genes o la variación de dicha inhibición según el contexto celular. Estas características hacen que los miRNAs que sean compuestos terapéuticos con un riesgo de producir efectos inespecíficos. Por ello, entender la biología de los miRNAs y su papel en el contexto de cada enfermedad necesita mayores esfuerzos.

En esta tesis doctoral hemos identificado los miRNAs desregulados en la HA para desvelar aquellos miRNAs con potencial como dianas terapéuticas. Para ello hemos identificado un perfil de miRNAs involucrados en la HA y hemos analizado su papel dentro de la fisiopatología de la enfermedad.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



## **HIPÓTESIS**

Los microRNAs han demostrado ser importantes reguladores de la expresión génica y estar implicados en diversos procesos celulares y en diversas enfermedades. Los microRNAs se han observado durante la homeostasis del hígado así como desregulados en procesos fisiopatológicos hepáticos. Nuestra hipótesis es que los microRNAs están implicados en la regulación del daño del hígado y en la fisiopatología de las enfermedades hepáticas como la hepatitis alcohólica, regulando genes que participan en vías clave de la enfermedad. Asimismo creemos que esta desregulación tiene un impacto importante en la progresión de la enfermedad. Además, el papel central de los microRNAs en la fisiopatología de la enfermedad hepática los sitúa como dianas terapéuticas con un gran potencial para el tratamiento.

## **OBJETIVOS**

El objetivo principal de esta tesis es identificar los microRNAs más relevantes implicados en la fisiopatología de la hepatitis alcohólica y evaluar su función.

Objetivos específicos:

**PRIMER ESTUDIO: Obtener el perfil de microRNAs expresado en la Hepatitis Alcohólica y evaluar su función.**

- Obtener el perfil de microRNAs desregulados en el hígado de pacientes con HA
- Determinar los microRNAs específicos de la HA
- Integrar el perfil de microRNAs con el transcriptoma de pacientes con HA
- Estudiar el papel del miR-182 en la fisiopatología de la HA

**SEGUNDO ESTUDIO: Determinar el papel del microRNA-155 en el daño agudo y agudo sobre crónico hepático.**

- Determinar la expresión hepática del miR-155 y en células inflamatorias circulantes
- Determinar la función del miR-155 en el daño hepático agudo

# MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 1. PACIENTES

### 1.1. Pacientes de los que se obtuvo biopsia hepática

Las muestras de pacientes con HA utilizadas a lo largo de este estudio fueron seleccionadas de una cohorte de pacientes consecutivos con características clínicas, analíticas e histológicas de HA, ingresados en la Unidad de Hígado del Hospital Clínic de Barcelona entre julio de 2009 y enero de 2014. Se obtuvo la aprobación para la obtención de muestra de todos los pacientes, a través de un consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Clínica Hospitalaria de Barcelona. 48 muestras de biopsias hepáticas de pacientes con HA se seleccionaron en base a la disponibilidad de RNA total y su calidad, dichas muestras de RNA se utilizaron para realizar un array de miRNAs y la posterior validación de la expresión hepática de los miRNAs. Los parámetros clínicos y bioquímicos de los pacientes con HA incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 3, no existiendo diferencias entre el grupo de pacientes utilizados para la obtención del array y el grupo utilizado para la validación de los resultados [cohorte de array de miRNAs (n=13) y cohorte de validación (n=35)].

Los criterios de inclusión de pacientes con HA fueron: consumo excesivo de alcohol (>60 g/día) antes del ingreso, niveles elevados de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT),  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa (GGT), bilirrubina y diagnóstico histológico de HA. Las muestras hepáticas de los pacientes se obtuvieron mediante biopsia transyugular al ingreso. Por otro lado, los criterios de exclusión incluyeron la presencia de carcinoma hepatocelular u otras potenciales causas de enfermedad hepática aparte del consumo de alcohol. La HA severa se definió por un valor de Maddrey > 32 y/o una puntuación ABIC  $\geq$  6,71 al ingreso [56]. Los pacientes con HA grave fueron tratados con prednisona por vía oral con 30 mg/día durante 4 semanas seguido de un período de descanso de 2 semanas. Durante la hospitalización, los pacientes fueron tratados de acuerdo con las actuales directrices internacionales y locales. Todos los pacientes recibieron ayuda tanto nutricional como psicológica para lograr la abstinencia del alcohol.

**Tabla 3. Comparación de las características demográficas, clínicas y hemodinámicas entre los pacientes de la cohorte utilizada para el array y la cohorte utilizada para la validación.**

Características	Cohorte del Array	Cohorte de validación	Valor p
	(n=13)	(n=35)	
	Mediana (25-75 IQR)	Mediana (25-75 IQR)	
Edad (años)	54 (41-56)	52 (45-55)	ns
Hombres, nº (%)	8 (62)	27 (73)	ns
Ingesta de alcohol (g/día)	100 (90-100)	100 (85-175)	ns
Corticosteroides, nº (%)	5 (39)	18 (49)	ns
Cirrosis, nº (%)	9 (69)	30 (81)	ns
Hemoglobina (g/dL)	11 (8-12)	11 (10-13)	ns
Recuento leucocitario ( $\times 10^9/L$ )	8,7 (6,4-11,9)	8,0 (5,8-12,2)	ns
Recuento de plaqueta ( $\times 10^9/L$ )	90 (45-193)	118 (76-197)	ns
AST (U/L)	109 (61-193)	125 (70-185)	ns
ALT (U/L)	45 (32-78)	44 (23-59)	ns
Sodio sérico (mM/L)	133 (129-136)	135 (131-139)	ns
Albumina sérica (g/dL)	2,6 (2,4-2,9)	2,7 (2,3-3,2)	ns
Creatinina sérica (mg/dL)	0,6 (0,6-1,0)	0,8 (0,60-1,0)	ns
Bilirrubina sérica (mg/dL)	11 (5-21)	6 (2-20)	ns
Ratio Internacional Normalizado (INR)	1,6 (1,3-2,2)	1,5 (1,3-1,7)	ns
Gradiente de presión venosa hepática (mmHg)	19 (15-25)	19 (13-21)	ns
<b>Puntuación de severidad de la HA en la admisión</b>			
Puntuación MELD	22 (16-26)	19 (13-24)	ns
Puntuación ABIC	7,9 (6,3-8,8)	7,3 (6,7-8,3)	ns

<b>Complicaciones durante la hospitalización</b>			
Daño renal agudo <sup>1</sup> n° (%)	3 (23)	14 (38)	ns
Infección n° (%)	7 (53)	12 (32)	ns

<sup>1</sup> El daño renal agudo se definió como una reducción abrupta (en 48 horas) de la función renal definida actualmente como un aumento absoluto de la creatinina sérica mayor o igual a 0,3mg/dl ( $\geq 26,4$   $\mu\text{mol/l}$ ), un aumento porcentual de la creatinina sérica de más o igual al 50% (1,5 veces respecto al valor basal) basado en los criterios de la red AKIN (red de lesión renal aguda)

También fueron incluidos en el estudio otros grupos de pacientes con diferentes etiologías de enfermedad hepática:

- ❖ Pacientes con cirrosis inducida por alcohol (denominados *ALD-CH* por sus siglas en inglés *Alcoholic Liver Diseases-induced Cirrhosis*) que no presentasen ninguna característica de HA en la biopsia hepática.
- ❖ Pacientes con cirrosis inducida por el virus de la hepatitis C del genotipo 1 (denominados *HCV-CH* por sus siglas en inglés *Hepatitis C Virus-induced Cirrhosis*) que no hubiesen tomado ningún tratamiento antiviral previo.
- ❖ Pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (*NASH*, de sus siglas en inglés *Non-Alcoholic Steatohepatitis*) con o sin cirrosis. Los pacientes con *NASH* fueron diagnosticados a través del examen de la biopsia hepática teniendo en cuenta los criterios de Brunt [171] y/o el sistema de puntuación Kleiner [172].
- ❖ Pacientes con hepatitis autoinmune (HAI) que fueron confirmados mediante biopsia hepática. Los pacientes incluidos en este grupo presentaron un brote de hepatitis autoinmune en el debut de la enfermedad y no llevaban tratamiento inmunosupresor en el momento de la biopsia. Las características de estos pacientes se describen en la Tabla 4.

Como muestras controles incluimos un grupo de hígados normales obtenidos de donantes cadáver óptimos o a partir de resección de metástasis hepática de pacientes con cáncer de colon. Todos los individuos controles tenían niveles normales de transaminasas séricas e histología normal.

**Tabla 4. Características demográficas, clínicas y bioquímicas de los pacientes con HAI (n=16) de los que se obtuvo biopsia hepática.**

Características	Mediana ± Desviación Estándar (DE)
Edad (años)	50 ± 15
Hombres, nº (%)	7 (47%)
Presencia de ascitis, nº (%)	3 (20%)
AST (U/L)	414 ± 573
ALT (U/L)	487 ± 601
Bilirrubina sérica (mg/dL)	6,5 ± 7,5
Albúmina sérica (g/L)	35 ± 6
INR	1,5 ± 0,3
Recuento de plaquetas (10 <sup>9</sup> /L)	145 ± 45
Recuento de leucocitos (10 <sup>9</sup> /L)	6200 ± 1800
Proteína C-reactiva (mg/dL)	1,3 ± 1,3
Puntuación Child-Pugh	7 ± 2
Fosfatasa Alcalina	242 ± 272
Gamma Glutamil Transpeptidasa (GGT)	221 ± 208

## 1.2. Pacientes de los que se obtuvieron células mononucleadas periféricas

Las células mononucleadas circulantes (PBMC, abreviatura del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) se obtuvieron a partir de sangre periférica mediante gradiente de densidad gracias a los tubos *BD Vacutainer® CPT™ Mononuclear Cell Preparation Tube* (BD) siguiendo las instrucciones del fabricante, una vez obtenidas las células se conservaron en *Trizol* para la posterior extracción de RNA.

Los pacientes de los cuales se obtuvieron PBMCs fueron pacientes con HA (n=16) escogidos aleatoriamente de entre los pacientes de la cohorte de confirmación de HA cuyas características se han descrito anteriormente en la Tabla 3. A su vez se incluyeron pacientes con HAI (n=7) con grados de fibrosis entre F2-F4, además se encontraban en tratamiento inmunosupresor en el momento de la extracción con Azatioprina (media de dosis de tratamiento de 53,6 mg/día) y Prednisona (media de dosis de tratamiento de 5 mg/día), con dosis estables de tratamiento inmunosupresor en los meses previos y sin signos clínicos ni analíticos de actividad de la HAI. Las características de estos pacientes se detallan en la Tabla 5. Finalmente se incluyeron pacientes con cirrosis hepática (n=10) cuyas características clínicas están descritas en la Tabla 6.

**Tabla 5. Características demográficas, clínicas y bioquímicas de los pacientes con HAI de los cuales se obtuvieron PBMCs.**

Características	Mediana $\pm$ DE
Edad (años)	60 $\pm$ 15
Hombres, nº (%)	5 (55,5%)
Presencia de ascitis, nº (%)	2 (22,2%)
AST (U/L)	53 $\pm$ 51
ALT (U/L)	44 $\pm$ 46
Bilirrubina sérica (mg/dL)	0,9 $\pm$ 0,7
Albúmina sérica (g/L)	40 $\pm$ 2,6
INR	1,1 $\pm$ 0,1
Recuento de plaquetas ( $10^9$ /L)	220 $\pm$ 110
Recuento de leucocitos ( $10^9$ /L)	6,84 $\pm$ 2,5
Proteína C Reactiva (mg/dL)	0,28 $\pm$ 0,26
Puntuación Child-Pugh	5,3 $\pm$ 1

Fosfatasa Alcalina	147 ± 143
GGT	107 ± 103

**Tabla 6. Características demográficas, clínicas y bioquímicas de los pacientes con cirrosis hepática de los que se obtuvieron PBMCs.**

Características	Mediana ± DE
Edad (años)	51 ± 15
Hombres, nº (%)	9 (90%)
Presencia de ascitis, nº (%)	9 (90%)
AST (U/L)	218 ± 296
ALT (U/L)	109 ± 121
Bilirrubina sérica (mg/dL)	10,4 ± 11
Albúmina sérica (g/L)	27 ± 6
INR	1,9 ± 0,3
Recuento de plaquetas (10 <sup>9</sup> /L)	111 ± 93
Recuento de leucocitos (10 <sup>9</sup> /L)	8,9 ± 5,3
Proteína C-reactiva (mg/dL)	4,7 ± 4
Puntuación Child-Pugh	10 ± 2
Fosfatasa Alcalina	137 ± 85
GGT	258 ± 445

## 2. MODELOS ANIMALES

A lo largo de nuestros estudios se utilizaron ratones como modelos animales de enfermedad hepática. Las cepas utilizadas durante este estudio fueron: C57BL/6 y Balb/c. Además para el segundo estudio se ha utilizado la cepa Mir155tm1.1Rsky cuyos animales no poseen en gen BIC dentro del cual se aloja el miR-155, siendo por tanto ratones deficientes para el miR-155. Esta cepa, obtenida del repositorio *Jakson Laboratory* (EE.UU), tiene como base genética el genotipo de la cepa C57BL/6.

Además para el trasplante de médula ósea se utilizó una cepa con un fenotipo del marcador CD45 diferente al presente en los ratones C57BL/6 estándar. Mientras que los animales normalmente poseen el CD45.2, estos animales poseían la variante CD45.1 lo que no permitió monitorizar la repoblación de la médula ósea. Los animales son de la cepa denominada B6.SJL-PtprcaPepcb/BoyCrl, adquirida del repositorio de Laboratorios *Charles River* (Francia).

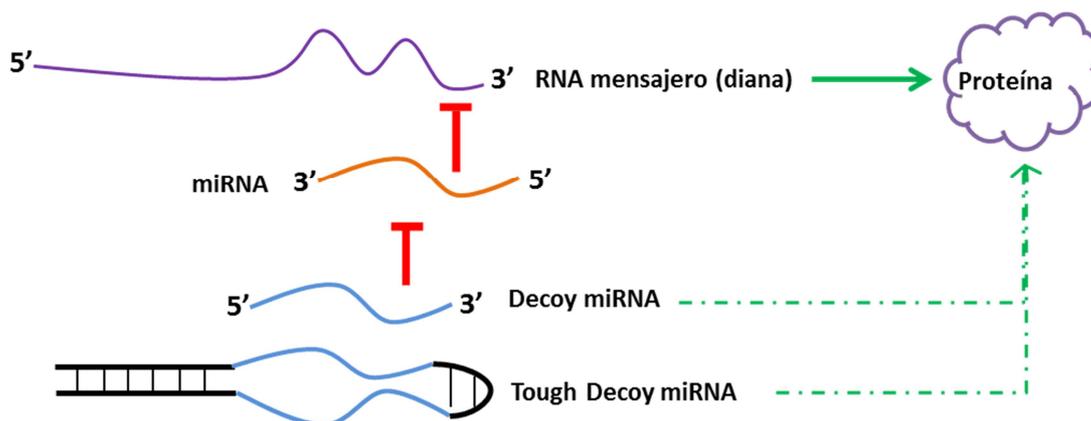
Todos los modelos animales se desarrollaron de acuerdo a la regulación de la Unión Europea y fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Barcelona.

La hepatitis alcohólica es una enfermedad compleja compuesta por varias características, principalmente fibrosis, el infiltrado inflamatorio dominado por neutrófilos y la reacción ductular. Hasta el momento no se ha conseguido diseñar un modelo animal en el que confluyan todas estas características, por lo que a lo largo de este estudio se han utilizado varios modelos animales los cuales reproducen algunas características de la HA.

### 2.1. Inhibición *in vivo* del miR-182

La inhibición del miR-182 se realizó con un sistema *decoy*. La palabra inglesa *decoy* significa señuelo, ya que este sistema permite la “captura” del miRNA. Esta molécula contiene una o varias secuencias complementarias, y por tanto de unión al miRNA, actuando como una esponja que lo atrapa y bloquea su función. Los sistemas *decoy* se han desarrollado durante los últimos 10 años como un método altamente efectivo de

inhibición de miRNAs [169,173]. Entre otras estrategias, se han desarrollado unas estructuras que contienen secuencias de unión a miRNA con un bucle interno, capaces de capturar los miRNAs en complejos estables denominado decoys resistentes (TuD, por sus siglas en inglés *Tough Decoy*). Cada decoy es capaz de inhibir específicamente un miRNA, dependiendo de la secuencia de unión.



**Ilustración 16. Representación de sistemas *decoy* y su función.** Los sistemas *decoy* al capturar, por complementariedad de secuencia, al miRNA evitan su función y restablecen indirectamente la expresión de los genes diana del miRNA.

El sistema decoy para inhibir el miR-182 y su decoy control (contra miR-1306, un miRNA bajamente expresado en hígado) fueron desarrollados por el laboratorio del Dr. Brown [174]. Los sistemas Decoy-control o Decoy-182 se clonaron en vectores plasmídicos y fueron introducidos en *Escherichia coli*; una alícuota de cada cepa fue enviada a nuestro laboratorio. Las cepas *E.coli* conteniendo los plásmidos se cultivaron en medio Luria Broth durante la noche a 37°C para el crecimiento de la colonia bacteriana hasta su fase exponencial. Posteriormente, el cultivo se utilizó para la purificación de los vectores plasmídicos usando *PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para administrar a los ratones los sistemas *decoy* purificados se utilizó el transfectante *Jet PEI* (PolyPlus, Illkirch, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Ratones machos de 8 semanas de edad CD57BL/6 se inyectaron intraperitonealmente con 50

$\mu\text{g}$  de plásmido cada 48 horas durante 1 semana, con un total de 4 inyecciones. 24 horas después de la primera inyección los animales comenzaron a ser alimentados con dieta 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC) al 0,1% (la dieta DDC se detalla en el apartado 2.3.2) o dieta estándar Chow. Los animales se sacrificaron después de 7 días de dieta y se recogió sangre e hígado.

## **2.2. Modelos de daño agudo**

### **2.2.1. Daño por Concanavalina A**

El modelo de daño por concanavalina A (ConA) es un modelo con el cual se puede estudiar un daño hepático agudo fulminante, que por sus características inflamatorias puede considerarse como un modelo aproximado de hepatitis autoinmune. Por esta razón este modelo animal fue utilizado más ampliamente en el segundo estudio de esta tesis.

Para este modelo se utilizaron hembras C57BL/6 de entre 8 y 12 semanas de edad de genotipo silvestre comúnmente denominado con la expresión en inglés *Wild Type* (WT) y genotipo deficiente de miR-155 (miR-155<sup>-/-</sup>). Los animales fueron tratados con una única inyección de ConA por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola. La dosis de ConA inyectada fue de 10mg/Kg utilizando como vehículo suero fisiológico (NaCl al 0,9%). Los animales controles fueron tratados con suero fisiológico únicamente. 18 horas después de la inyección los animales fueron sacrificados, se recogió sangre e hígado.

### **2.2.2. Trasplante de médula ósea**

Este procedimiento se llevó a cabo con ratones WT con fenotipo CD45.1 en las células de la médula ósea y ratones KO de miR-155 (miR-155<sup>-/-</sup>) con fenotipo CD45.2 en las células de la médula ósea.

Como donantes de médula se utilizaron hembras de ambos genotipos (WT-CD45.1 y miR-155<sup>-/-</sup>-CD45.2) con 6 semanas de edad. Los donantes de médula ósea se

sacrificaron, mediante dislocación cervical, el mismo día del trasplante. Seguidamente, se extrajeron los fémures, tibias y crestas ilíacas.

Procesamiento de los huesos para la obtención de la médula ósea:

- Poner en un mortero 6 ml de medio IMDM con suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés *Fetal Bovin Serum*) al 20%, todo estéril.
- Poner los huesos en una placa de Petri y limpiarlos de tejido muscular.
- Aplastarlos con la mano de mortero hasta que los huesos queden bien desmenuzados y blancos.
- Recoger el medio y pasarlo por un filtro de 70  $\mu\text{m}$ .
- Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm a 4°C
- Resuspender las células en PBS estéril
- Añadir 10 Unidades Internacionales de DNasa por cada millón de células
- Incubar 10 minutos a 37°C
- Añadir 40 ml de PBS para lavar la DNasa
- Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm
- Resuspender en PBS, determinar el volumen necesario para que queden las células en una concentración de 10 millones por cada 0,1 ml de PBS.
- Mantener las células en hielo hasta unos minutos antes del trasplante.

En todo momento se mantuvieron separadas las células *WT* de las células *miR-155<sup>-/-</sup>*.

Todos los receptores fueron hembras *miR-155<sup>-/-</sup>* de entre 7 a 8 semanas de edad. Para permitir la repoblación de la médula ósea con células mieloides ajenas, los receptores fueron previamente inmunodeprimidos. La inmunodepleción se realizó mediante tratamiento con *Busulfán*, una droga antineoplásica, a una dosis de 25mg/Kg peso, durante 3 días. En el 4º día se llevó a cabo el trasplante de médula ósea.

Los receptores, todos *miR-155<sup>-/-</sup>*, se dividieron en 2 grupos, a la mitad de los animales se los trasplantó con médula de su propio genotipo (*miR-155<sup>-/-</sup>MO- miR-155<sup>-/-</sup>*) y a la otra mitad se le trasplantó médula de genotipo *WT*, es decir médula con expresión del *miR-155* (*miR-155<sup>-/-</sup>MO-WT*). Cada receptor recibió 20 millones de células de médula

ósea. Las células fueron inyectadas por vía intravenosa con una aguja de calibre 27G para no dañar las células mieloides.

Para determinar el quimerismo, 3 semanas después del trasplante se recolectaron 100 microlitros de sangre periférica y se determinó el porcentaje de células CD45.1 o CD45.2 como se explica en el apartado 5.2.

Ocho semanas después del trasplante los animales fueron subdivididos en dos grupos, y fueron tratados con ConA o vehículo de la misma manera que se ha descrito en el modelo de ConA.

### **2.2.3. Intoxicación por paracetamol**

La intoxicación por paracetamol es un daño agudo fulminante que tiene una alta incidencia entre la población. Para simular una intoxicación por paracetamol se utilizaron ratones machos C57BL/6 de entre 8 y 12 semanas, con fenotipo *WT* o *KO* para miR-155. Los ratones fueron privados de comida durante la noche pero con libre acceso al agua. El paracetamol fue resuspendido en suero fisiológico a 35-40°C. Seguidamente los animales recibieron una inyección intraperitoneal con paracetamol a una dosis de 500mg/Kg peso; los animales control fueron tratados con suero salino únicamente. 24 horas después de la inyección los animales fueron sacrificados y se recolectaron sangre e hígado.

## **2.3. Modelos de daño crónico**

### **2.3.1. Daño por tetracloruro de carbono**

Para estudiar un daño hepático crónico se utilizó un modelo de fibrosis hepática bien establecido, mediante la administración de tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ; Sigma-Aldrich). Este tóxico reproduce la formación del tejido fibrótico como ocurre en enfermedades hepáticas crónicas como la cirrosis o la hepatitis alcohólica.

El  $\text{CCl}_4$  se preparó haciendo una dilución 1:4 con aceite de maíz. La dosis que se inyectó fue de 0,5 mg/Kg. Se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6, de 8 a 12 semanas de edad. Los ratones fueron tratados con  $\text{CCl}_4$  mediante inyecciones intraperitoneales que se realizaron cada 48 horas durante dos semanas, con un total de 7 inyecciones. Los animales controles fueron inyectados con el vehículo (aceite de maíz) únicamente.

### **2.3.2. Dieta DDC**

La dieta con 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC) es una dieta que ha sido descrita por causar reacción ductular, fibrosis periductular, un fenotipo reactivo de los colangiocitos y obstrucción de los conductos biliares llevando a una billirubinostasis [175]. En nuestro grupo se ha utilizado ampliamente ya que estas características de la dieta representan algunas de las características más importantes de la hepatitis alcohólica.

En el modelo de dieta DDC ratones machos C57/BL6 fueron alimentados con DDC al 0,1% durante 1, 3, 4 o 6 semanas, en experimentos independientes. Los animales controles fueron alimentados con la dieta Chow estándar. Tras los días establecidos los animales fueron sacrificados y se recogió sangre e hígado.

### **2.3.3. Dieta Lieber-DeCarli modificada**

Para observar los efectos de una administración crónica de etanol sumado a los efectos de la dieta DDC, se modificó la dieta Lieber-DeCarli (LDC). Se dispusieron 4 grupos de ratones machos de entre 8 y 12 semanas de edad, de la siguiente forma:

- Animales alimentados con dieta líquida LDC control, sin complementar.
- Animales alimentados con dieta control, hasta la cuarta semana donde se añadió a su dieta un 0,05% de DDC.
- Animales alimentados con dieta LDC complementada con dosis crecientes de etanol. Cada dos días se aumentaba el porcentaje de etanol en la dieta hasta llegar al 4% (v/v), este porcentaje se mantuvo durante 3 semanas más.

- Animales alimentados con dieta LDC con etanol, reproduciendo la pauta del grupo anterior, pero además en la cuarta semana se les añadió a la dieta DDC al 0,05%.

Al finalizar la cuarta semana todos los animales fueron sacrificados y se recogió sangre e hígado para su posterior análisis.

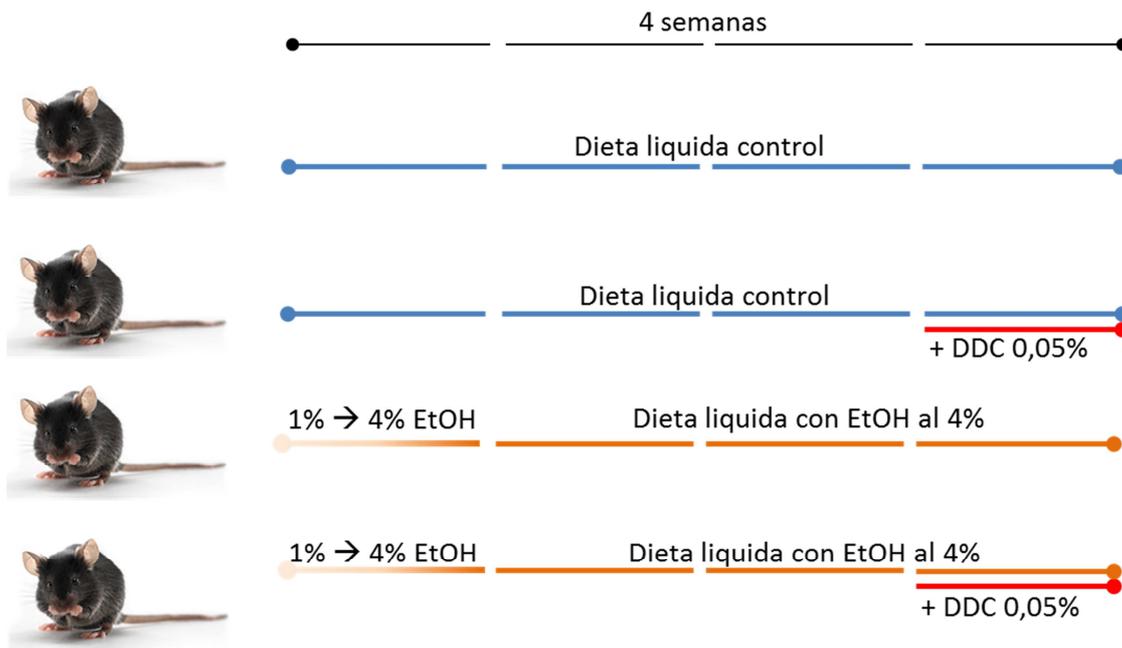


Ilustración 17. Esquema de la dieta Lieber-DeCarli modificada.

## 2.4. Modelo de daño agudo sobre crónico

### 2.4.1. Modelo de CCl<sub>4</sub> más etanol

Este modelo fue el único que se llevó a cabo en ratones de la cepa Balb/c. Se dispusieron 3 grupos: grupo control de animales tratados con vehículo (agua); grupo de animales con dosis aguda de etanol y un último grupo de animales con tratamiento semi-crónico con CCl<sub>4</sub> y dosis aguda de etanol. Todos los animales se mantuvieron en ayunas durante 8 horas con libre acceso al agua, seguidamente se le administró etanol 50% mediante sonda intragástrica, con una dosis final de 5mg/kg peso.

El grupo de animales con tratamiento agudo sobre crónico fueron inyectados intraperitonealmente con  $\text{CCl}_4$  (diluido 1:4 en aceite) o vehículo (aceite) cada 48 horas. La dosis de  $\text{CCl}_4$  fue de 0,5 ml/kg. Dos días después de la última inyección de  $\text{CCl}_4$ , los ratones se mantuvieron en ayunas durante 8 horas con acceso libre al agua, y luego se les administró una única dosis de etanol o agua. Fueron sacrificados 8 h después de la infusión intragástrica.

#### **2.4.1. Modelo de $\text{CCl}_4$ más lipopolisacárido**

Este modelo se utiliza para mimetizar los efectos de la fibrosis hepática más la alta endotoxemia que se produce en los pacientes con enfermedad alcohólica crónica.

Para este modelo se utilizaron ratones machos C57BL6/J de entre 8 y 12 semanas. Los ratones fueron tratados con  $\text{CCl}_4$  mediante inyecciones intraperitoneales cada 48 horas con un total de 7 inyecciones (de la misma forma que en modelo crónico). Tras 48 horas de la última inyección de  $\text{CCl}_4$ , se trataron los animales con lipopolisacárido (LPS) a una dosis de 10 mg/Kg mediante una inyección intravenosa. Los animales fueron sacrificados trascurridas 4 horas desde la inyección con LPS.

### **3. AISLAMIENTO DE CELÚLAS NO PARENQUIMALES HEPÁTICAS**

#### **3.1. Aislamiento mediante gradiente de densidad**

En el transcurso del segundo estudio se aislaron las células no parenquimales de hígados de animales tratados con ConA, tanto *WT* como *miR-155<sup>-/-</sup>*. Seguidamente se estudió el infiltrado inflamatorio, a través del aislamiento por gradiente de densidad y posterior análisis mediante citometría de flujo.

Procesamiento del hígado para la obtención de células inflamatorias mononucleadas:

1. Homogeneizar el hígado, a través de un filtro celular con un poro de 70 $\mu\text{m}$ , con PBS estéril.

2. Centrifugar a 60g durante 2 minutos para depositar los hepatocitos y recoger únicamente el sobrenadante.
3. Centrifugar el sobrenadante (400g, 5 minutos) y resuspender las células obtenidas en 8ml de PBS.
4. Depositar la solución celular sobre 4 ml del reactivo *Ficoll* (GE Healthcare) para crear un gradiente de densidad, centrifugar a 800g durante 20 minutos y sin freno.
5. En la interfase de ambos líquidos queda un anillo de células que corresponde a las células no parenquimales mononucleadas; recolectar con pipeta Pasteur, lavar con PBS y centrifugar a 400g durante 10 minutos.

Las células fueron posteriormente analizadas por citometría de flujo como se describe en el apartado 4.

### **3.2. Aislamiento mediante perfusión retrógrada más gradiente de densidad**

Otra aproximación para la obtención de células no parenquimales hepáticas es hacer una perfusión retrógrada en 3 pasos. Esta técnica es más compleja pero menos agresiva con las células aisladas.

#### Protocolo de perfusión retrógrada:

1. Colocar una cánula 24G en la vena cava inferior y comenzar la perfusión con la solución de EGTA.
2. Cortar la vena porta y posteriormente abrir la cavidad abdominal para bloquear mediante un *clamp* quirúrgico la vena supra hepática, de esta manera queda un circuito cerrado.
3. Infundir solución EGTA durante 1-2 minutos a una velocidad de 5ml/minuto.
4. Infundir solución con pronasa (40mg de Proteasa XIV en 50ml) durante 5 minutos a una velocidad de 5ml/minuto.
5. Infundir solución con colagenasa (colagenasa D a 0,09 U/ml) durante 7 minutos a una velocidad de 5ml/minuto.

6. Extraer el hígado del animal y colocar en tubo con solución con colagenasa y pronasa (50mg de proteasa XIV, 40 mg de colagenasa D y DNasa a 10µg/ml), calentar a 37°C en agitación durante 25 minutos.
7. Pasar el hígado digerido a través de un filtro con poro de 70µm.
8. Centrifugar a 50g durante 3 minutos, el pellet contiene los hepatocitos.
9. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y centrifugar a 400g durante 5 minutos a 4°C.

**Tabla 7. Soluciones para la perfusión hepática**

	Solución EGTA	Solución Colagenasa
<b>NaCl</b>	137 mM	137 mM
<b>KCl</b>	5,4 mM	5,4 mM
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O</b>	0,64 mM	0,64 mM
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0,85 mM	0,85 mM
<b>HEPES</b>	1 mM	1 mM
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	4,17 mM	4,17 mM
<b>EGTA</b>	0,5 mM	-
<b>Glucosa</b>	5 mM	-
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	-	3,8 mM

### 3.2.1. Selección mediante gradiente de densidad con Nycodenz

1. Resuspender el pellet de células en 30 ml de GBSS con DNasa (8µg/ml).
2. Añadir 15ml de solución de Nycodenz al 53,3% y mezclar (concentración final del Nycodenz 17,7%).
3. Dividir la solución en 4 tubos y añadir, muy lentamente, 1ml de GBSS.
4. Centrifugar a 1380g durante 15 minutos a 4°C sin freno.
5. Debajo del GBSS se aprecia un anillo que contiene las células no parenquimales hepáticas. Recoger esta banda y centrifugar a 400g durante 5 minutos.

#### 4. CITOMETRÍA DE FLUJO

En el transcurso del segundo estudio se cuantificaron diferentes poblaciones inflamatorias hepáticas mediante citometría de flujo. Los hígado de los animales fueron disgregados y las células no parenquimales se aislaron como está detallado anteriormente.

El protocolo a seguir fue:

- ❖ Las células se resuspendieron en buffer de tinción (PBS con suero bovino fetal al 2% y azida sódica al 0,01%)
- ❖ Se transfirieron 100µl de suspensión celular en tubos de citometría
- ❖ Para la identificación de las diversas poblaciones inflamatorias, se prepararon cocteles de anticuerpos conjugados a fluorocromos:
  - Para la detección de los linfocitos T una fracción celular se incubó con los anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD183 (CXCR3)
  - Para la detección de los linfocitos NKT una fracción celular se incubó con los anticuerpos anti-CD3 y anti-NK1.1
  - Para la detección de monocitos y macrófagos una fracción celular se incubó con los anticuerpos anti-F4/80 y anti-CD11b
- ❖ Todos los tubos se incubaron durante 30 minutos a 4°C en oscuridad
- ❖ Para eliminar el exceso de anticuerpos las células se lavaron con buffer de tinción y se centrifugaron a 1500rpm durante 10 minutos
- ❖ Finalmente las células se resuspendieron en 250µl de buffer de tinción y se introdujeron en un citómetro de flujo *BD FACSCANTO II* (BD Bioscience)
- ❖ Para analizar y cuantificar las diferentes poblaciones se utilizó el software *BD FACSDIVA™* (BD Bioscience)

**Tabla 8. Listado de anticuerpos utilizados para citometría de flujo**

ANTICUERPO	FLOUROCROMO	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
Rat Anti-Mouse CD4	PE-Cy™7	552775	BD Bioscience
Rat Anti-Mouse CD8a	FITC	553030	BD Bioscience

<b>Hamster Anti-Mouse CD183</b>	Brilliant Violet 421	562937	BD Bioscience
<b>Rat Anti-Mouse CD3</b>	Alexa Flour 647	557869	BD Bioscience
<b>Mouse Anti-Mouse NK-1.1</b>	FITC	553164	BD Bioscience
<b>Rat Anti-Mouse F4/80</b>	PE	12-4801-80	e-Bioscience
<b>Rat Anti-Mouse CD11b</b>	Alexa Fluor 647	557686	BD Bioscience

#### 4.1. Clasificación de células activadas por fluorescencia

Durante el segundo estudio quisimos determinar qué poblaciones celulares presentaban una expresión desregulada del miR-155, en presencia de un daño agudo sobre crónico. Para ello, los hígados de los animales tratados con CCl<sub>4</sub> más LPS se sometieron a una perfusión retrógrada y las células no parenquimales se aislaron con Nycodenz, como está detallado en el apartado 3.2. La fracción no parenquimal fue sometida a un tipo especializado de citometría de flujo denominada clasificación de células activadas por fluorescencia (*FACS*, por sus siglas en inglés *Fluorescence-Activated Cell Sorting*). Las poblaciones que se seleccionaron fueron: macrófagos, linfocitos T, neutrófilos y células estrelladas hepáticas (CEH).

##### Separación celular mediante FACS:

- ❖ Las células se resuspendieron en buffer de tinción (PBS con suero bovino fetal al 2% y acida sódica al 0,01%)
- ❖ Se transfirieron a tubos de citometría
- ❖ Para la identificación de las diversas poblaciones inflamatorias, se marcaron con anticuerpos conjugados a fluorocromos:
  - Para la selección de los linfocitos T se marcaron con anti-CD3
  - Para la selección de macrófagos se marcaron con anti-F4/80
  - Para la selección de los neutrófilos se marcaron con anti-Ly6G
  - Para la selección de las CEH se utilizó la auto-fluorescencia que presenta la vitamina A que acumulan estas células, la vitamina A se excita y emite en el ultravioleta.
- ❖ Todos los tubos se incubaron durante 30 minutos a 4°C en oscuridad.

- ❖ Para eliminar el exceso de anticuerpos las células se lavaron con buffer de tinción y se centrifugaron a 1500rpm durante 10 minutos
- ❖ Finalmente las células se resuspendieron en buffer de tinción y se introdujeron en un citómetro de flujo *BD FACSAria III*, capaz de aislar células que emiten en diferentes fluorescencias, lo que permite recoger en diferentes tubos las poblaciones marcadas con fluorocromos diferentes.
- ❖ Tras la selección y recogida de las poblaciones celulares, se centrifugaron y resuspendieron en Trizol para la posterior extracción de RNA y análisis de la expresión del miR-155 por qPCR.

**Tabla 9. Listado de anticuerpos de citometría usados para la separación con *BD FACSAria III***

ANTICUERPO	FLOUROCROMO	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
Rat Anti-Mouse CD3	Alexa Flour 647	557869	BD Bioscience
Rat Anti-Mouse F4/80	PE	12-4801-80	e-Bioscience
Rat Anti-Mouse Ly6G	FITC	551460	BD Bioscience

## 5. DETERMINACIONES EN SANGRE

### 5.1. Determinaciones bioquímicas en suero

Las sangres de los animales se obtuvieron mediante extracción a través de la cava inferior con una aguja con heparina como agente anticoagulante. Seguidamente se centrifugaron a 5000g durante 10 minutos y llevaron al Core del Hospital Clínic para la determinación de las transaminasas hepáticas AST, ALT y de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y FA.

## **5.2. Determinación del quimerismo en sangre total**

Se recogieron 100  $\mu$ l de sangre de la cola; y se hizo una tinción en sangre total con anticuerpos anti-CD45.1 y anti-CD45.2 conjugados a fluorocromos. Tras incubar con los anticuerpos durante 30 minutos a 4°C, en oscuridad, se lisaron los eritrocitos con *Lysing Buffer* (BD PhamLyse) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los porcentajes de cada CD45 se obtuvieron en mediante análisis por citometría de flujo con el citómetro *BD FACSCANTO*.

## **6. DETERMINACIONES EN HÍGADO**

### **6.1. Determinación de ácidos biliares**

En el primer estudio quisimos averiguar si los animales tratados con el Decoy-182 presentaban diferencias en la acumulación de ácidos biliares en el hígado. Para ello se realizó una determinación gracias al *Assay Total Bile Acids Kit* (Cell Biolabs, INC.). Primero se homogeneizaron fragmentos de hígado de 30mg en PBS 1X. A continuación, los ácidos biliares se determinaron siguiendo las instrucciones del fabricante, el cual determina la cantidad de ácidos biliares por colorimetría. La absorbancia de las muestras se determinó en un espectrofotómetro (FLUOStar, BMG Labtech) y se calculó su concentración ( $\mu$ M) a partir de una recta patrón.

### **6.2. Determinación de la actividad de las Caspasas 3 y 7**

En el transcurso del segundo estudio, se realizó un ensayo para determinar la actividad de las caspasas 3 y 7. Los hígados se homogeneizaron con tampón hipotónico (Hepes 25mM pH 7.5,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  5mM, EGTA 1mM y 1  $\mu$ g/ml de inhibidores de proteasas). Se determinó la concentración total de proteína mediante con Bradford (BioRad). A continuación, se cogieron 100  $\mu$ g/ml de proteína de hígado total y se mezcló con el reactivo del Kit *Caspase-GLO 3/7 Assay* (Promega, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 120 minutos de incubación se detectó la luminiscencia en un espectrofotómetro *FLUOStar Optima* (BMG LabTech, Alemania).

## 7. INMUNOHISTOQUÍMICA

Las secciones hepáticas de ratón embebidas en parafina se desparafinaron y se incubaron en *Target Retrieval Solution*, Citrato pH 6 (DAKO, Glostrup, Dinamarca) en una olla a presión durante 20 minutos. Seguidamente, las secciones se incubaron con anticuerpo primario a 4°C durante la noche y posteriormente con anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se incubaron con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Dako) revelando así la unión del anticuerpo primario. Como tinción de contraste se utilizó hematoxilina. Las secciones se visualizaron a 200 aumentos y se seleccionaron aleatoriamente 15 campos diferentes. El área de tinción positiva se cuantificó utilizando el software *Cell^AD* (Olympus Life Science) que calcula el área de tinción. Los resultados se expresaron como % de área teñida positivamente.

**Tabla 10. Listado de anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica**

ANTICUERPOS PRIMARIOS	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
MPO	1:200	Abcam (ab9535)
TROMA-III (Anti-KRT19)	1:100	Anticuerpo cedido por el <i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i>
CD45	1:40	BD Pharmingen (550539)

## 8. CULTIVOS CELULARES

Los cultivos celulares monocapa permiten cultivar y mantener las células de interés en un ambiente controlado y poder modelar la enfermedad *in vitro*.

A lo largo de este estudio se han utilizado células primarias o líneas celulares. Las células primarias se aíslan directamente del órgano en estudio, que en este caso es el hígado. Las células primarias tienen la ventaja de mantener características fisiológicas del órgano, pero tienen el inconveniente de que su vida media fuera del órgano suele ser limitada.

Por otro lado tenemos las líneas celulares, que son células inmortalizadas haciendo posible su cultivo a largo plazo y su expansión. Sin embargo tienen el inconveniente de que su fenotipo está más alejado de la situación fisiológica.

## **8.1. CÉLULAS PRIMARIAS**

Se denominan células primarias a aquellas células que han sido aisladas directamente desde el tejido fresco. El uso de células primarias permite estudiar las células del hígado en un estado más fisiológico, ya que no están alteradas genéticamente. Permite hacer estudios *in vitro* con células que conservan características que tendrían *in vivo*. El problema de las células primarias es su corta vida media y la dificultad de expandirlas *in vitro*.

### **8.1.1. Aislamiento de células de la reacción ductular de ratón**

Se obtuvieron células de la reacción ductular a partir de ratones transgénicos *Hnf1bCreERYFP*, que expresan una proteína reportera amarilla fluorescente (*YFP* por sus siglas en inglés Yellow Fluorescent Protein) después del promotor del gen *Hnf1b*. Anteriormente en nuestro grupo se demostró que *Hnf1b* se expresa en células de la reacción ductular permitiendo la posibilidad de seleccionar estas células gracias a la expresión del gen reportero YFP [14]. Las células de la reacción ductular se obtuvieron mediante perfusión hepática seguida por la selección de las células YFP<sup>+</sup> por citometría de flujo. Esto se llevó a cabo en ratones sanos (n=3) y en ratones tratados con DDC (n=3).

La perfusión de los hígados se hizo mediante perfusión retrógrada *in situ* de tres etapas a través de la vena cava inferior, con un protocolo modificado respecto al apartado 3.2. Las soluciones utilizadas están anteriormente detalladas en la Tabla 7.

El protocolo a seguir fue:

1. Perfusión con solución de EGTA (pH=7,4) a un caudal de 5 ml/min hasta que hígado se ponga pálido.

2. Perfusión con solución de colagenasa (colagenasa A 0,5 g/L Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania; pH=7,4) a una velocidad de 5ml/min durante 11 minutos.
3. El hígado digerido se desmenuza en una placa de Petri con una solución de sal equilibrada de Hanks (HBSS) (Biological Industries) y se filtra a través de un filtro de células de 70  $\mu\text{m}$  (BD Biosciences).
4. El hígado no digerido se vuelve a digerir con solución de colagenasa que contiene 0,5 g/l de colagenasa A, 0,5 g/l de pronasa y 50 mg/l de DNasa I (Roche Diagnostics GmbH), en agitación durante 30 minutos a 37°C.
5. Ambas fracciones se unen y se centrifugan a 100 g durante 2 minutos para descartar los hepatocitos.
6. El sobrenadante conteniendo las células no parenquimales se recogió y se centrifugó a 300 g durante 5 minutos.

El pellet de células se sometió a FACS en un citómetro *FACSAria* (BD Biosciences). La fluorescencia YFP basal se estableció en base a ratones silvestres. Las células muertas fueron excluidas por el kit *Live/Dead Viability Assay* (Life Technologies) y las células positivas para YFP se recogieron en tampón Qiazol (Qiagen, Alemania) para la posterior extracción de RNA.

### **8.1.2. Aislamiento de hepatocitos de ratón**

Los hepatocitos utilizados para los experimentos *in vitro* se aislaron a partir de ratones C57BL/6J sanos mediante una perfusión retrógrada in situ de tres etapas a través de la vena cava inferior, siguiendo el mismo protocolo que en el apartado anterior. Sin embargo, se introdujeron algunos cambios:

- La solución de colagenasa fue modificada utilizando colagenasa IV al 0,04%.
- La segunda solución de colagenasa no contenía pronasa, ya que es una enzima capaz de digerir las membranas hepatocitarias. La segunda solución de colagenasa en este caso estaba compuesta por: 0,5 g/l de colagenasa A y 50 mg/l de DNasa I.

- Tras la digestión final se hizo una centrifugación a 60g durante 2 min, se recogió el pellet que contiene los hepatocitos y se descartó el sobrenadante con la fracción no parenquimal.

Los hepatocitos aislados se sembraron en placas revestidas con colágeno I y se cultivaron en medio E-William suplementado con FBS al 10%, L-glutamina 2mM, penicilina 50 UI/ml, estreptomocina 50µg /ml, insulina 1 µM, HEPES 15 mM y 50µM de β-mercaptoetanol.

### **8.1.3. Aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de bazo de ratón**

Durante el desarrollo del segundo estudio se estudiaron los linfocitos T cooperadores de ratones *WT* y ratones *miR-155<sup>-/-</sup>* frente a un daño hepático agudo por concanavalina. Para ellos se aislaron los linfocitos T ayudadores de uno de los órganos linfoides más importantes, el bazo.

Para la extracción de los linfocitos se utilizaron hembras tratadas con 6,5mg/Kg de ConA, después de 18 horas de la inyección se sacrificaron. El bazo se recogió y disgregó físicamente a través de un filtro para células con tamaño de poro de 70 µm. Los eritrocitos del bazo se lisaron con el *Lysing Buffer* (BD PhamLyse) siguiendo las instrucciones del fabricante. Automáticamente después se procedió al aislamiento de las células CD4<sup>+</sup> mediante el kit *CD4<sup>+</sup> T cell Isolation Kit* (Milteny). Este kit realiza una inmunoselección negativa a través de anticuerpos unidos a esferas magnéticas, seleccionando todas las células no pertenecientes a la población CD4<sup>+</sup>. La suspensión celular unida anticuerpos se hace pasar por una columna emplazada dentro de un imán. Cuando la fracción celular atraviesa la columna todas aquellas células CD4<sup>-</sup> quedan unidas a la columna mediante fuerza electromagnética, mientras las CD4<sup>+</sup> atraviesan la columna y son recogidas.

Una vez aisladas, las células CD4<sup>+</sup> se cultivaron con medio RPMI con 10% de FBS y se estimularon con anti-CD3e a 0,5µg/ml (BD Pharmigen) durante 48 horas. Se recogió sobrenadante a las 24 y 48 horas. Finalmente, las células se recolectaron a las 48 horas para la extracción del RNA con *Rneasy Mini Kit* (Quiagen).

## **8.2. LÍNEAS CELULARES**

### **8.2.1. Colangiocitos humanos**

Para estudiar los colangiocitos se utilizó la línea celular humana de colangiocitos H69, cedida por el Dr. D. Jefferson de la universidad de Tufts en Boston.

Las células H69 fueron cultivadas con un medio complejo compuesto por: Medio de cultivo DMEM/Ham's F-12, FBS, aminoácidos no esenciales, lípidos (mezcla químicamente definida), solución de vitaminas, penicilina/estreptomicina, inhibidor de la tripsina (proveniente de la soja), Insulina-Transferrina-Selenio, extracto de la glándula pituitaria bovina, dexametasona, factor de crecimiento epidérmico, triyodotironina (T3) y forskolina.

### **8.2.2. Macrófagos de ratón**

Los macrófagos se estudiaron gracias a la línea células de ratón RAW 264.7, la cual fue cultivada en un medio DMEM Glutamax suplementado FBS al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%.

## **9. ENSAYOS *IN VITRO***

### **9.1. Transfección con un *mimic* de miR-182**

Para el primer estudio de esta tesis varios tipos celulares se sometieron a una sobreexpresión forzada del miR-182. Las células fueron transfectadas con un *mimic* de miR-182, que consiste en un oligonucleótido con la misma secuencia que el miR-182 pero con modificaciones moleculares que permiten una mayor estabilidad y evitan ser degradados por las RNAsas celulares. El *mimic* estaba además conjugado a la molécula fluorescente Cy3.3 para poder evaluar la correcta entrada del *mimic* dentro de la célula. Como agente transfectante se utilizó el reactivo jetPRIME siguiendo las instrucciones del fabricante (PolyPlus).

La transfección se llevó a cabo con un *mimic* para la secuencia del miR-182 humano o murino dependiendo de la célula a transfectar.

La línea celular de colangiocitos humanos H69 se plantó en placas de cultivo de 6 pocillos a una densidad de  $4 \times 10^5$  células por pocillo. Cuando alcanzaron un 70-80% de confluencia, se añadió medio de cultivo con FBS al 3%. Después de 3 horas, las células se transfectaron con 50nM de cel-miR-39-3p (como *mimic* control) o hsa-miR-182 marcados con Cy3.3 (Exiqon, Vedbaek Denmark). Después de 24 horas, el rendimiento de transfección alcanzó un 60-80%. 48 horas después de la transfección, las células se recogieron con Trizol (Thermo Fisher) para extraer el RNA.

Los hepatocitos de ratón primarios se plantaron en una placa de cultivo de 6 pocillos a una densidad de  $7 \times 10^5$  células por pocillo inmediatamente después de su aislamiento. Después de 4 horas, se añadió medio de cultivo con FBS al 1%. Los hepatocitos fueron transfectados con 50nM de mmu-miR-182 o cel-miR-39-3p, marcado con Cy3.3 (Exiqon). 24 horas después de la transfección se extrajo RNA total con Rneasy Mini Kit (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 se plantaron en una placa de cultivo de 6 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células por pocillo. Cuando alcanzaron una confluencia del 70-80%, se añadió medio con 2% de FBS. Después de 4 horas las células se transfectaron con 50nM de mmu-miR-182 o cel-miR-39-3p marcados con Cy3.3. 48 horas después de la transfección el RNA total se extrajo con Rneasy Mini Kit (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **9.2. Detección de citoquinas en sobrenadante**

Para conocer el estado de activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se determinó la concentración de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF $\alpha$  en los sobrenadantes celulares usando *Milliplex*<sup>®</sup> *MAP Mouse Cytokine/Chemokine Detection Panel* siguiendo las instrucciones del fabricante (EMD Millipore, Alemania). Este kit es un inmunoensayo múltiple basado en la tecnología Luminex<sup>®</sup>.

## 10. EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción de RNA se realizó de 2 formas diferentes:

- Mediante el reactivo *Trizol* (Life Technologies, Carlsbad, CA) para aquellas muestras de las que se quería extraer el RNA total incluyendo RNA mensajero y miRNAs.
- Mediante el kit *miReasy Mini* (Quiagen) para aquellas muestras susceptibles de contener bajas cantidades de RNA, ya que este kit ayuda a mejorar la recuperación de RNA, se utilizó sobre todo para muestras celulares.

### 10.1. Extracción de miRNAs en suero

Se utilizaron muestras de suero de 28 pacientes con HA y 6 individuos controles, de las cuales se extrajo el RNA total enriquecido en RNA pequeños con el kit *miRNeasy Serum/Plasma* (Quiagen). Antes de la extracción se añadió el control de extracción cel-miR-39a-3p, para una normalización posterior ya que en suero no se dispone de un control endógeno. La síntesis de cDNA y qPCR se realizaron usando el *miR-X miRNA First-Strand Synthesis Kit* (Takara Bio Europe/Clontech) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS miRNAs

### 11.1. Array de miRNAs

El RNA total extraído de biopsias hepáticas fue sometido a un control de calidad en el *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Aquellas muestras de alta calidad se hibridaron en un *GeneChip 3.0* para miRNAs (Affymetrix, Santa Clara, CA); incluyendo muestras de 13 paciente con HA, 5 *ALD-CH*, 5 *NASH-CH*, 4 *HCV-CH* y 6 hígados normales.

Las muestras de RNA se marcaron usando el kit *FlashTag Biotin HSR* (Genisphere). El proceso comienza con una breve reacción que añade una cola a los miRNAs, seguido de la unión de una molécula biotinilada. Posteriormente, el RNA marcado con biotina

se hibridó sobre el *Genechip* de miRNAs durante 16 horas a 48°C, posteriormente fue escaneado y analizado al día siguiente gracias a la adición y señal de Streptavidin-PE.

El software *Expression Console* (Affymetrix, Inc.) se utilizó para el resumen de datos, la normalización y el control de calidad. Para la detección de miRNAs diferencialmente expresado, se ajustó un modelo lineal a los datos humanos del array, y utilizando el paquete *limma* se aplicó el método estadístico empírico de Bayes [176]. El ajuste de los valores de  $p$  se realizó mediante la determinación de tasas de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés) utilizando el procedimiento Benjamini-Hochberg. La representación de los resultados se hizo a través del Mapa de Calor (normalmente conocido como *Heatmap*). El *Heatmap* representa, a través de la intensidad de cada color, la proporción normalizada entre cada valor y la expresión media de cada miRNA en todas las muestras. Aquellos miRNAs que presentan un cambio de 1,5 veces o superior y que tengan un valor  $p < 0,05$  se consideraron como diferencialmente expresados.

Los datos del array de microRNAs se han depositado en *NCBI Gene Expression Omnibus* (GEO) con el número de acceso GSE59492.

## 11.2. PCR cuantitativa a tiempo real

La PCR (*polymerase chain reaction*) cuantitativa a tiempo real (qPCR) es una técnica ampliamente utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta productos transcriptómicos.

La cuantificación de miRNAs se realizó utilizando el kit comercial *Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit* según las instrucciones del fabricante (Takara Bio Europe/ Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Francia). Este kit contiene los reactivos para conversión de los miRNAs a DNA de cadena simple (cDNA), y posteriormente para la cuantificación de la expresión por qPCR. Los datos se normalizaron utilizando como control endógeno el pequeño RNA nucleolar U6 (conocido como *snoRNA U6*). Las secuencias de los cebadores o *primers* de miRNAs, ya sean de humanos o de ratones,

se obtuvieron de la base de datos *miRbase*. Los primers diseñados fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies* (IDT, BVBA, Leuven, Bélgica).

**Tabla 11. Secuencias de los primers para la valoración de la expresión de los miRNAs**

MICRORNA	SECUENCIA DEL PRIMER
hsa-miR-182	TTGGCAATGGTAGAACTCACACT
hsa-miR-422a	ACTGGACUUAGGGUCAGAAGGC
hsa-miR-21	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA
hsa- miR-214	TGCCTGTCTACACTTGCTGTGC
hsa-miR-432	TCTTGGAGTAGGTCATTGGGTGG
hsa-miR-155	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT
mmu-miR-182	TTGGCAATGGTAGAACTCACACCG
mmu-miR-155	TTAATGCTAATTGTGATAGGGGT

Los niveles de miRNAs se midieron con un termociclador ABI 7900HT (Life Technologies). Los valores de expresión se calcularon basándose en el método  $\Delta\Delta C_t$ . Los resultados se expresaron como  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

## 12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

### 12.1. Retrotranscripción

Para la cuantificación de la expresión génica se he de convertir el RNA mensajero en cDNA. Para ello se utilizó el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 12.2. PCR cuantitativa

Para estudiar la expresión génica se cuantifica la transcripción del gen a mRNA. La cuantificación de mRNA se logró usando primers y sondas de expresión génica de *Taqman* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Tabla 12. Listado de sondas Taqman para la valoración de la expresión génica.**

GEN	ESPECIE	REFERENCIA
<i>18s</i>	Ratón	Mm03928990_g1
<i>Bcl2</i>	Ratón	Mm00477631_m1
<i>Ccl2</i>	Ratón	Mm00441242_m1
<i>Ccl20</i>	Ratón	Mm01268754_m1
<i>Ccnd1</i>	Ratón	Mm00432359_m1
<i>Cfl1</i>	Ratón	Mm03057591_g1
<i>Cxcl1</i>	Ratón	Mm04207460_m1
<i>Cxcl10</i>	Ratón	Mm00445235_m1
<i>Cxcl11</i>	Ratón	Mm00444662_m1
<i>Cxcl5</i>	Ratón	Mm00436451_g1
<i>Cxcl9</i>	Ratón	Mm00434946_m1
<i>Foxp3</i>	Ratón	Mm00475162_m1
<i>Gapgh</i>	Ratón	Mm99999915_g1
<i>Icam1</i>	Ratón	Mm00516023_m1
<i>Ifn-γ</i>	Ratón	Mm01168134_m1
<i>Il-12A</i>	Ratón	Mm00434169_m1
<i>Il-1β</i>	Ratón	Mm00434228_m1
<i>Il-6</i>	Ratón	Mm00446190_m1
<i>Slc1a1</i>	Ratón	Mm00436590_m1
<i>Tnfa</i>	Ratón	Mm00443258_m1

GEN	ESPECIE	REFERENCIA
<i>18S</i>	Humano	Hs99999901_s1
<i>CCL20</i>	Humano	Hs00355476_m1
<i>CCND1</i>	Humano	Hs00765553_m1
<i>CFL1</i>	Humano	Hs02621564_g1
<i>CXCL1</i>	Humano	Hs00236937_m1
<i>ICAM1</i>	Humano	Hs00164932_m1
<i>IL-8</i>	Humano	Hs00174103_m1
<i>SLC1A1</i>	Humano	Hs00188172_m1

Los niveles de mRNA se midieron un termociclador ABI 7900HT. Los valores de expresión se calcularon basándose en el método  $\Delta\Delta Ct$ . Los resultados se expresaron como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 13. ANÁLISIS COMPUTACIONALES

### 13.1. Análisis de componentes principales

Para comprobar si las muestras pertenecientes a los diferentes grupos de pacientes tenían un perfil de expresión de miRNAs semejante, se realizó un análisis estadístico de síntesis de información denominado análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés, *Principal Component Analysis*). Este análisis escoge aquellas variables (en este caso, la expresión de aquellos miRNAs) que mejor representen la variabilidad de todas las muestras analizadas. Posteriormente este análisis se representó en una escala multidimensional (MDS, las siglas del inglés *Multi Dimensional Analysis*) que es un medio de visualizar el nivel de similitud de los casos individuales de un conjunto de datos.

### 13.2. Integración de los perfiles miRNA-mRNA

Entre todas las muestras analizadas en el array de miRNAs hay 8 muestras de HA y 4 muestras de hígado normal de las cuales se había evaluado previamente su expresión transcriptómica mediante microarray [177]. Ambos perfiles de expresión: miRNA y mRNA, se utilizaron para el análisis integrativo con la herramienta MiRComb.

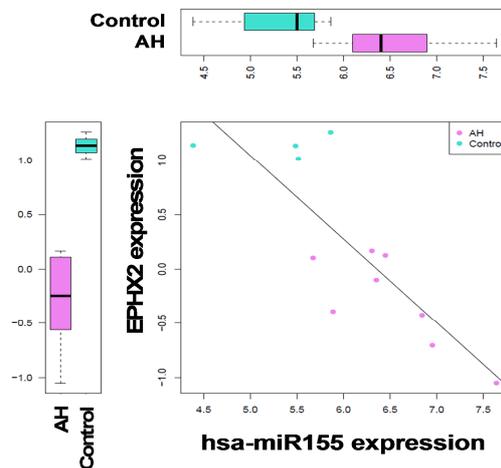
MiRComb es un paquete de R capaz de analizar las interacciones miRNA-mRNA. Este paquete fue desarrollado y publicado por nuestros colaboradores [98]. Según se describe en su estudio este paquete se basa en 3 conceptos ampliamente asumidos:

1. Los miRNAs regulan negativamente la expresión de sus mRNA diana.
2. Las interacciones miRNA-mRNA se basan en hibridaciones y pueden ser predichas mediante aproximaciones informáticas.

3. Los miRNAs y mRNAs que juegan un papel en una enfermedad determinada se encuentran desregulados en dicha enfermedad.

El esquema de trabajo de este paquete es:

- Análisis de la expresión de miRNAs y mRNAs; comprobar aquellos que están desregulados en la enfermedad, en este caso la HA, respecto a los casos control.
- Correlacionar la expresión de los miRNAs y mRNAs desregulados, asignando a todas las posibles parejas un coeficiente de correlación de Pearson y seleccionando como posibles parejas aquellas con un coeficiente de Pearson negativo y significativo. Por ejemplo:



- Validar las parejas con bases de datos de predicción de dianas. Se comprobó que todas aquellas parejas que correlacionaban significativamente fueran biológicamente pareables por su secuencia utilizando la base de datos MicroCosm que utiliza el algoritmo miRanda, el cual requiere conservación a lo largo de varias especies y excluye conformaciones no estables usando la aproximación de plegamiento de RNA de Vienna.

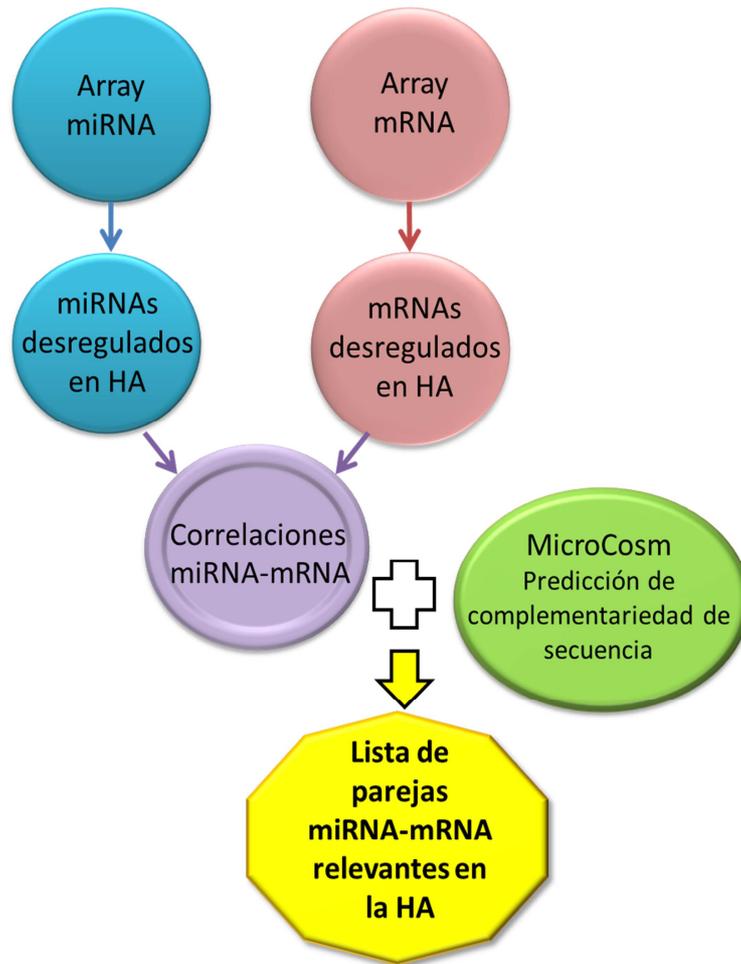


Ilustración 18. Diagrama de trabajo del paquete miRComb

### 13.3. Análisis funcional de los genes regulados por miRNAs

El análisis funcional de los genes significativos regulados por miRNAs en la HA se realizó con el software comercial *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA; Qiagen, Red Wood, CA). IPA relaciona los genes introducidos con vías metabólicas o con enfermedades en función de la expresión que presente en nuestra muestra y también buscando la implicación de dicho gen o proteína en publicaciones o estudios anteriores. Se consideraron las vías metabólicas y procesos fisiopatológicos de enfermedades que presentaran un valor  $p < 0,05$ .

## 14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables continuas se describieron con su media aritmética (intervalo de confianza del 95%) o su mediana (rango intercuartílico). Las variables categóricas se describieron mediante la media del conteo y porcentajes. Las comparaciones entre grupos se realizaron usando la prueba  $t$  de Student o la prueba  $U$  de Mann-Whitney según correspondiera. Las correlaciones entre las variables se evaluaron utilizando la  $\rho$  de Spearman o la  $r$  de Pearson, dependiendo de las variables. Para determinar el mejor valor de corte y la precisión (sensibilidad y especificidad) de las variables continuas asociadas con la mortalidad a los 90 días, se utilizó el análisis del área característica operativa del receptor (AUROC, de las siglas en inglés *Area Under Receiver Operating Characteristic*). Finalmente, se realizó un análisis comparativo de riesgo utilizando el método de Kaplan-Meier. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba log-rank. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS versión 14.0 para Windows (SPSS Inc., IL, EEUU) o GrapdPad (GraphPad Software, Inc. CA, EEUU).

# RESULTADOS

---

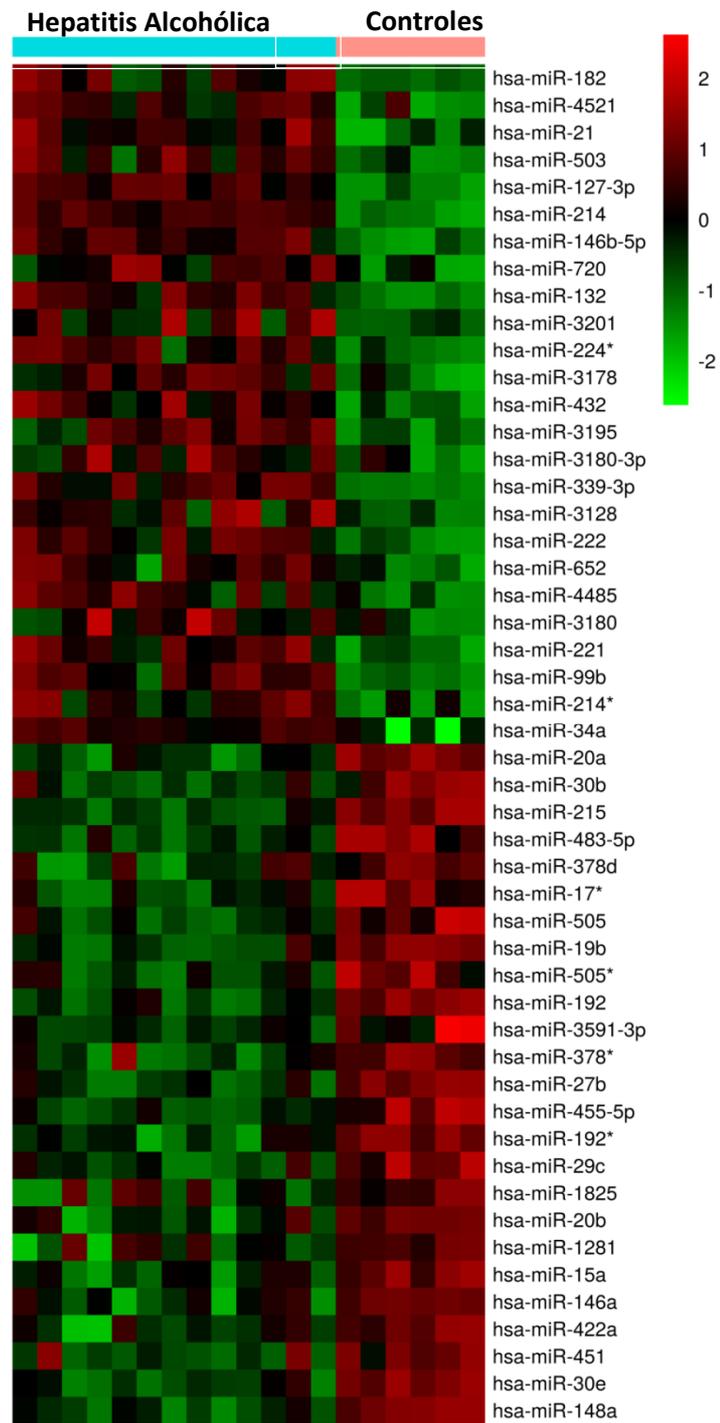


**PRIMER ESTUDIO:****LA INTEGRACIÓN DEL PERFIL DE MICRORNAS EN LA HEPATITIS ALCOHÓLICA REVELA EL PAPEL DEL MICRORNA-182 EN EL DAÑO HEPÁTICO Y LA INFLAMACIÓN.**

Esta tesis doctoral tenía como objetivo principal revelar el estado y la implicación de los microRNAs en el contexto hepático de los pacientes con Hepatitis Alcohólica. Gracias a este primer estudio, se identificó por primera vez un perfil de miRNAs desregulados en el hígado de pacientes con HA. Para conocer la implicación de estos miRNAs, se realizó un análisis integrativo de los miRNAs junto a los genes desregulados en la HA. Con ello, se consiguió identificar que los miRNAs desregulados en la HA están asociados con genes involucrados en vías clave de la fisiopatología de la HA. Además se estudió en mayor profundidad el papel del microRNA-182, por ser el miRNA más desregulado en la HA. Curiosamente, se determinó la asociación de la expresión del miR-182 con la severidad de la enfermedad y con un peor pronóstico de los pacientes con HA. Además observamos la relación del miR-182 con la reacción ductular, el daño colangiolar y la inflamación.

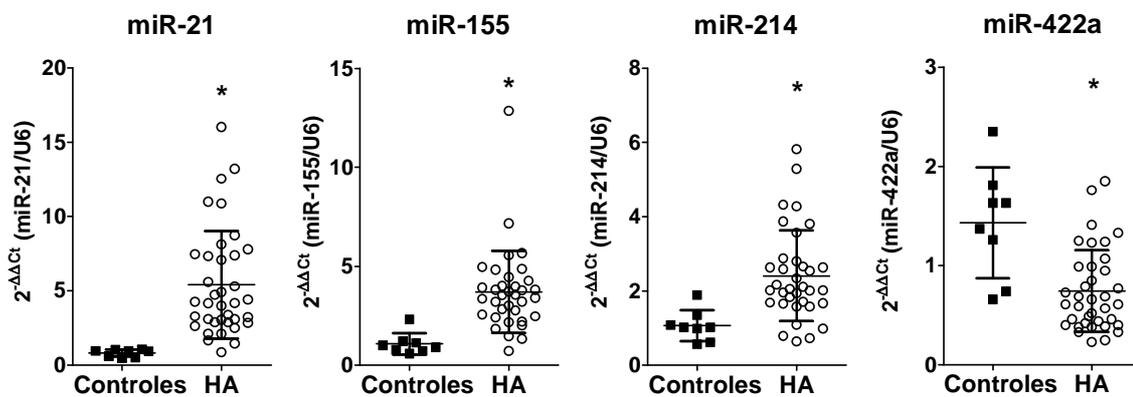
**Perfil de expresión de microRNAs en la Hepatitis Alcohólica**

Con el fin de evaluar si la expresión hepática de los miRNAs se altera en la HA, se realizó un análisis por array en 13 muestras de tejido hepático de pacientes con HA y 6 muestras de hígados controles. Se obtuvieron los datos de expresión de miRNAs en las mencionadas muestras de hígado, las cuales seguidamente fueron sometidas a un algoritmo de agrupamiento no supervisado, mostrando que existe una diferente expresión de miRNAs entre los hígados de pacientes con HA y los hígados controles ( $p < 0,05$ ). El array de expresión de los miRNAs reveló una desregulación importante de la expresión de miRNAs en la HA en comparación con el hígado control. Ciento once miRNAs se encontraron sobreexpresados en la HA, mientras que 66 miRNAs se encontraron infra-expresados en la HA frente a las muestras controles (Figura 1).



**Figura 1. Array de miRNAs en HA frente a muestras control.** *Heatmap* representando los 50 miRNAs más desregulados en la HA (n=13) frente a hígados controles (n=6);  $p < 0,05$ . Los cuadrados rojos corresponden a un aumento de la cantidad del miRNA en la muestra indicada, mientras que los cuadrados verdes indican una disminución.

Para confirmar los resultados del array validamos la expresión hepática de aquellos miRNAs previamente conocidos por estar involucrados en enfermedades hepáticas, pero que no habían sido descritos en la HA, como miR-21, miR-155, miR-214 y miR-422a. La validación se realizó por qPCR en una cohorte de confirmación con 35 pacientes con HA y 8 hígados controles. Se confirmó que miR-21, miR-155 y miR-214 estaban significativamente sobreexpresados; mientras que el miR-422a estaba infraexpresado en la HA respecto a los controles (Figura 2).

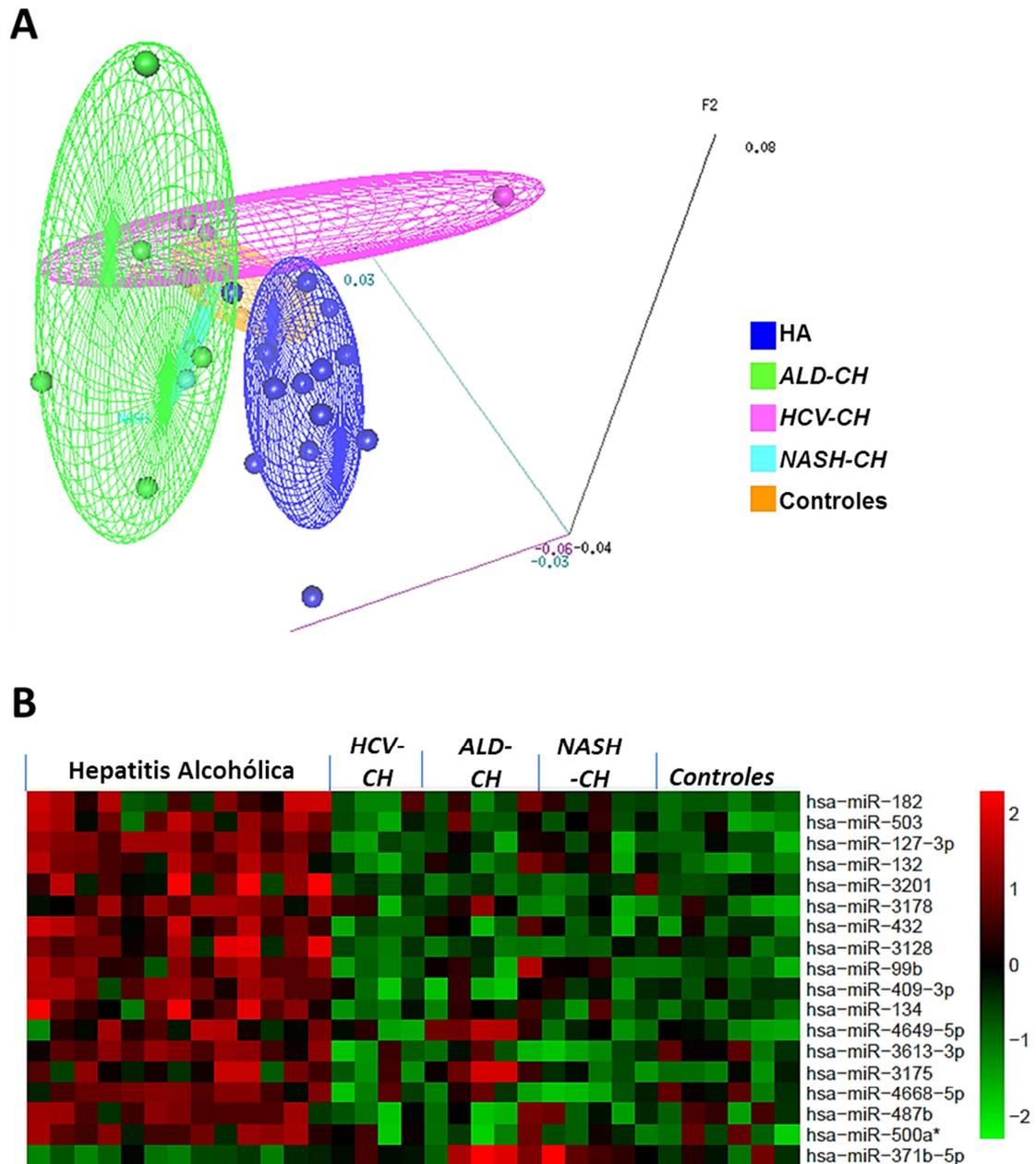


**Figura 2. Validación por qPCR de miRNAs desregulados en la HA.** La cohorte de validación incluye 35 pacientes con HA contra hígados controles (n=8). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (\*p < 0,01).

### Perfil de expresión de microRNAs en la Hepatitis Alcohólica frente a otras enfermedades crónicas del hígado

A continuación, se exploró si los miRNAs alterados se expresan exclusivamente en la HA o se alteran comúnmente en otras enfermedades hepáticas crónicas. El perfil de expresión de miRNAs se evaluó en muestras de hígado de pacientes cirróticos con otras etiologías como: cirróticos por enfermedad hepática por alcohol (*ALD-CH*), en cirróticos por esteatohepatitis no alcohólica (*NASH-CH*) y cirróticos por hepatitis por virus C (*HCV-CH*).

Un análisis de escala multidimensional (MDS) realizado con todas las muestras analizadas reveló que aquellas muestras pertenecientes al grupo de pacientes con HA se distribuyen de forma homogénea, con una amplia separación de los otros grupos de pacientes (Figura 3). Estos resultados sugieren que las muestras de HA expresan un perfil de miRNAs diferentes de las enfermedades crónicas del hígado, incluyendo la enfermedad hepática por alcohol (*ALD-CH*). Además, al comparar los perfiles de expresión de miRNAs, encontramos que 18 miRNAs se expresan diferencialmente en la HA en comparación con las otras enfermedades hepáticas analizadas, como se muestra en la Figura 3. Curiosamente, entre ellos, 17 miRNAs están sobreexpresados y sólo 1 está infraexpresado en comparación con las demás etiologías. Es importante señalar que el conjunto de miRNAs desregulados en la HA muestra un bajo nivel de expresión en todas las otras etiologías, lo que sugiere que pueden estar regulando vías específicas y determinantes en la HA.



**Figura 3. Comparación del perfil de miRNAs en la HA con perfiles de otras enfermedades hepáticas crónicas. (A) Análisis de escala multidimensional representando las 33 muestras que se analizaron por array de miRNAs. Las diferentes muestras se posicionan en el espacio tridimensional de acuerdo a su perfil de expresión de miRNAs. Las muestras de HA se representan en azul oscuro (n=13), las de ALD-CH en verde (n=5), las de HCV-CH en rosa (n=4), las de NASH-CH en azul claro (n=5) y las muestras control en naranja (n=6). (B) Heatmap de los 18 miRNAs diferencialmente expresados en la HA frente a las demás enfermedades hepáticas analizadas ( $p < 0,05$ ).**

Es importante destacar que la comparación de muestras de pacientes con HA contra muestras de pacientes con *ALD-CH* mostró que el perfil de expresión de miRNA es claramente diferente entre los dos grupos, con 51 miRNAs diferencialmente regulados en HA frente a hígado normal y *ALD-CH* (Figura 4).

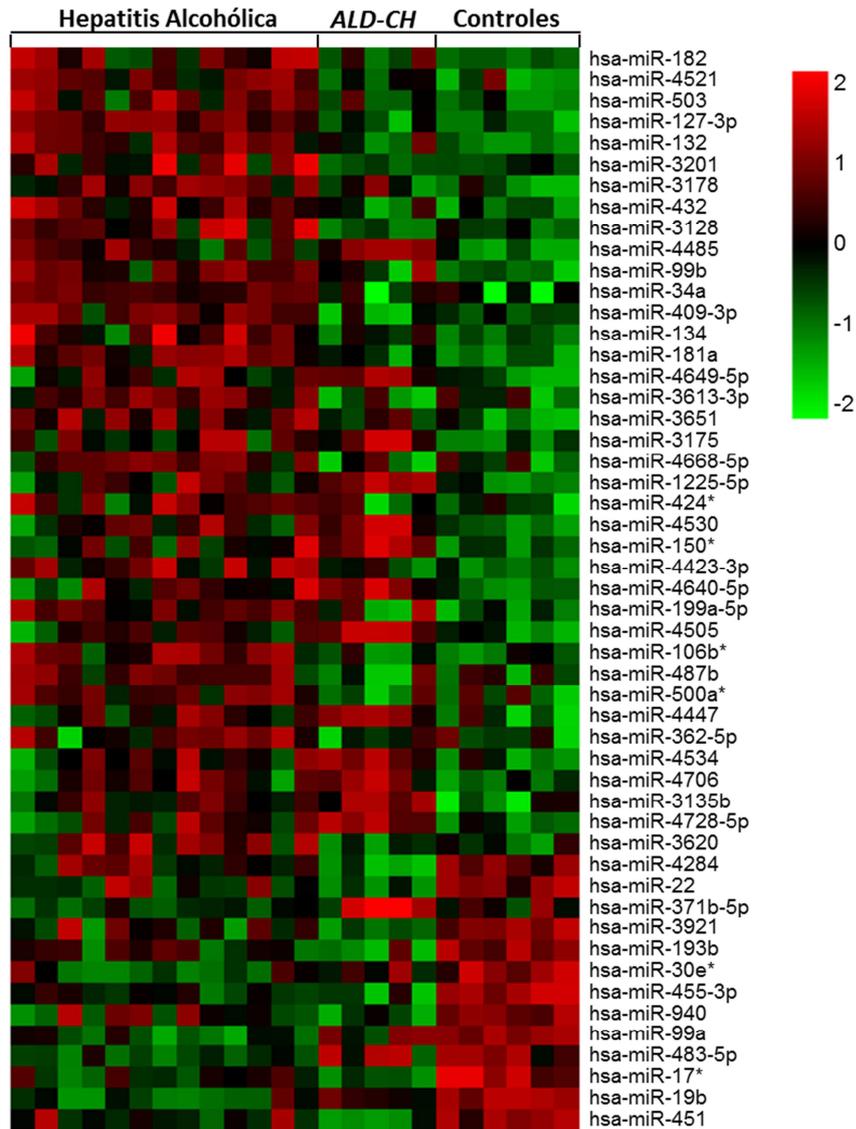


Figura 4. Comparación del perfil de HA con el perfil de *ALD-CH*. Heatmap de los miRNAs diferencialmente expresados en HA respecto a pacientes cirróticos por enfermedad alcohólica (*ALD-CH*) y controles;  $p < 0,05$ .

En conjunto, estos resultados sugieren que la HA se caracteriza por un perfil específico de miRNAs, que diferencia la HA de otras enfermedades hepáticas crónicas. Para determinar qué genes pueden estar regulados por los 18 miRNAs diferencialmente expresados en HA, se realizó un análisis integrativo con el paquete *MirComb* capaz de combinar los datos del perfil de miRNAs con los datos del transcriptoma (análisis de la expresión génica a través de todos los mRNAs) en muestras de HA. El software seleccionó parejas de miRNA-RNA mensajero que cumplían las dos condiciones siguientes; en primer lugar, presentaban una correlación negativa significativa entre la expresión del miRNA y la expresión del gen. En segundo lugar, eran parejas miRNA-mRNA capaces de acoplarse por complementariedad de secuencia. Seguidamente, se realizó un análisis funcional de los genes potencialmente dirigidos por los 18 miRNAs expresados en la HA, mediante el software *Ingenuity Pathway Analysis*. Dicho software describió la relación de dichos miRNAs con vías relacionadas con los receptores nucleares PXR (Receptor X de Pregnano), RXR (Receptor X Retinoide) o FXR (Receptor X Fernoide) y también con la colestasis hepática.

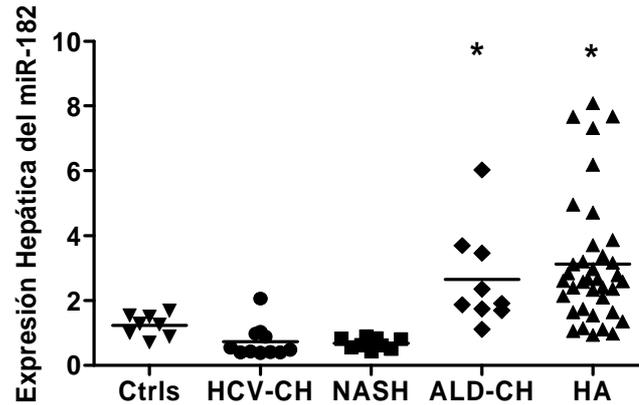
**Tabla 10. Vías reguladas por los 18 miRNAs diferencialmente expresados en la HA.**

VÍA	SIGNIFICANCIA	GENES DIANA IMPLICADOS EN LA VIA
<b>Activación de PXR/RXR</b>	$2 \times 10^{-8}$	NR1I3, PPARGC1A, RXRA, GSTA2, PRKAG2, HNF4A, CYP2C19, AKT2, FOXO1, FOXO3, CYP2A6
<b>Activación de FXR/RXR</b>	$3,4 \times 10^{-7}$	PKLR, SLC10A1, SLC22A7, NR5A2, AKT2, PPARGC1A, CLU, RXRA, LCAT, HNF4A, FGFR4, FOXO1, CYP27A1
<b>Señalización de IGF-1</b>	$4,8 \times 10^{-5}$	STAT3, IRS2, IRS1, PRKAG2, MAP2K1, AKT2, FOXO1, IGF1, FOXO3
<b>Señalización de AMPK</b>	$7,4 \times 10^{-5}$	IRS2, PPARGC1A, SMARCA2, ACACB, IRS1, PRKAG2, HNF4A, AKT2, FOXO1, FOXO3, PPP2R5C, ADRA1A
<b>Señalización de Wnt/<math>\beta</math>-catenina</b>	$1,9 \times 10^{-4}$	CTNNB1, TGFBR3, SOX5, TLE1, LRP6, TCF7L2, NR5A2, AKT2, PPP2R5C, FZD5, ACVR2B
<b>Activación PPAR<math>\alpha</math>/RXR<math>\alpha</math></b>	$3 \times 10^{-4}$	ADCY1, PPARGC1A, TGFBR3, RXRA, IRS1, PRKAG2, NCOR1, CYP2C19, ACAA1, MAP2K1, ACVR2B
<b>Señalización de PTEN</b>	0,001	BCL2L11, TGFBR3, MAGI1, FGFR4, MAP2K1, AKT2, FOXO1, FOXO3
<b>Señalización del receptor de glucocorticoides</b>	0,001	TAF15, SMARCA2, NR3C2, PRKAG2, MAP2K1, AKT2, VCAM1, NFATC3, STAT3, TSC22D3, CEBPB, NCOR1, FOXO3

<b>Señalización de PI3K en linfocitos B</b>	0,002	NFATC3, ITPR2, IRS2, CAMK2D, IRS1, MAP2K1, AKT2, FOXO3
<b>Señalización de la leptina en obesidad</b>	0,002	ADCY1, STAT3, PRKAG2, MAP2K1, AKT2, FOXO1
<b>Mecanismos moleculares del cáncer</b>	0,002	BRCA1, BCL2L11, CTNNB1, CAMK2D, IRS1, PRKAG2, MAP2K1, RAP1A, AKT2, FZD5, ADCY1, RHOB, LRP6, XIAP, FOXO1
<b>Colestasis hepática</b>	0,002	ADCY1, SLC10A1, SLC22A7, RXRA, PRKAG2, HNF4A, FGFR4, NR5A2, CYP27A1
<b>Señalización del receptor de dopamina</b>	0,002	ADCY1, PPP1R10, PRKAG2, MAOB, PPP2R5C, QDPR
<b>Señalización del receptor de insulina</b>	0,002	PPP1R10, IRS2, IRS1, PRKAG2, MAP2K1, AKT2, FOXO1, FOXO3
<b>Señalización en el metabolismo de xenobióticos</b>	0,003	NR1I3, CHST13, PPARGC1A, CAMK2D, RXRA, GSTA2, CYP2C19, MAF, MAP2K1, MAOB, PPP2R5C, CITED2
<b>Señalización de la uniones epiteliales adherentes</b>	0,004	CTNNB1, TGFB3, MAGI1, TCF7L2, WASL, RAP1A, AKT2, ACVR2B
<b>Inhibición de la función de RXR por LPS o IL-1</b>	0,005	NR1I3, CHST13, PPARGC1A, SLC10A1, RXRA, GSTA2, CYP2C19, NR5A2, MAOB, CYP2A6

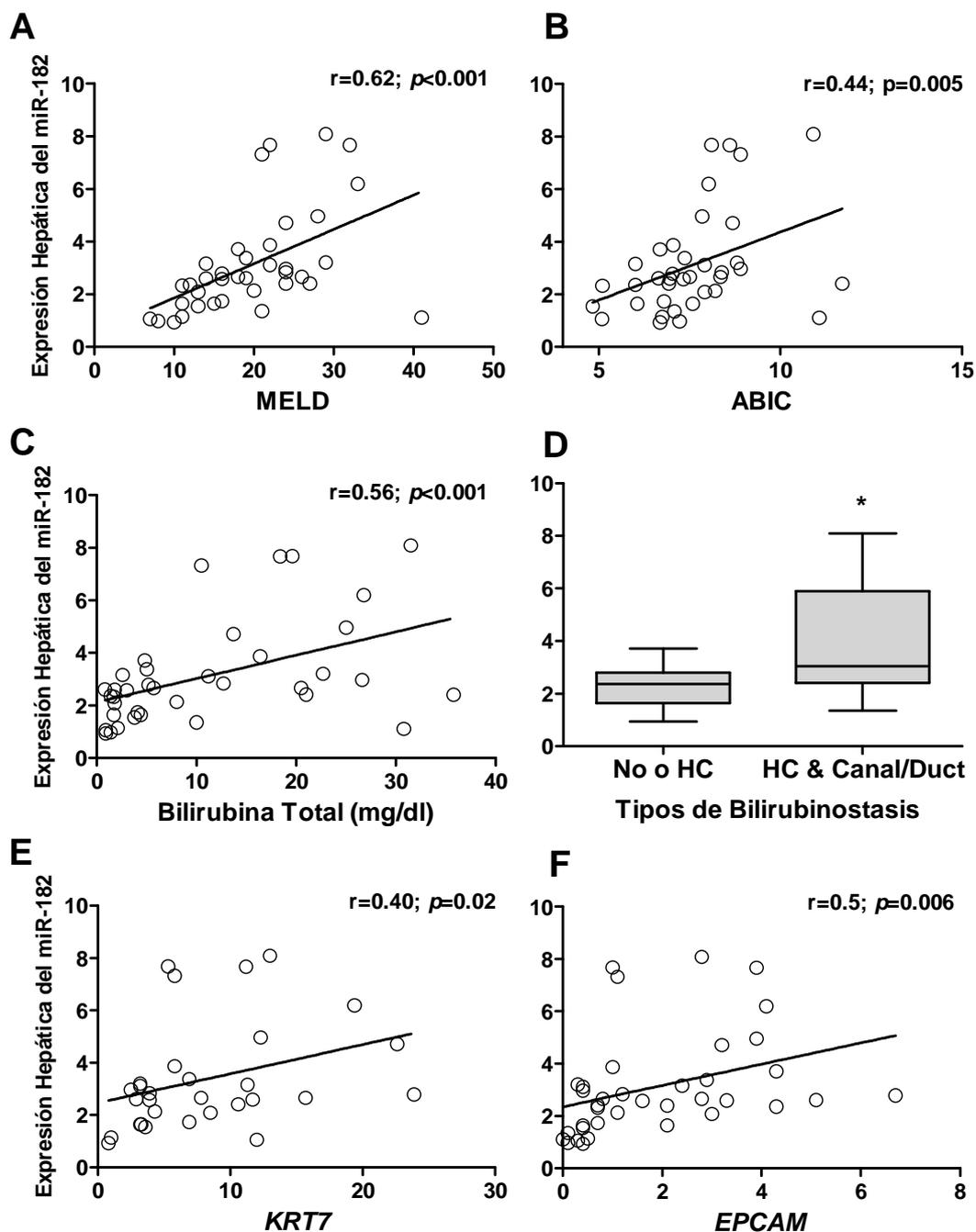
### **Correlaciones del miR-182 con la gravedad de la enfermedad y con características clínicas de la hepatitis alcohólica**

Seleccionamos el miR-182 para realizar una mayor evaluación ya que es el miRNA más expresado en pacientes con HA. La expresión del miR-182 fue evaluada por qPCR en una cohorte confirmatoria de pacientes con HA (n = 35), mostrando un aumento de 3,12 veces (p = 0,001) en HA frente a hígados normales. Por otra parte, la expresión del miR-182 en la HA, también es más elevada en comparación con las muestras de hígado de pacientes con *HCV-CH* y *NASH* (Figura 5). Sin embargo, la expresión del miR-182 no fue significativamente diferente entre las muestras de hígado de pacientes con HA y de *ALD-CH* (3,12 ± 1,96 y 2,65 ± 1,52 veces respectivamente frente a los hígados controles).



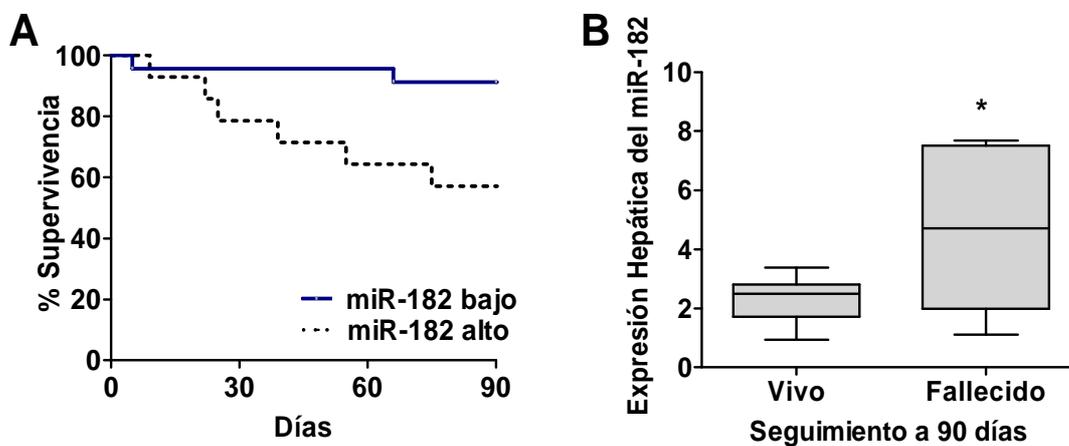
**Figura 5. Validación del miR-182 en varias enfermedades hepáticas crónicas.** La expresión hepática del miR-182 se validó por qPCR en muestras de pacientes con HA (n=35), HCV-CH (n=11), NASH (n=9), ALD-CH (n=9) y muestras control (n=8); \*p<0,05.

Para investigar el potencial papel del miR-182 en la patogénesis de la HA, se evaluó si su expresión se correlaciona con índices pronósticos de gravedad hepática. Se encontró una correlación positiva entre la expresión hepática del miR-182 y el índice pronóstico MELD (abreviatura del inglés *Model For End-Stage Liver Disease*) ( $p < 0,001$ ) y también con el índice ABIC (abreviación del inglés *Age Billirubin INR Creatinine*) ( $p = 0,005$ ) (Figura 6). Por otra parte, la expresión del miR-182 se correlacionó con los niveles séricos de bilirrubina ( $p < 0,001$ ) y con la bilirrubinostasis hepática ( $p = 0,01$ ). La bilirrubinostasis fue evaluada mediante valoración histológica de tejido de pacientes con HA, tal y como describen *Altamirano et al* [57]. Curiosamente, también se encontró una correlación positiva entre la expresión del miR-182 y la expresión del gen de la queratina 7 (*KRT7*) así como con la expresión de la molécula de adhesión de células epiteliales (*EPCAM*, de la abreviatura en inglés *Epithelial cell adhesion molecule*), dos marcadores de la reacción ductular que están asociados con la gravedad de la HA, como describieron *Sancho-Bru et al* [12] (Figura 6).



**Figura 6. Correlaciones de la expresión hepática del miR-182 con índices y parámetros clínicos.** La expresión hepática del miR-182 correlaciona con (A) MELD; (B) con ABIC; (C) y con la bilirrubina sérica total (mg/dl). (D) La expresión hepática del miR-182 en diferentes tipos de bilirrubinostasis hepática; No = sin bilirrubinostasis; HC = bilirrubinostasis hepatocelular; Canal/Duct = bilirrubinostasis canalicular y/o ductular; \* $p<0,01$ . La expresión hepática del miR-182 correlaciona con la expresión hepática de genes que codifican marcadores de las células progenitoras hepáticas como (E) *KRT7* o (F) *EPCAM*.

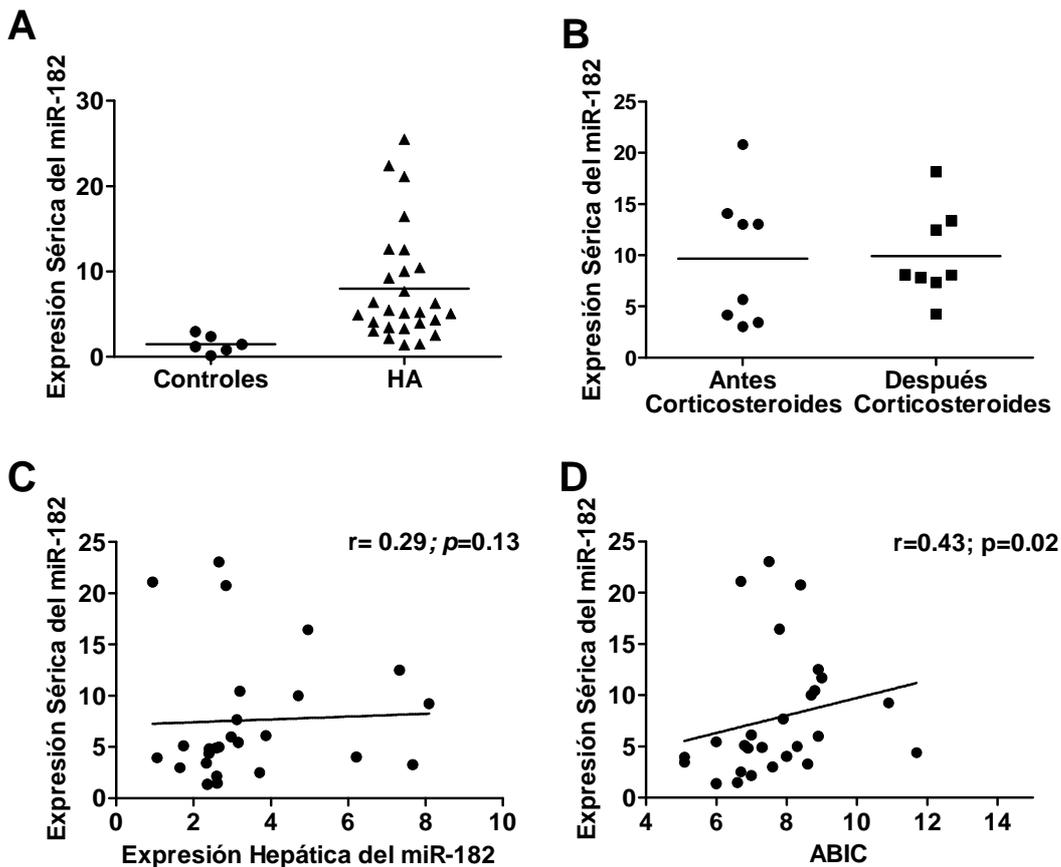
A continuación, se evaluó la asociación de la expresión del miR-182 con la mortalidad a corto plazo de los pacientes con HA. La expresión del miR-182 es mayor en los pacientes que murieron dentro de los 90 días después de la admisión (Figura 7). Por otra parte, se realizó un análisis de Kaplan-Meier para la expresión hepática del miR-182. Como valor de corte se seleccionó el valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}=2,9$  veces contra tejido control, obteniendo una sensibilidad del 79% y especificidad del 74%, AUROC: 0,76, 95% CI [0,56 -0,96];  $p = 0,01$ . El análisis Kaplan-Meier mostró la asociación de la mortalidad a corto plazo con una expresión del miR-182 por encima de 2,9 veces (Figura 7).



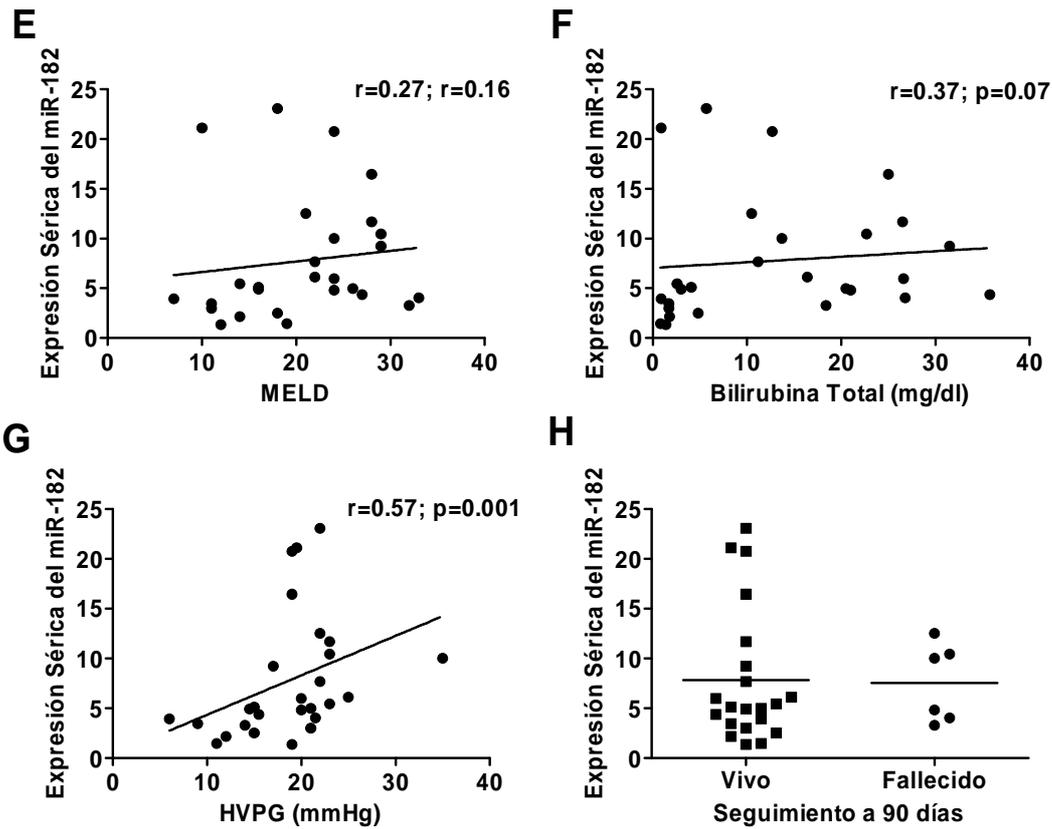
**Figura 7. Correlación del miR-182 con el pronóstico a 90 días en pacientes con HA. (A)** Análisis de Kaplan-Meier en base a la expresión hepática del miR-182, mostrando la mortalidad durante los 90 días después de la admisión. Se dividió a los pacientes entre los que tenían una expresión baja del miR-182 (miR-182 bajo =  $2^{-\Delta\Delta Ct} < 2,9$ ) o una expresión hepática alta del miR-182 (miR-182 alto =  $2^{-\Delta\Delta Ct} > 2,9$ ) (B) Expresión hepática del miR-182 entre dos grupos de pacientes con diferente desenlace de la HA a los 90 días (vivos n=26, fallecidos n=9); \*p<0,01.

Por último, para evaluar si el miR-182 podría ser detectado en la circulación sanguínea, se realizó una qPCR en muestras de suero de pacientes con HA frente a suero de individuos control. Como se muestra en la Figura 8, se encontró un marcado aumento en la expresión del miR-182 en el suero de pacientes con HA frente a individuos normales ( $p < 0,05$ ). No obstante, los niveles séricos del miR-182 no se vieron alterados

después del tratamiento con prednisona en pacientes con HA. Por otra parte, el nivel sérico del miR-182 no se correlaciona con los niveles del miR-182 en tejido hepático. Además los niveles séricos de miR-182 no se asocian con la gravedad de la enfermedad o la mortalidad en los pacientes con HA, lo que sugiere que el miR-182 circulante no parece ser un buen biomarcador para la HA.



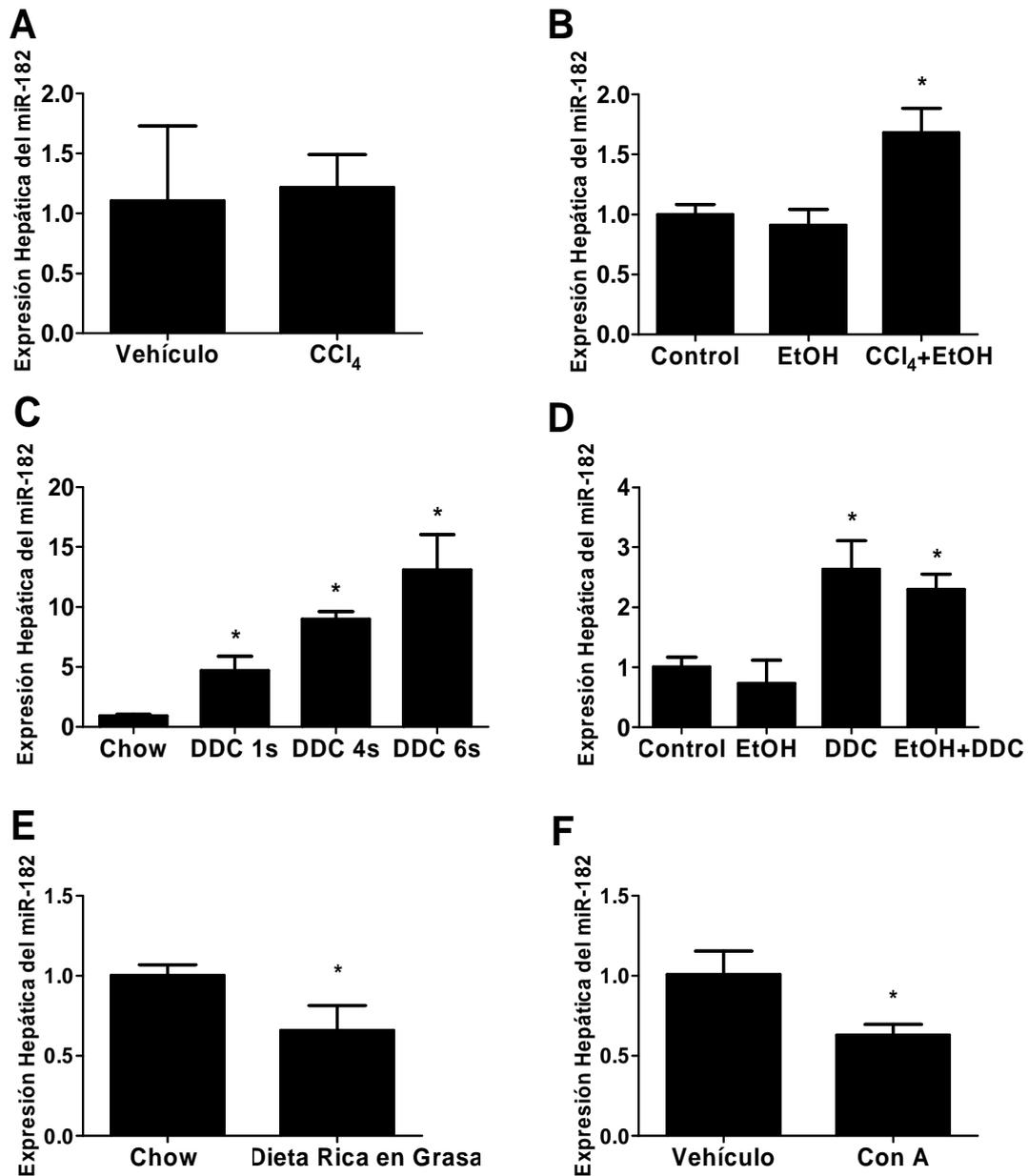
**Figura 8. Niveles séricos del miR-182 en pacientes HA y correlaciones con niveles hepáticos, parámetros clínicos y pronóstico.** (A) La expresión en suero del miR-182 es diferente entre pacientes HA (n=35) e individuos controles (n=6); \*p<0,05. (B) Expresión en suero del miR-182 en pacientes HA antes (n=8) y después (n=8) de 7 días de tratamiento con prednisona. Las correlaciones del nivel sérico del miR-182 con (C) los niveles hepáticos del miR-182 y (D) el índice ABIC. Continúa en la página siguiente.



Continuación figura 8. Niveles séricos del miR-182 en pacientes HA y correlaciones con niveles hepáticos, parámetros clínicos y pronóstico. (E) el índice MELD, (F) la bilirrubina sérica total y (G) el gradiente de presión de la vena porta (HVPG). (H) Se evaluó el nivel en suero del miR-182 en pacientes con HA con diferente pronóstico a los 90 días del ingreso (vivo  $n=21$ , fallecido  $n=6$ ).

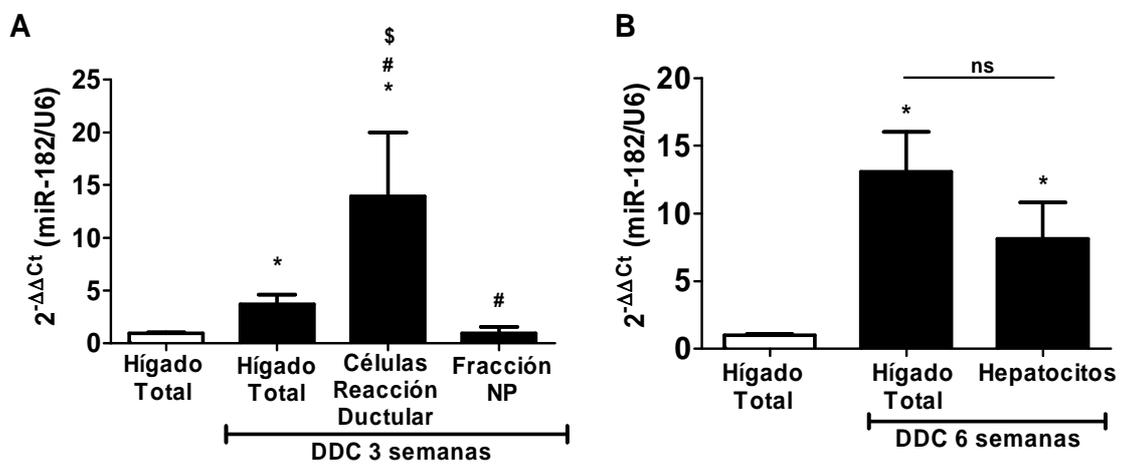
**Expresión del miR-182 en diversos modelos animales de daño hepático**

Aunque existen publicaciones recientes que describen modelos animales donde se muestran algunas de las características de la enfermedad hepática alcohólica severa [178,179], ningún modelo animal descrito reproduce todas las características clínicas de la HA, que incluirían un importante grado de fibrosis, inflamación, reacción ductular y colestasis. Por lo tanto, se evaluó la expresión del miR-182, en diversos modelos animales de consumo de etanol, en modelos de fibrosis o de reacción ductular, por separado y en combinación con ingesta de etanol. Como se muestra en la Figura 9, no se encontraron diferencias en la expresión hepática del miR-182 en animales tratados solamente con CCl<sub>4</sub> o con etanol. Por el contrario, un tratamiento combinado de CCl<sub>4</sub> más etanol indujo un leve, aunque significativo aumento en la expresión del miR-182 (1,68 veces;  $p < 0,05$ ). Sorprendentemente, en ratones tratados con dieta DDC, que induce lesión hepática, inflamación, reacción ductular y colestasis, el miR-182 está sobreexpresado y su desregulación aumenta a medida que se extiende el tratamiento. Sin embargo, la combinación de DDC con la ingesta de etanol no aumenta la expresión del miR-182 por encima de los niveles observados con dieta DDC solamente. Por otro lado, el miR-182 no estaba aumentado en un modelo animal de NASH (animales alimentados durante 16 semanas con dieta rica en grasas) o en animales con daño hepático agudo mediado por células T (animales tratados con concanavalina A).



**Figura 9.** Expresión hepática del miR-182 en diversos modelos animales de daño hepático. Expresión en (A) animales tratados con CCl<sub>4</sub> (n=4) durante 2 semanas; (B) animales tratados con etanol (EtOH) intragástrico (n=3) o con CCl<sub>4</sub> más etanol (n=4); (C) animales alimentados con dieta DDC durante 1 semana (n=5), 4 semanas (n=5) y 6 semanas (n=3); (D) animales alimentados con dieta Lieber-DeCarli suplementada con etanol (n=5), suplementada con DDC (n=3) o suplementada con etanol más DDC (n=6); (E) animales alimentados con dieta rica en grasa (n=4) y (F) animales tratados con concanavalina (n=3); \*p<0,05.

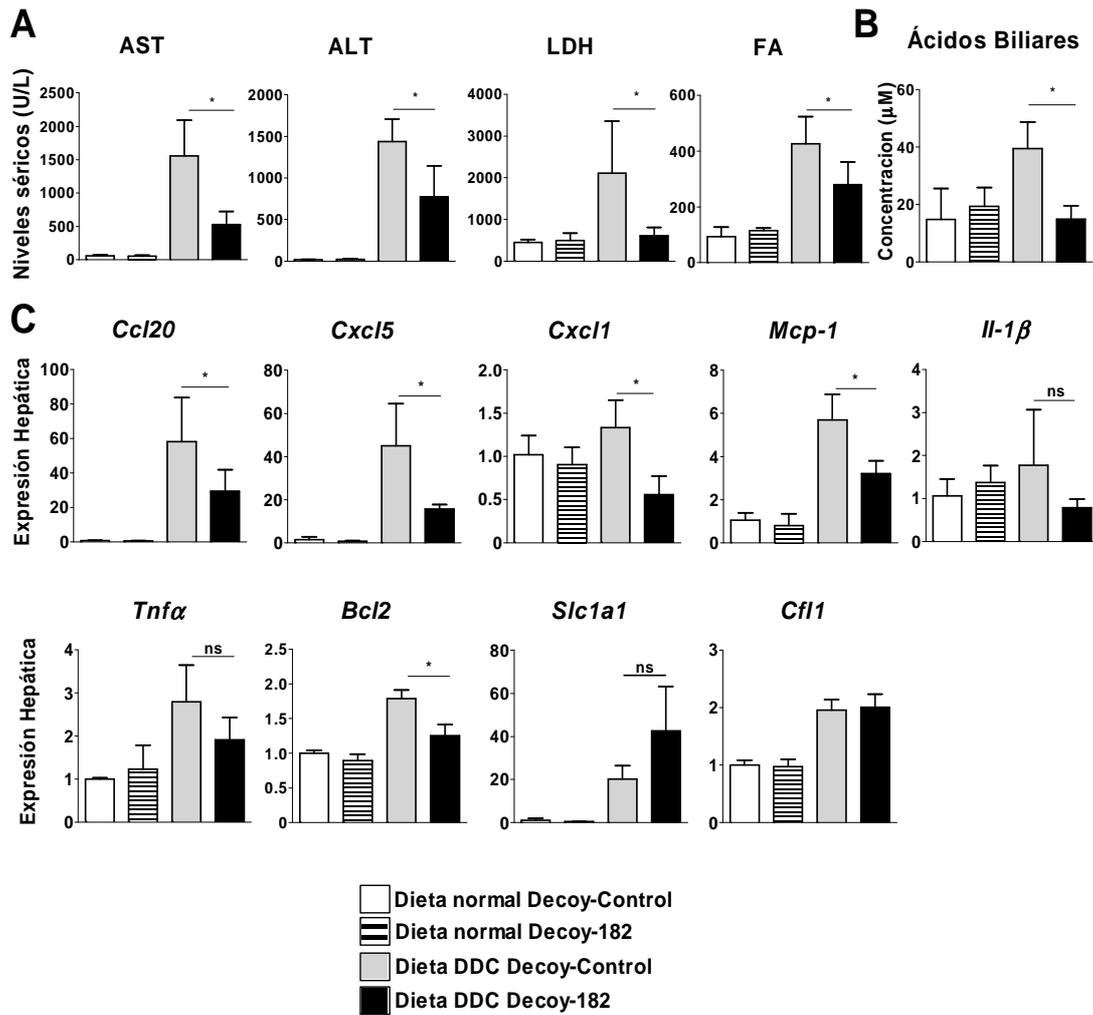
Para evaluar el origen celular del miR-182, se aislaron células parenquimales y no parenquimales de ratones alimentados con dieta DDC. Como se muestra en la Figura 10, el miR-182 se encuentra enriquecido en las células de la reacción ductular en comparación con el tejido hepático total o frente a células no parenquimales ( $p < 0,05$ ). Aunque en menor medida, el miR-182 también se expresó en hepatocitos. Esto indica que el miR-182 se expresa predominantemente en las células de la reacción ductular pero también en hepatocitos en un hígado dañado.



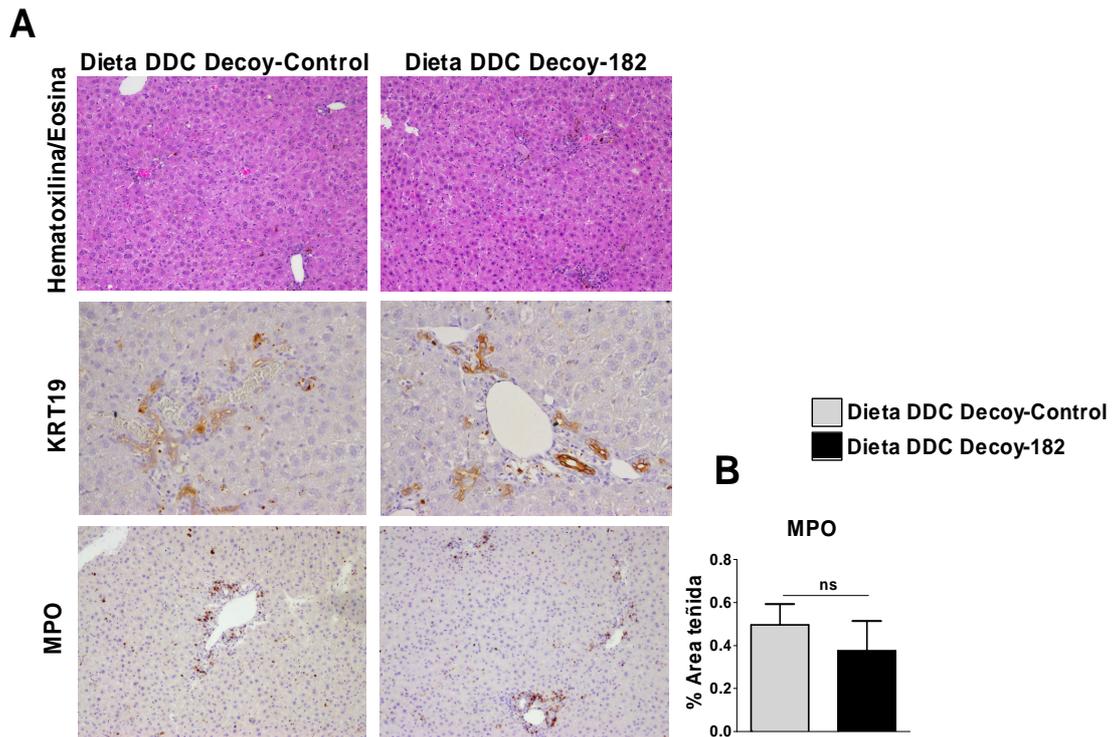
**Figura 10. Expresión del miR-182 en diferentes células hepáticas.** Para conocer la contribución de varios tipos celulares a la expresión hepática del miR-182 se comparó el nivel de expresión de (A) la fracción no parenquimal (fracción NP, n=3) y las células de la reacción ductular (n=3) de ratones alimentados con dieta DDC durante 3 semanas y (B) hepatocitos de animales alimentados con dieta DDC durante 6 semanas; \* $p < 0.05$  contra tejido hepático total sano; # $p < 0.05$  contra tejido hepático total con DDC; \$ $p < 0.05$  contra la fracción no parenquimal.

### **Análisis funcional del miR-182 *in vivo***

Para evaluar el papel del miR-182 en el daño hepático, bloqueamos su función en ratones utilizando un sistema *decoy* para el miR-182 (*decoy-182*), como está descrito en materiales y métodos. Los ratones fueron alimentados con dieta DDC o con dieta control (Chow). Los ratones sanos tratados con *decoy-182* o *decoy-control* no mostraron cambios en las transaminasas hepáticas o los parámetros bioquímicos. Es importante destacar que en animales alimentados con dieta DDC la administración del *decoy-182* si indujo una reducción del daño hepático como se muestra por la disminución de los niveles séricos de ALT, AST y LDH en comparación con el *decoy-control*. Además, la administración de *decoy-182* disminuyó los niveles séricos de fosfatasa alcalina (FA), así como los ácidos biliares totales en el tejido hepático, lo que sugiere que el miR-182 puede estar implicado en el metabolismo de los ácidos biliares y la colestasis. Como se muestra en la Figura 11, los niveles de expresión de genes inflamatorios clave, tales como *Mcp-1*, *Ccl20*, *Cxcl5*, *Cxcl1* o genes relacionados con apoptosis como *Bcl2*, se redujeron en los animales alimentados con DDC que recibieron *decoy-182* en comparación con los que recibieron *decoy-control*. Por otro lado, analizamos los efectos de la inhibición del miR-182 en dos genes diana descritos; el tratamiento con *decoy-182* restauró (no significativamente) los niveles de expresión de *Slc1A1*, pero no cambió la expresión de *Cfl-1* en tejido hepático total. La histología hepática y la extensión de la reacción ductular fueron evaluadas a ciegas por un patólogo, no encontrando diferencias significativas. Además, no se observaron cambios importantes en la infiltración de neutrófilos (Figura 11).



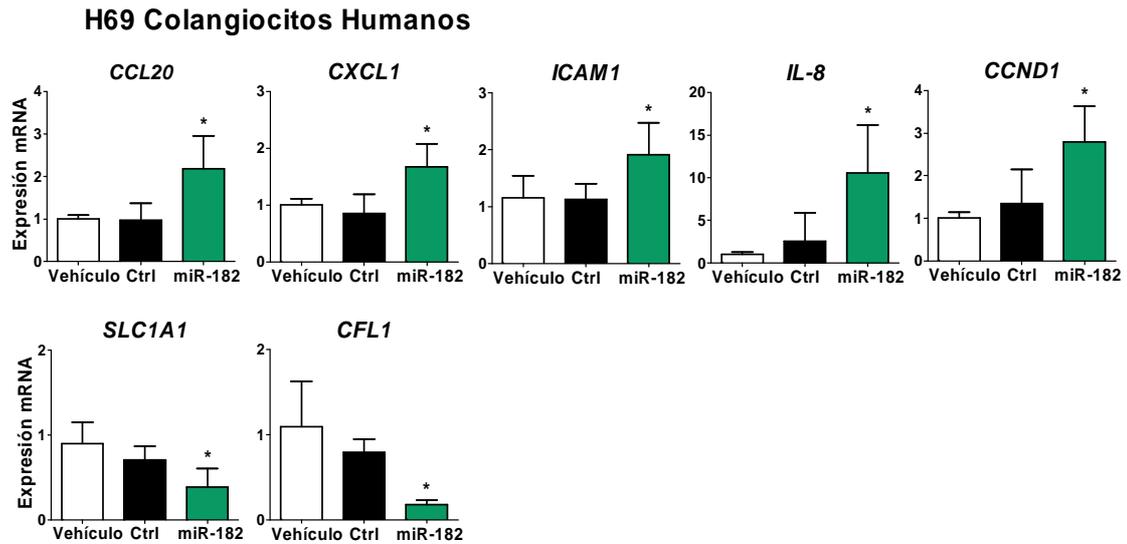
**Figura 11. Efectos *in vivo* de la inhibición del miR-182 en un modelo con dieta DDC.** Los animales se alimentaron con dieta DDC durante una semana y recibieron 4 inyecciones de decoy-control o decoy-182. (A) Niveles séricos de la aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), lactato deshidrogenasa (LDH) y la fosfatasa alcalina (FA). (B) Contenido hepático de ácidos biliares. (C) La expresión hepática de varios genes se midió por qPCR y está expresada como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . \* $p < 0.05$ ; ns= no significativo. Continúa en la página siguiente.



Continuación figura 11. Efectos *in vivo* de la inhibición del miR-182 en un modelo con dieta DDC. (A) Imágenes representativas del hígado de ratones alimentados con DDC y tratados con los sistemas decoy. Imágenes de tinción por hematoxilina y eosina, e inmunohistoquímica para queratina 19 (KRT19) y mieloperoxidasa (MPO). (B) Cuantificación de las áreas positivas para la tinción por MPO.

### Análisis funcional del miR-182 *in vitro*

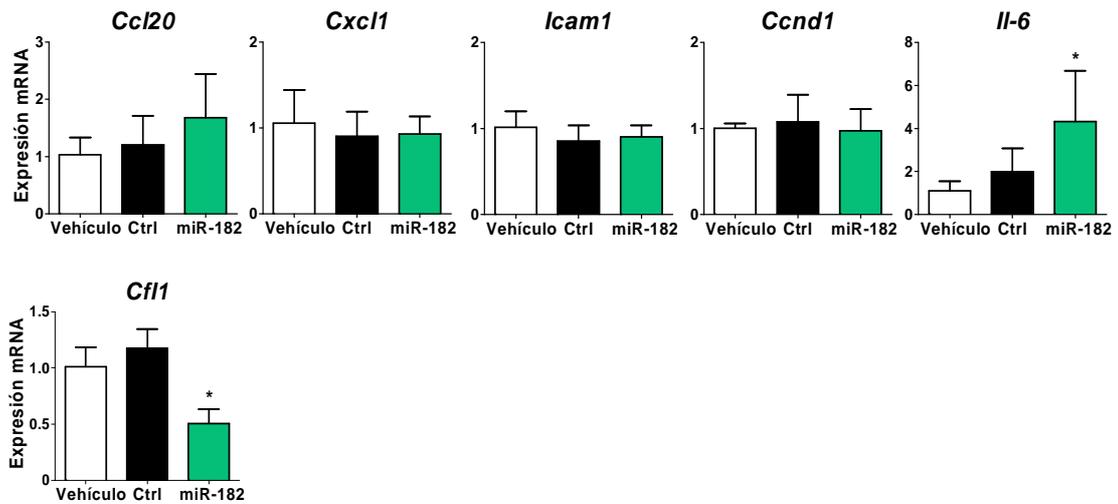
Debido a que el miR-182 se expresa principalmente en las células de la reacción ductular, utilizamos la línea celular de colangiocitos humanos H69, para evaluar el papel del miR-182 *in vitro*. La transfección de las células H69 con un *mimic* del miR-182 provocó una reducción de la expresión génica de *SLC1A1* y Cofilin-1 que son dianas descritas del miR-182; y además provocó una sobreexpresión de genes inflamatorios y de ciclo celular, tal como *CCL20*, *CXCL1*, *IL-8* y Ciclina D1 (Figura 12).



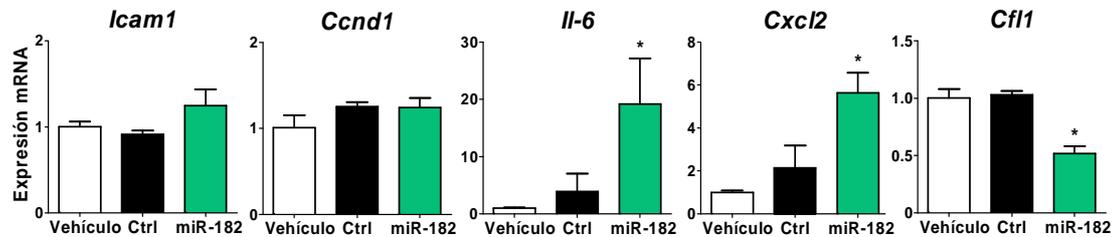
**Figura 12. Efecto de la sobreexpresión del miR-182 en colangiocitos humanos.** La expresión génica fue evaluada por qPCR en células transfectadas con el *mimic* hsa-miR-182-5p (miR-182), células transfectadas con el *mimic* control Cel-miR-39a-3p (Ctrl) y células con el agente transfectante (Vehículo). Los resultados representan 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a Vehículo.

A continuación se analizó el efecto del miR-182 en otros tipos celulares determinantes en el daño hepático como son los hepatocitos o los macrófagos. La transfección de hepatocitos primarios de ratón y la línea de macrófagos RAW 264.7 con el *mimic* de miR-182 dio lugar a una regulación negativa del gen diana descrito *Cofilin1* y una regulación positiva de *Il-6* en ambos tipos celulares, sin embargo no cambió la expresión de la mayoría de los genes inflamatorios, como se observa en la figura 13.

**Hepatocitos Primarios de Ratón**



**RAW 264.7**



**Figura 13. Efectos de la sobreexpresión del miR-182 en hepatocitos y macrófagos de ratón.** La expresión génica fue evaluada por qPCR en células transfectadas con el *mimic* mmu-miR-182-5p (miR-182), células transfectadas con el *mimic* control Cel-miR-39a-3p (Ctrl) y células con el agente transfectante (Vehículo). Los resultados representan 3 experimentos independientes. \*p<0,05 respecto a Vehículo.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el miR-182 puede estar involucrado en el daño a los colangiocitos así como con el daño hepático y puede estar contribuyendo a la inflamación del hígado.



## SEGUNDO ESTUDIO:

### **LA EXPRESIÓN DEL MICRORNA-155 EN LAS CÉLULAS MIELOIDES MODULA LA INFLAMACIÓN HEPÁTICA EN RESPUESTA AL DAÑO**

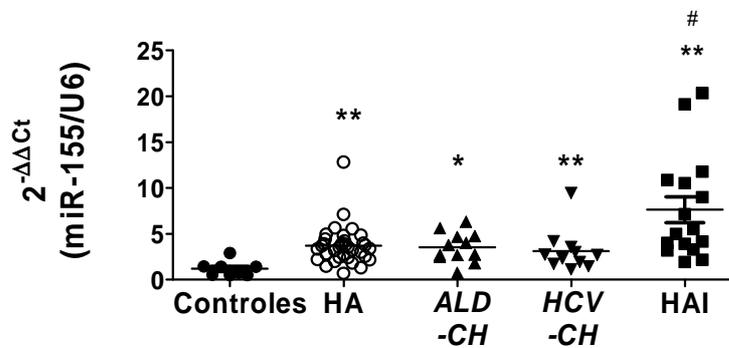
Gracias al primer estudio, observamos que la expresión del miR-155 estaba igualmente desregulada en el hígado de todas las patologías incluidas en el estudio. Esto nos incitó a pensar que la desregulación del miR-155 se debía a un proceso fisiopatológico presente en todas las etiologías estudiadas. El miR-155 y su desregulación han sido ampliamente relacionados con el sistema inmune y la respuesta inflamatoria, que son procesos clave en las enfermedades hepáticas incluidas en este estudio. Por ello, en este segundo estudio nos centramos en el análisis del papel del miR-155 en el daño hepático mediado por inflamación, investigando el papel del miR-155 en las células inflamatorias y la implicación de dicha expresión en respuesta al daño hepático.

#### **Expresión de miR-155 en muestras humanas**

En el primer estudio habíamos observado una desregulación del miR-155 en el hígado de pacientes con HA, sin embargo este miRNA no se encuentra entre los diferencialmente expresados en la HA, estando igualmente desregulado en otras enfermedades hepáticas. Para validar la sobreexpresión del miR-155, se procedió a analizar la expresión hepática del miR-155 por qPCR en diversas enfermedades hepáticas incluyéndose la hepatitis autoinmune (HAI). La HAI es una enfermedad hepática desencadenada por una desregulación del componente inflamatorio, por ello consideramos interesante averiguar si la expresión hepática del miR-155 estaba también alterada.

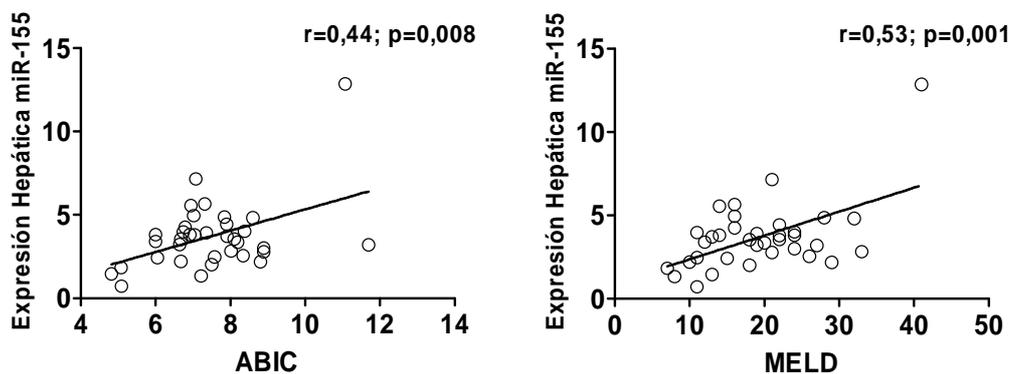
Como ya habíamos descrito en el primer estudio los niveles del miR-155 en tejido hepático de pacientes con HA está elevado ( $3,7 \pm 2,07$  veces respecto a hígados controles). Además, se confirmó la sobreexpresión en otras enfermedades hepáticas

como *ALD-CH*, *HCV-CH* y HAI. Sorprendentemente, la enfermedad hepática con la mayor desregulación del miR-155 fue la HAI ( $7,6 \pm 5,6$  veces respecto a hígados controles).



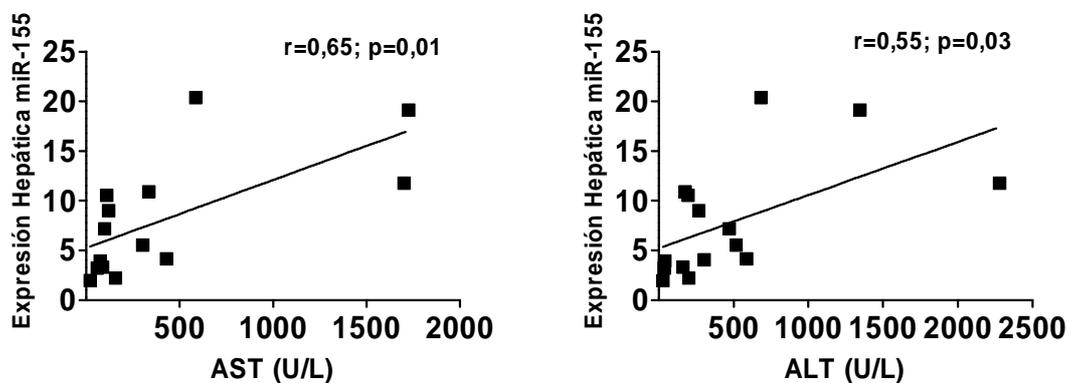
**Figura 14. Expresión hepática del miR-155 en diversas enfermedades hepáticas.** La expresión del miR-155 se evaluó mediante qPCR en el hígado de pacientes con HA (n=35), con *ALD-CH* (n=12), con *HCV-CH* (n=11), con HAI (n=16) y en hígados controles (n=8). \*p<0,05, \*\*p<0,01 respecto a controles; #p<0,05 respecto a HA, *ALD-CH* y *HCV-CH*.

A continuación, quisimos saber si la expresión hepática del miR-155 correlaciona con los índices de severidad en la HA. Efectivamente, los niveles hepáticos del miR-155 en pacientes con HA correlacionaron con índices de daño como MELD y ABIC.



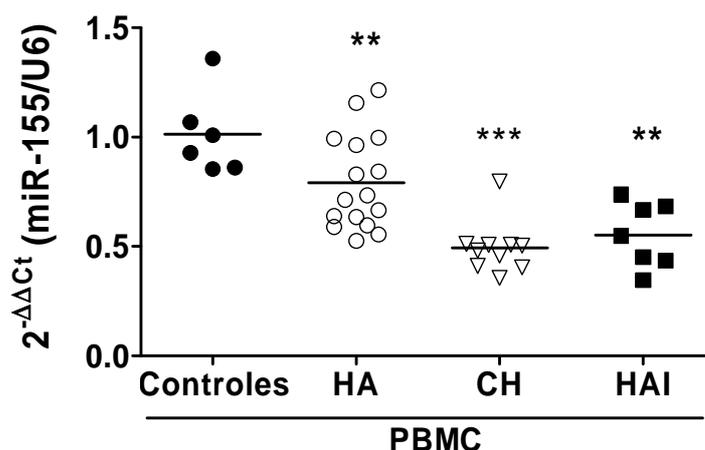
**Figura 15. Correlaciones de índices de daño hepático con la expresión hepática del miR-155 en pacientes con HA.** La expresión del miR-155 en hígado se correlacionó con 2 índices de progresión de la enfermedad hepática en pacientes con HA.

En el caso de los pacientes con HAI de los que se obtuvo biopsia hepática, no se calcularon índices de severidad hepática ya que eran pacientes con brotes agudos de HAI por primera vez. Por ello, para conocer si el miR-155 correlacionaba el daño hepático en HAI utilizamos los niveles séricos de transaminasas hepáticas como AST y ALT. Como se muestran en la figura 16, la expresión hepática del miR-155 correlacionaba con los niveles de AST y ALT en suero. Sin embargo, nuestra cohorte de pacientes es bastante reducida, por lo que estudios con mayores cohortes deben ser realizados para confirmar nuestros resultados.



**Figura 16. Correlaciones de las transaminasas hepática con la expresión hepática del miR-155 de pacientes con HAI.** La expresión del miR-155 fue evaluada por qPCR y se correlacionó con los niveles séricos de AST y ALT.

El miR-155 se encuentra expresado en la mayoría de células inflamatorias, por tanto quisimos averiguar si la desregulación del miR-155 se extendía al componente inflamatorio de las enfermedades hepáticas. Para ello, se evaluó la expresión del miR-155 en PBMCs, compuestas por linfocitos y monocitos circulantes, en pacientes con HA, con HAI y pacientes con cirrosis hepática. Sorprendentemente, la expresión del miR-155 en PBMCs circulantes en los pacientes de la diferentes etiologías estaba infraexpresada respecto a los individuos controles.



**Figura 17. Expresión del miR-155 en PBMCs de diversas enfermedades hepáticas.** Se validó la expresión del miR-155 por qPCR en linfocitos y monocitos circulantes de pacientes con HA (n=16), HAI (n=7), pacientes con cirrosis hepática (n=10) e individuos controles (n=6). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 respecto a individuos controles.

En conjunto, estos resultados sugieren que existe una discrepancia en la expresión del miR-155 entre las células hepáticas y las células mieloides, ambos componentes clave en el daño hepático. El papel que juega la expresión del miR-155 en las células inflamatorias que participan en el daño hepático es desconocido.

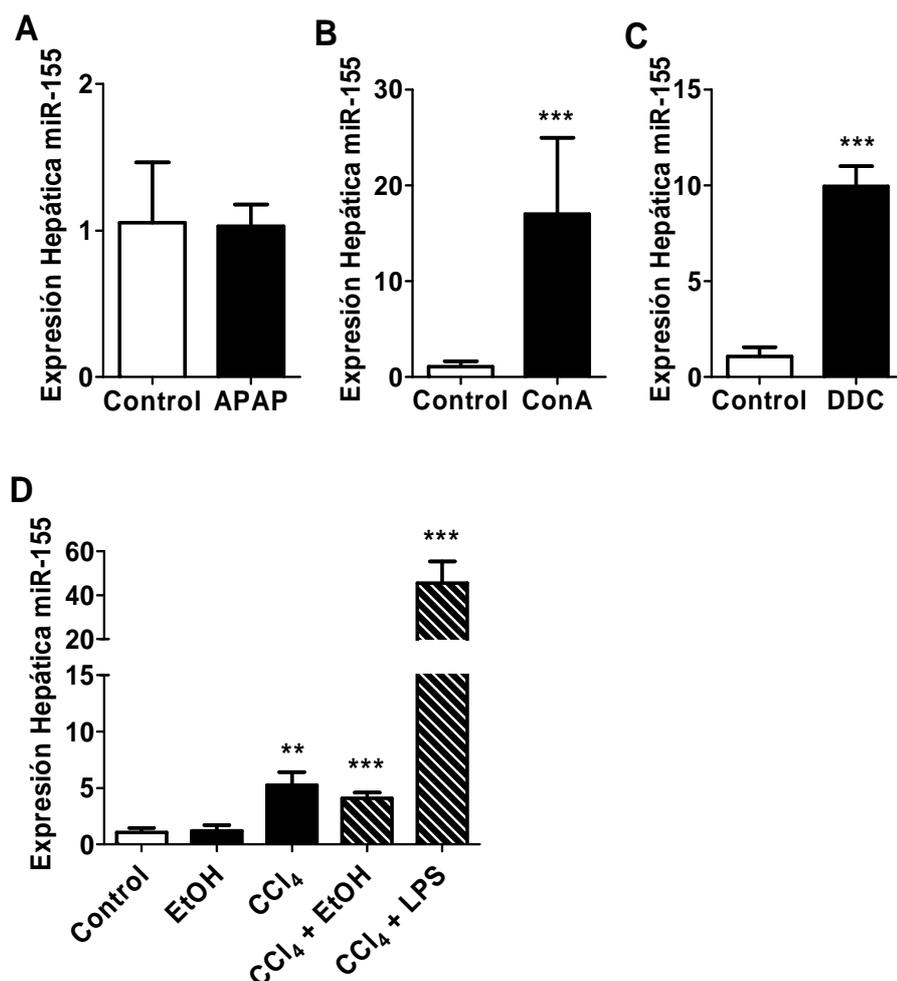
### Expresión hepática del miR-155 en diversos modelos animales

Como hemos comentado en el estudio anterior no existe un único modelo animal que reúna todas las características de la HA, por ello para analizar la respuesta del miR-155 se evaluó su expresión en modelos animales de fibrosis, endotoxemia, intoxicación con etanol y reacción ductular. Además se quiso evaluar la respuesta del miR-155 en un modelo de HAI y finalmente en un modelo de daño hepático agudo inducido por un toxico.

Inicialmente, para investigar el daño inducido por drogas realizamos un modelo de intoxicación por paracetamol (APAP). El modelo de intoxicación por APAP provoca la muerte de los hepatocitos y la liberación de DAMPs, lo que favorece la infiltración de

macrófagos y células NKT [180,181]. Por otro lado, investigamos un modelo de daño hepático agudo mediado por linfocitos T, mediante una inyección de concanavalina A (ConA), considerado un buen modelo experimental de la hepatitis autoinmune [182,183].

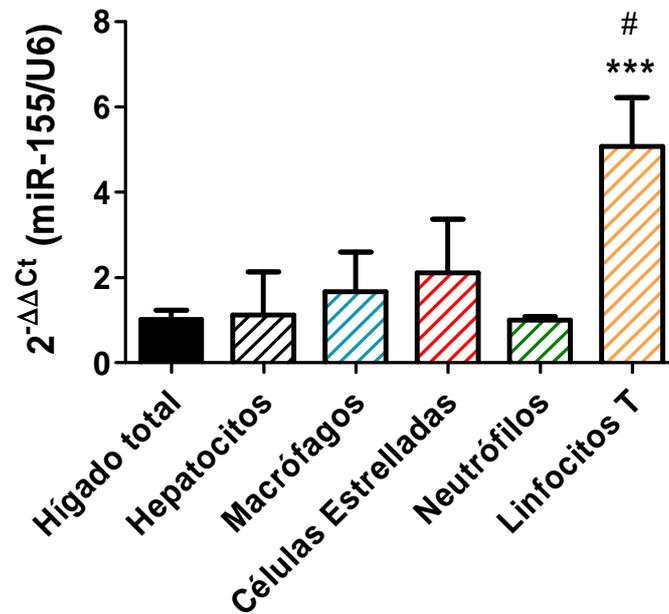
Finalmente, evaluamos modelos que representan características de la fisiopatología de la HA. Como se muestra en la figura 18, la expresión hepática del miR-155 no se indujo en respuesta al tratamiento con APAP. Sin embargo, el tratamiento con ConA provocó un marcado aumento en la expresión del miR-155 en tejido hepático, con una sobreexpresión de 20 veces respecto a animales tratados con vehículo. A su vez, observamos como el modelo de dieta con DDC, caracterizado por infiltrado de neutrófilos, reacción ductular y fibrosis es capaz de producir un gran aumento de la expresión hepática del miR-155. Sin embargo, la ingesta de alcohol no es capaz de alterar la expresión hepática del miR-155, mientras que un modelo de fibrosis, por CCl<sub>4</sub>, presenta una sobreexpresión hepática del miR-155; tanto CCl<sub>4</sub> sólo como en combinación con etanol. Asimismo, en un modelo de daño hepático agudo sobre crónico, con la inyección de lipopolisacárido bacteriano sumado a un tratamiento con CCl<sub>4</sub>, supone un marcado aumento de la expresión del miR-155, con una inducción de 40 veces respecto a animales control.



**Figura 18.** Expresión hepática del miR-155 en diferentes modelos de daño hepático. La expresión en hígado de miR-155 fue valorada por qPCR en (A) animales tratados con paracetamol (n=4) respecto a animales tratados con vehículo (n=6), (B) animales tratados con ConA (n=4) respecto a animales tratados con vehículo (n=6), (C) animales alimentados con dieta DDC durante 3 semanas (n=5) respecto a animales alimentados con dieta estándar (n=3), (D) animales con infusión intragástrica de etanol (n=3), animales tratados con CCl<sub>4</sub> durante dos semanas (n=5), animales tratados con CCl<sub>4</sub> más etanol (n=4) y animales con CCl<sub>4</sub> más inyección con LPS (n=4) respecto a animales tratados con vehículo (n=3); \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 respecto a sus controles.

A continuación quisimos averiguar qué célula era la responsable de esta marcada sobreexpresión hepática del miR-155, en el modelo de daño agudo sobre crónico. Sorprendentemente, de entre todas las poblaciones de células analizadas encontramos que los linfocitos T son los únicos que presentan una expresión del miR-155 significativamente superior, presentando  $5,08 \pm 1,13$  veces más expresión respecto al

hígado total. La relación entre el miR-155 y los linfocitos T está ampliamente descrita, pero no existe información en lo que al daño hepático se refiere.



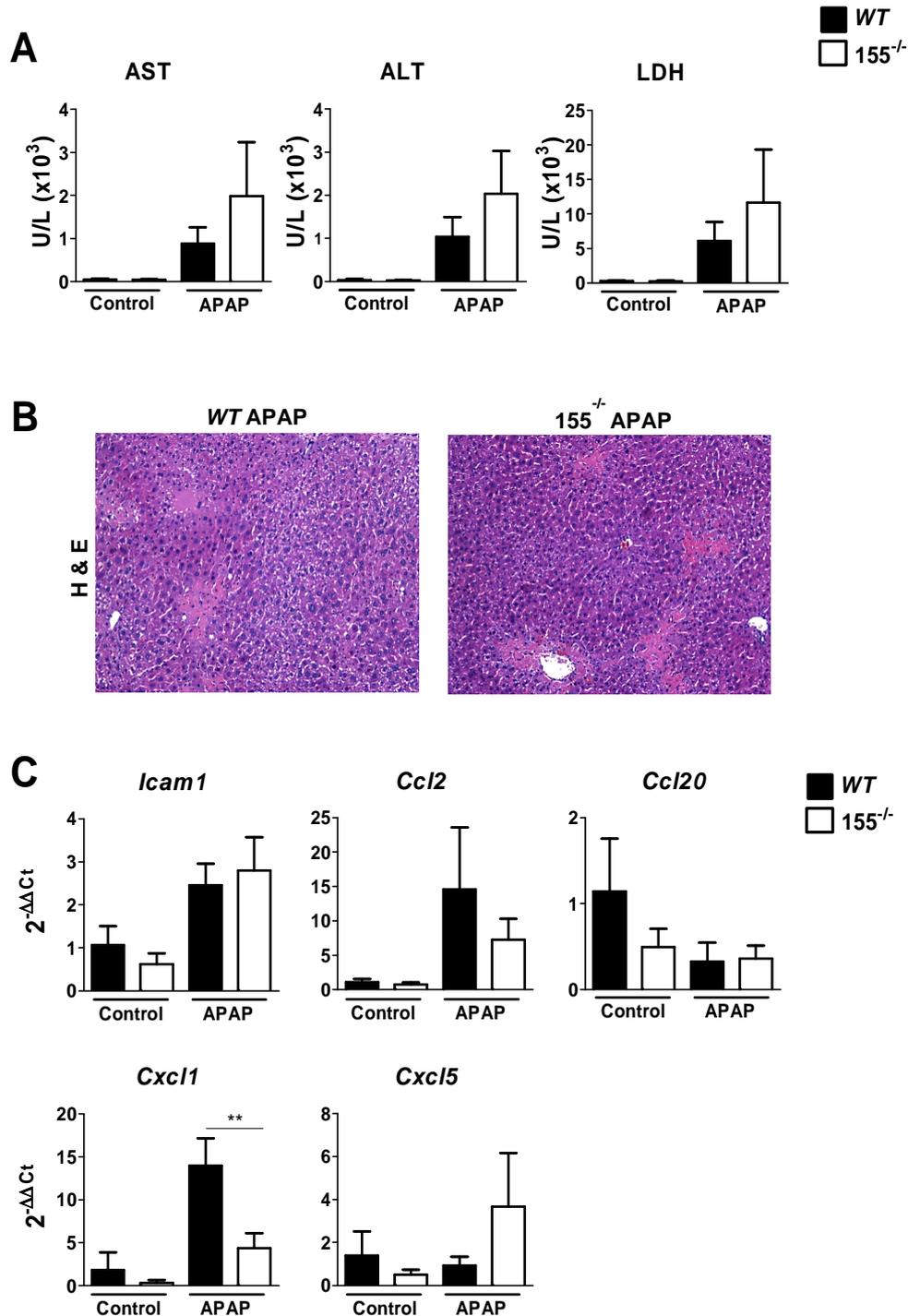
**Figura 19. Expresión del miR-155 en diferentes poblaciones celulares hepáticas en un modelo de daño agudo sobre crónico.** Las poblaciones celulares se aislaron del hígado de ratones tratados con CCl<sub>4</sub> durante dos semanas más una inyección con LPS (n=6), para el aislamiento de las poblaciones celulares se unieron la fracciones celulares de 2 ratones. La expresión del miR-155 se validó por qPCR en hígado total (n=6), hepatocitos (n=3), células estrelladas hepáticas (n=3), macrófagos (n=3), neutrófilos (n=3) y linfocitos T (n=3). \*\*\*p<0,001 respecto hígado total, #p<0,05 respecto todas las demás poblaciones celulares.

Los datos obtenidos a partir de muestras humanas conjuntamente con los datos en animales, sugieren que el miR-155 tiene un peso importante en el daño hepático mediado por inflamación.

### **La deficiencia del miR-155 aumenta el daño hepático agudo inducido por concanavalina A**

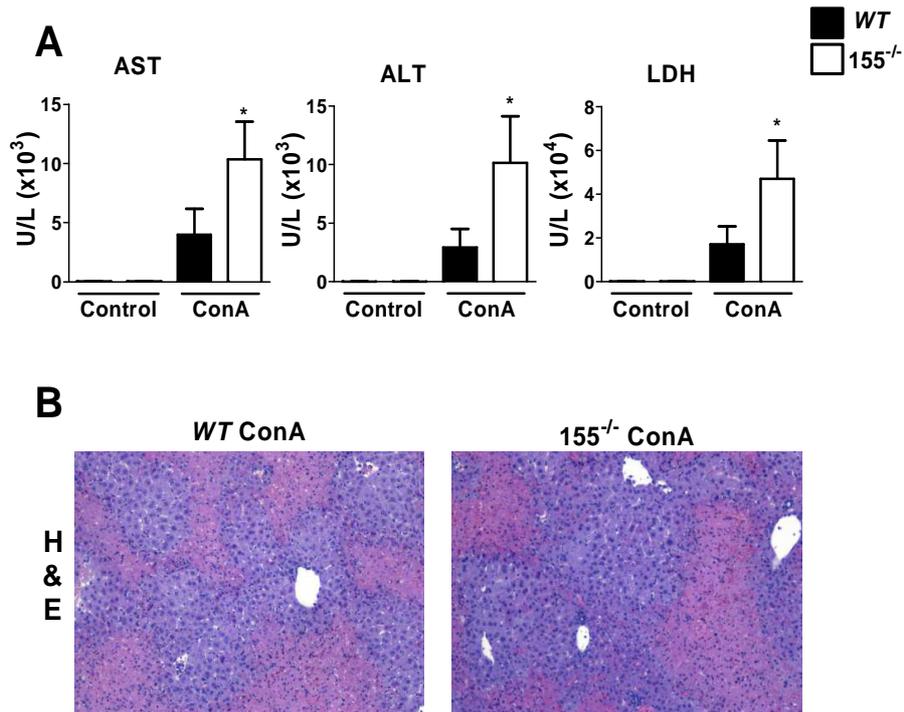
Con el fin de determinar el efecto de la expresión del miR-155 durante el daño hepático, se utilizaron ratones deficientes en el miR-155 (miR-155<sup>-/-</sup>), permitiéndonos estudiar el fenotipo hepático en ausencia de este miRNA. Para ello, se seleccionaron dos modelos con expresión hepática del miR-155 con componentes inflamatorios muy dispares. Se evaluó el efecto de la intoxicación por paracetamol (o APAP) y por concanavalina (ConA) en ratones deficientes en el miR-155 y ratones silvestres (Wild Type, *WT*).

La administración de APAP provocó un aumento de las transaminasas hepáticas (AST y ALT) y de LDH en el suero de los animales tratados. Los ratones deficientes en miR-155 mostraron mayores niveles de AST, ALT y LDH, pero dicho aumento no fue significativo, en comparación con ratones *WT* tratados con APAP (Figura 20). Histológicamente, tampoco se observaron diferencias en el hígado de ratones tratados, tanto en presencia como en ausencia del miR-155. A continuación, evaluamos la expresión hepática de genes de mediadores inflamatorios importantes. Curiosamente, la expresión de la mayoría de las citoquinas y mediadores inflamatorios no cambió en ratones miR-155<sup>-/-</sup> en comparación con *WT*, tras la intoxicación con APAP. Sólo la expresión de *Cxcl1* estaba significativamente alterada en ratones miR-155<sup>-/-</sup> tratados con APAP.



**Figura 20.** Efectos del APAP en ratones deficientes en el miR-155. El modelo consta de animales WT tratados con vehículo (n=6), WT tratados con APAP (n=4), animales miR-155<sup>-/-</sup> tratados con vehículo (n=6) y miR-155<sup>-/-</sup> tratados con APAP (n=7). (A) Niveles séricos de transaminasas hepáticas (B) Imágenes representativas de una tinción con hematoxilina y eosina (C) Expresión hepática de genes inflamatorios, \*\*p<0,01 respecto a animales WT tratados con vehículo.

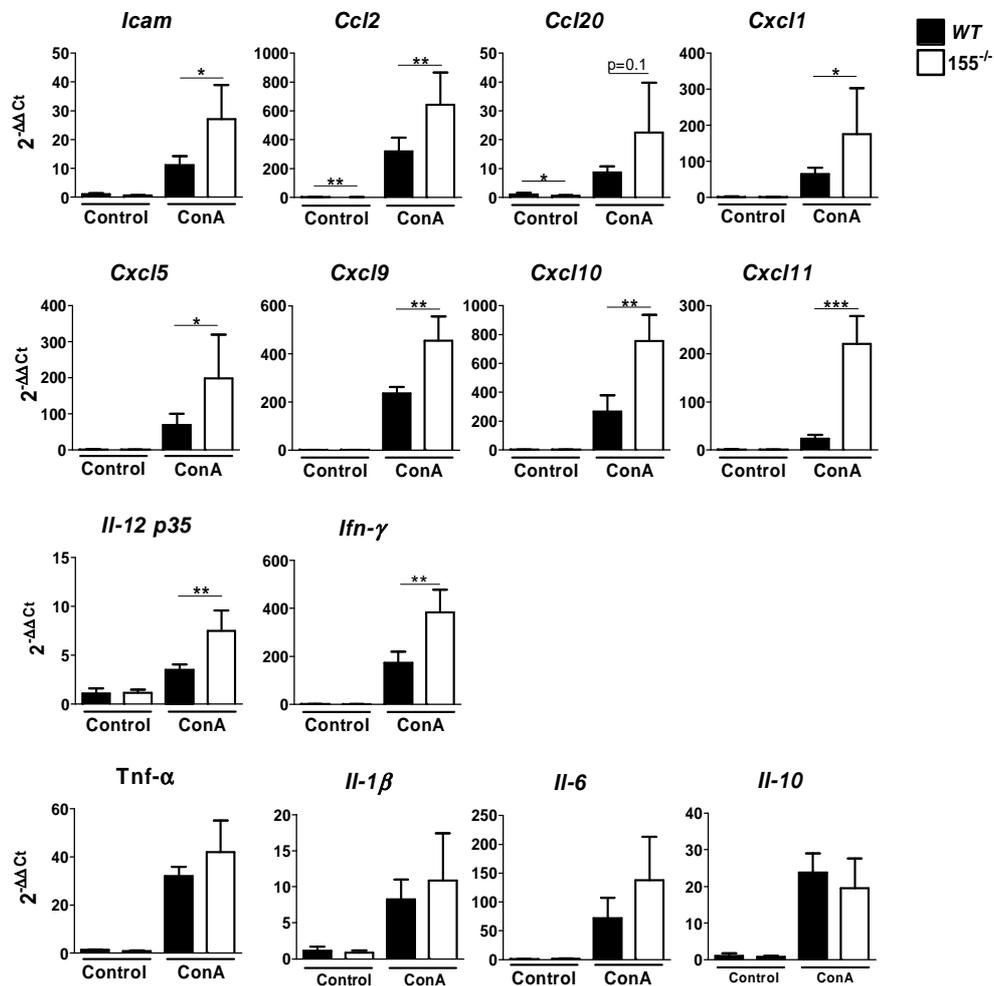
Seguidamente, se evaluó el efecto de la ConA en animales deficientes del miR-155. Como se muestra en la figura 21, se observó un aumento significativo en los niveles séricos de transaminasas y LDH en ratones *WT* con ConA, sin embargo este aumento fue sustancialmente superior en animales *155<sup>-/-</sup>* con ConA. Sorprendentemente, la evaluación histológica no mostró cambios importantes entre animales *WT* y *miR-155<sup>-/-</sup>* tratados con ConA.



**Figura 21. Transaminasas hepáticas e histología en el daño por ConA.** El modelo consta de animales *WT* tratados con vehículo (n=6), *WT* tratado con ConA (n=4), animales tratados con vehículo (n=6) y *miR-155<sup>-/-</sup>* tratados con ConA (n=5) (A) Niveles séricos de transaminasas hepáticas; \*p<0.05 respecto a *WT*-control. (B) Imágenes representativas de la tinción hematoxilina y eosina en hígado de ratones tratados con ConA.

Por otra parte, los animales *miR-155<sup>-/-</sup>* tratados con ConA mostraron marcadas diferencias en el nivel de expresión génica de mediadores inflamatorios, en comparación con animales *WT* (Figura 22). Los animales deficientes en el miR-155 tuvieron una expresión hepática significativamente aumentada de mediadores inflamatorios tales como *Icam1*, *Il-12* así como miembros de la familia de las

quimiocinas CXC y CCL como *Cxcl1*, *5*, *9*, *10*, *11*, *Ccl2* y *Ccl20*. En cambio, no se observaron diferencias en la expresión de *Tnf $\alpha$* , *IL1 $\beta$* , *IL-6* o *IL-10*.

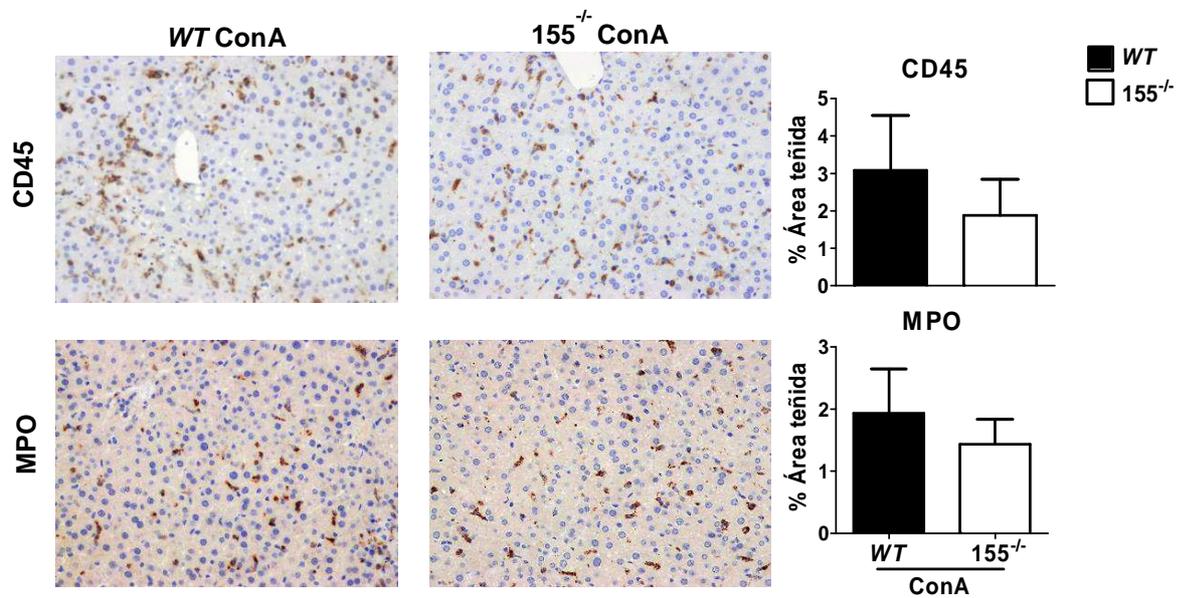


**Figura 22.** Expresión hepática de mediadores inflamatorios en el daño por ConA. La expresión hepática de genes inflamatorios fue evaluada por qPCR; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  respecto a WT-control.

Estos resultados sugieren que el efecto de la deficiencia del miR-155 en el daño hepático puede depender de su etiología, sobretodo del componente inflamatorio asociado al daño. Nuestros resultados apuntan a que el miR-155 tiene un papel más importante en el daño hepático mediada por células T, como es el caso de la hepatitis por ConA.

### La deficiencia del miR-155 altera el reclutamiento de células inflamatorias en el daño hepático

La expresión del miR-155 juega un papel importante en la diferenciación de las células inflamatorias y su reclutamiento[184]. Por ello, a continuación, evaluamos las poblaciones de células inflamatorias reclutadas en el hígado después del tratamiento con ConA en ratones *WT* y ratones deficientes en el miR-155. Inicialmente se evaluó la expresión en hígado del marcador pan-leucocitario CD45 y el marcador de neutrófilos mieloperoxidasa (MPO); se detectó una disminución, no significativa, en ratones *miR-155<sup>-/-</sup>* en comparación con *WT* (Figura 23).



**Figura 23. Reclutamiento hepático de células inflamatorias en el daño por ConA.** Imágenes representativas de inmunohistoquímica para la detección del marcador CD45 y la mieloperoxidasa (MPO) en ratones tratados con ConA. A la derecha de la figura se muestran las cuantificaciones de las zonas positivas para ambas tinciones.

A continuación se realizó un análisis más profundo de las diversas poblaciones reclutadas al hígado mediante aislamiento de las células inflamatorias y su detección por citometría de flujo. Como se muestra en la figura 24, el reclutamiento de las poblaciones de linfocitos  $CD8^+$  y  $CD4^+$  no cambió en los ratones  $miR-155^{-/-}$  después del daño hepático inducido por ConA, en comparación con ratones *WT* tratados con ConA. En cambio, la población  $CD4^+CXCR3^+$  (células T ayudadoras infiltrantes en tejido) disminuyó significativamente en ratones  $miR-155^{-/-}$  en comparación con *WT*. Por otra parte, la población  $F4/80^{low}CD11b^{mid}$  correspondiente a macrófagos derivados de monocitos, se incrementó ligeramente en el tejido hepático de ratones  $miR-155^{-/-}$  en comparación con *WT*. Por otra parte, el reclutamiento de la población de células NKT ( $CD3^+ NK1.1^+$ ) y de los monocitos  $F4/80^{high}CD11b^{high}$  variaron entre los hígados de ratones  $miR-155^{-/-}$  y ratones *WT* tratados con ConA.

Las células T reguladoras (Treg) son positivas para CD4 y CXCR3, por ello, se evaluaron los niveles de expresión de *Foxp3*, el factor de transcripción específico de células Treg. Interesantemente, la expresión hepática de *Foxp3* se redujo en los ratones  $miR-155^{-/-}$  en comparación con *WT*, tanto en  $miR-155^{-/-}$  no lesionados como en los tratados con ConA. Esto sugiere que una reducción de las Treg ( $CD4^+CXCR3^+$ ) podría ser, en parte, responsable de la exacerbada lesión hepática en ratones  $miR-155^{-/-}$ .

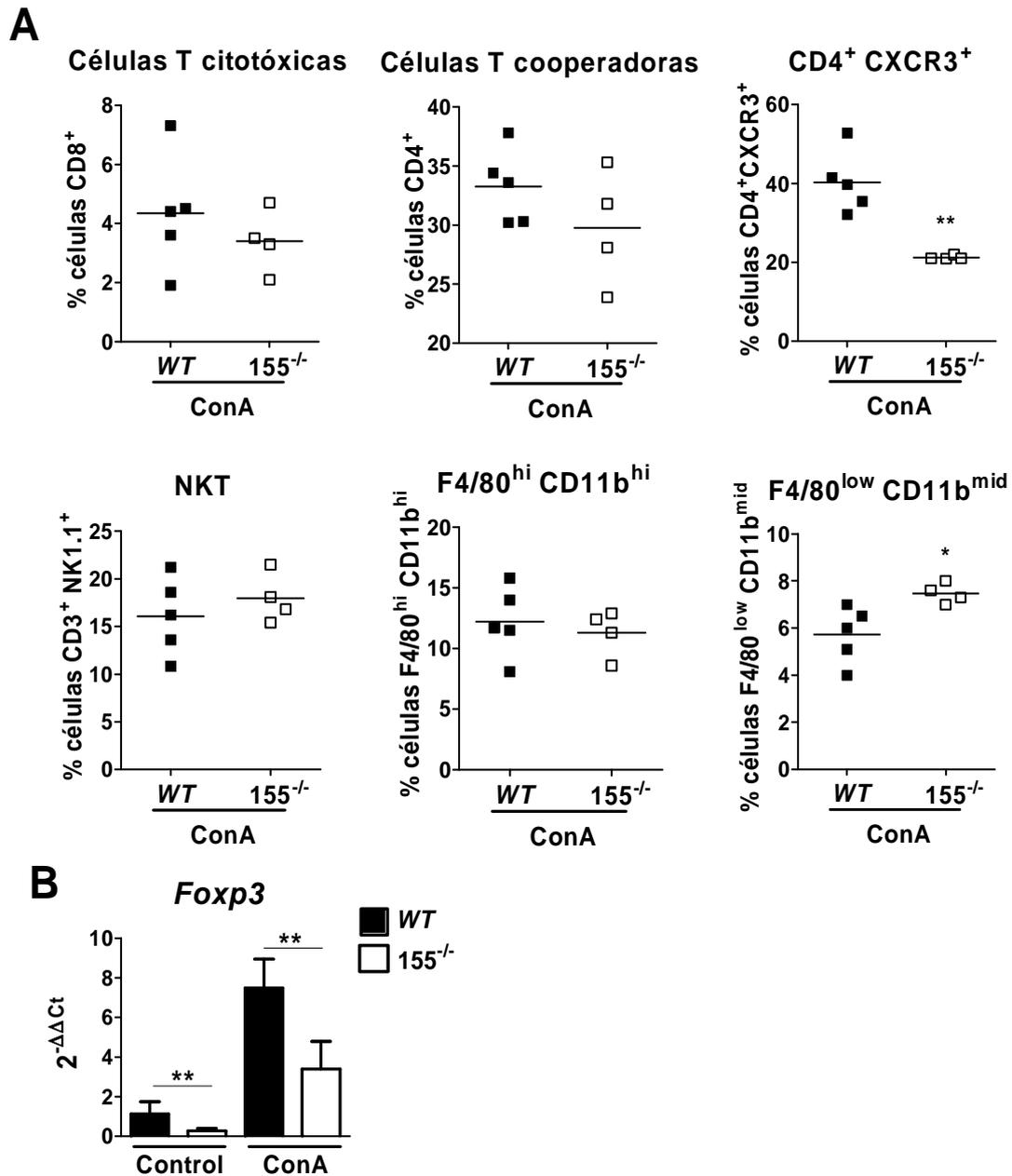


Figura 24. Reclutamiento hepático de células inflamatorias en un daño inducido por ConA.

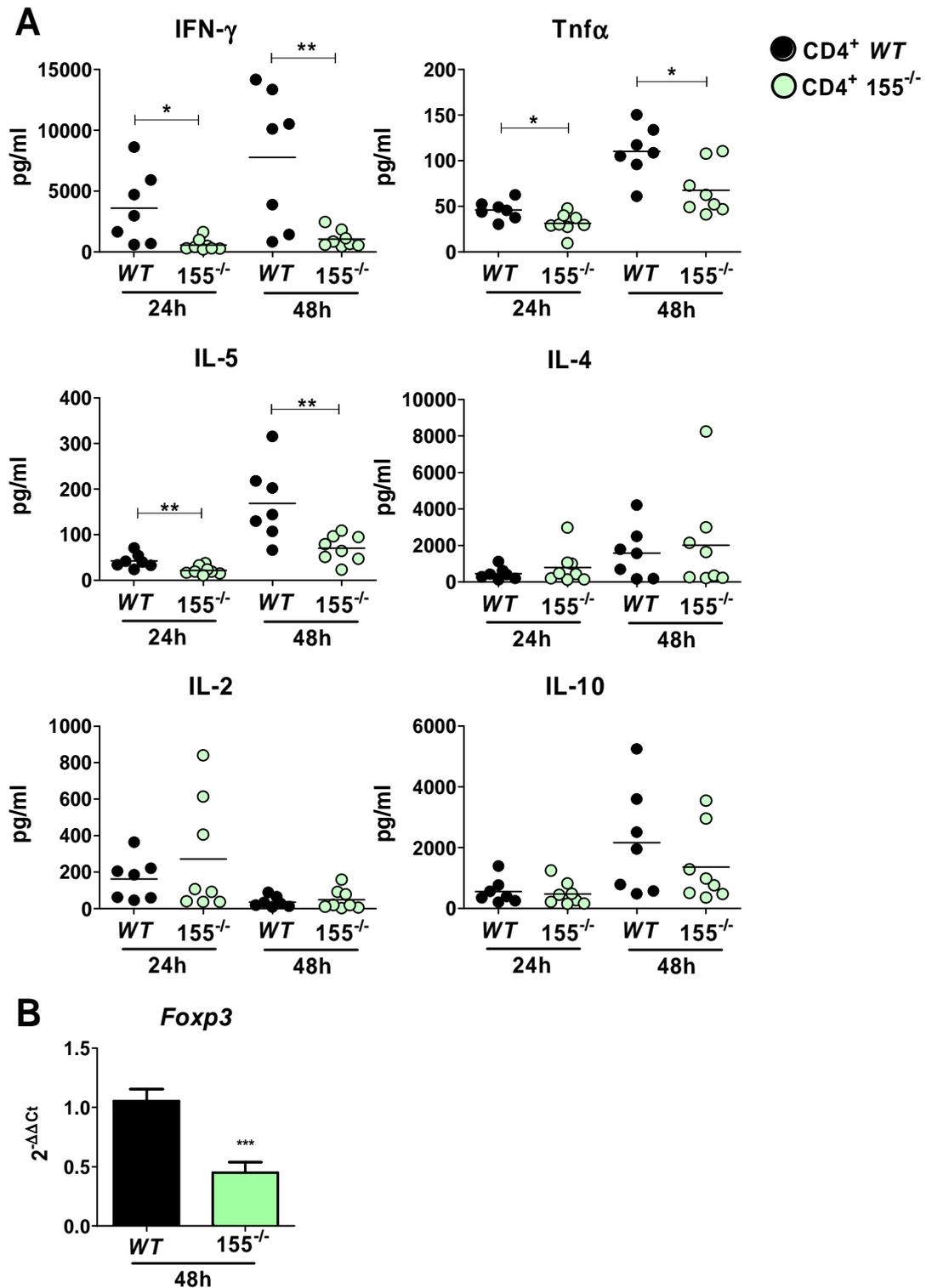
(A) Gráficas representando el porcentajes de células observados por citometría de flujo en los hígados de animales tratados con ConA; \*p<0.05, \*\*p<0.01 respecto WT-ConA. (B) Expresión hepática del gen *Foxp3* valorada por qPCR; \*\*p<0.01.

### Efectos de la deficiencia de miR-155 en células CD4<sup>+</sup>

Para comprender mejor el papel que la deficiencia del miR-155 puede tener en las células T cooperadoras, aislamos células CD4<sup>+</sup> del bazo de ratones *WT* y miR-155<sup>-/-</sup>, previamente tratados con ConA. Tras cultivar y estimular las células CD4<sup>+</sup> evaluamos el perfil de citoquinas en sobrenadante. Evaluamos IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2 que son mediadores principalmente producidos por el subgrupo Th1, por otro lado medimos IL-5 e IL-4 más características de las células Th2 y por último IL-10 típicamente asociada a las células Treg.

Las células CD4<sup>+</sup> deficientes en el miR-155 produjeron menos IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-5 que las células *WT* CD4<sup>+</sup>, a las 24 o 48 horas. En cambio, no se observaron diferencias en los niveles de IL-2, IL-4 e IL-10 entre las CD4<sup>+</sup> *WT* y las CD4<sup>+</sup> miR-155<sup>-/-</sup>. Curiosamente, las células CD4<sup>+</sup> deficientes en el miR-155 mostraron una menor expresión del gen *Foxp3* (Figura 25), reforzando la idea de que la expresión del miR-155 es importante para la diferenciación a Treg [185,186].

Estos resultados apoyan los estudios que postulan que la expresión del miR-155 es determinante para la correcta activación y proliferación de los linfocitos T. Los resultados aquí presentados sugieren que los linfocitos CD4<sup>+</sup> deficientes en miR-155 son incapaces de activarse y/o diferenciarse correctamente ante un estímulo. Por tanto, una correcta expresión del miR-155 en los linfocitos T podría ayudar a su correcta diferenciación y actuación frente al daño hepático.

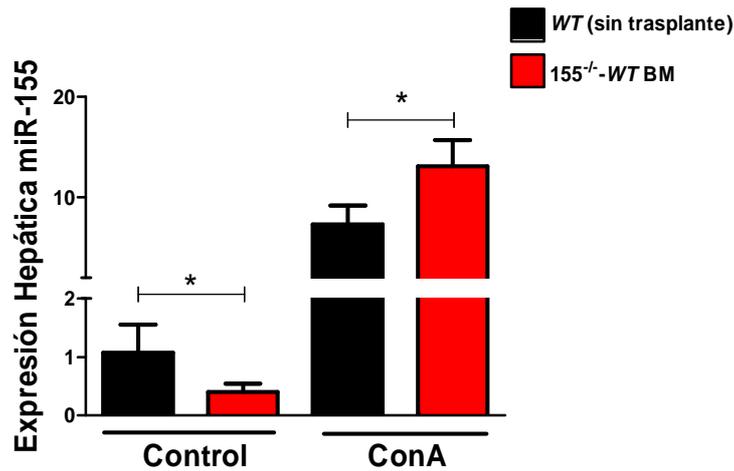


**Figura 25.** Perfil de mediadores inflamatorios en células CD4<sup>+</sup> miR-155<sup>-/-</sup> y CD4<sup>+</sup> WT. Las células se aislaron del bazo de animales WT (n=8) o animales miR-155<sup>-/-</sup> (n=8) tratados con ConA. (A) Se determinó la cantidad (pg/ml) de citoquinas presentes en el sobrenadante a las 24 o 48 horas del cultivo y estimulación. (B) Expresión del gene *Foxp3* determinada por qPCR en células CD4<sup>+</sup> a las 48 horas; \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

**El restablecimiento de la expresión del miR-155 en células inflamatorias reduce el daño hepático en ratones miR-155<sup>-/-</sup>**

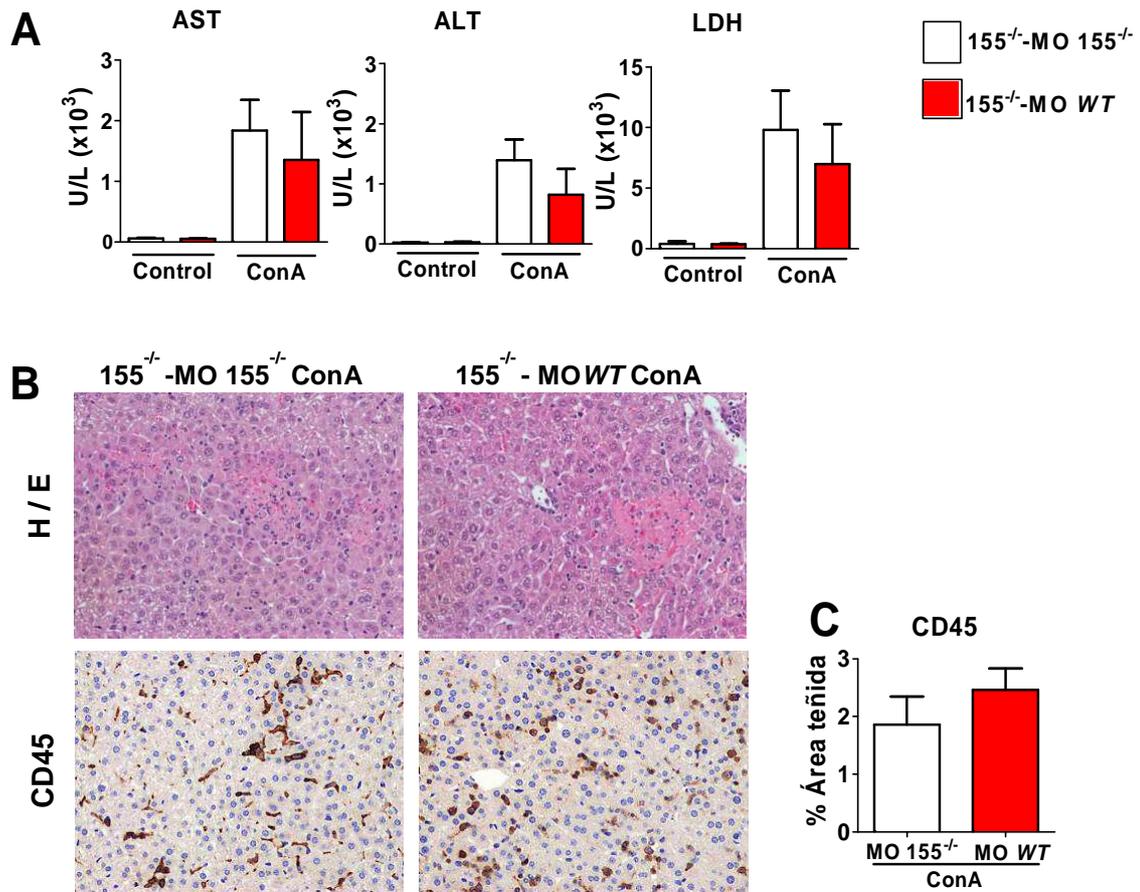
Con el fin de comprender mejor el papel de la expresión del miR-155 en las células inflamatorias y su papel en el daño hepático, se realizó un trasplante de médula ósea (MO) en animales miR-155<sup>-/-</sup>. Se trasplantó médula aislada de animales *WT*, genéticamente compatibles, es decir médula capaz de expresar miR-155 en animales miR-155<sup>-/-</sup>. El porcentaje de quimera de las células CD45 tras el trasplante fue del 71,8 ± 8,2% en ratones miR-155<sup>-/-</sup> - MO *WT*. Como grupo control se utilizaron animales miR-155<sup>-/-</sup> trasplantados con médula ósea miR-155<sup>-/-</sup>.

En primer lugar, comprobamos si el trasplante de medula ósea *WT* era capaz de restaurar los niveles del miR-155 en el hígado de los ratones deficientes en el miR-155. Observamos que los animales miR-155<sup>-/-</sup>-MO *WT* tratados con vehículo tenían expresión del miR-155 en el hígado, pero esta expresión era significativamente inferior comparada con la del hígado de un ratón *WT*. Seguidamente, miramos los niveles del miR-155 tras el tratamiento con ConA. Sorprendentemente, los niveles de miR-155 en ratones miR-155<sup>-/-</sup>-MO *WT* eran mayores que en un hígado *WT*, ante el mismo tratamiento (Figura 26). Esto sugiere que aunque existe una expresión endógena del miR-155 en el hígado, la sobreexpresión hepática frente al daño hepático por ConA se debe a la expresión del miR-155 en células mieloides.



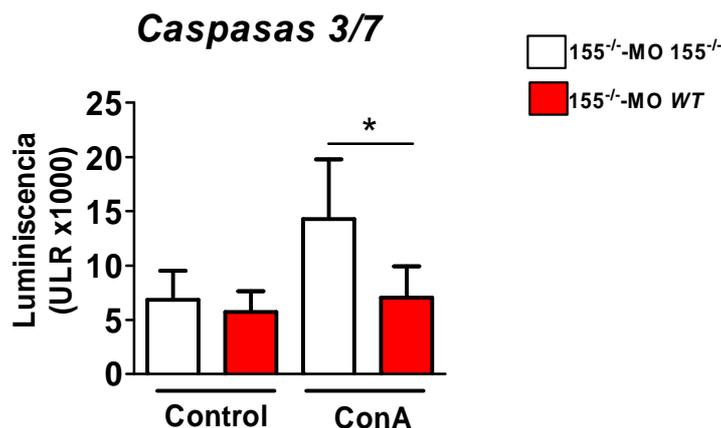
**Figura 26.** Comparación de la expresión hepática del miR-155 entre animales *WT* y animales *miR-155<sup>-/-</sup>* trasplantados con médula *WT*. La expresión del miR-155 se determinó por qPCR en animales *WT* (n=3) y en animales deficientes en miR-155 con médula ósea *WT* (*155<sup>-/-</sup>-MO WT*, n=5), \*p<0,05.

Seguidamente analizamos y comparamos la respuesta de los animales deficientes en el miR-155, trasplantados con médula *WT* (*155<sup>-/-</sup>-MO WT*) o con médula también deficiente en el miR-155 (*155<sup>-/-</sup>-MO 155<sup>-/-</sup>*). Como se muestra en la figura 27, aunque los niveles séricos de AST, ALT y LDH se redujeron, esta reducción no fue estadísticamente significativa. Tampoco se observaron cambios histológicos importantes en ratones *miR-155<sup>-/-</sup>* trasplantados con médula ósea *WT* respecto a *miR-155<sup>-/-</sup>-MO 155<sup>-/-</sup>*. El reclutamiento de células mieloides fue igual en ambos grupos como se observó por tinción de CD45.



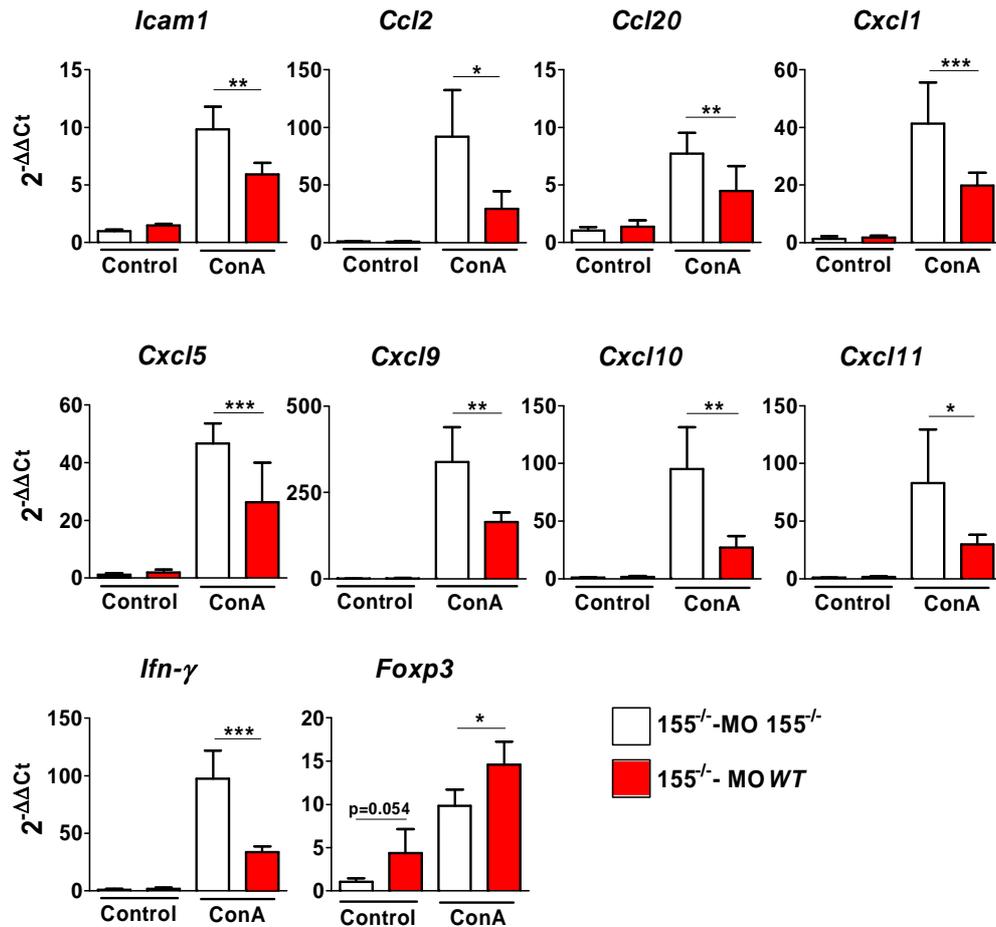
**Figura 27. Respuesta al tratamiento por ConA en animales 155<sup>-/-</sup> trasplantados.** El modelo fue realizado en animales 155<sup>-/-</sup> -MO 155<sup>-/-</sup> con vehículo (n=4), 155<sup>-/-</sup> -MO 155<sup>-/-</sup> con ConA (n=4), 155<sup>-/-</sup> -MO WT con vehículo (n=5) y 155<sup>-/-</sup> -MO WT con ConA (n=4). (A) Los niveles de AST, ALT y LDH fueron evaluados en suero. (B) Imágenes representativas de tinción por hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica para CD45 en el hígado de los ratones tratados con ConA. (C) Cuantificación de las áreas teñidas positivamente para CD45 en animales tratados con ConA.

Seguidamente evaluamos la apoptosis e interesantemente encontramos una reducción significativa de la actividad de las caspasas 3 y 7 en los ratones miR-155<sup>-/-</sup> trasplantados con médula ósea WT, apoyando que la correcta expresión del miR-155 en las células inflamatorias reclutadas reduce la apoptosis y por tanto reduce el daño hepático.



**Figura 28. Efecto de la expresión del miR-155 en médula ósea sobre la mortalidad hepatocelular.** La muerte hepatocelular se midió a través de la actividad de las caspasas 3 y 7 en el hígado de los animales trasplantados. \* $p < 0,05$  respecto el grupo 155<sup>-/-</sup>-MO 155<sup>-/-</sup> control.

Además, se redujo el nivel de expresión génica de la mayoría de los mediadores inflamatorios (es decir, *Icam1*, *Ccl2*, *Ccl20*, *Cxcl1*, *5*, *9*, *10*, *11* e *Ifn- $\gamma$* ) en ratones miR-155<sup>-/-</sup> trasplantados con médula ósea de animales WT. Es importante destacar que la expresión de *Foxp3* se incrementó en ratones miR-155<sup>-/-</sup> trasplantados con médula ósea WT, lo que refuerza la idea de que el reclutamiento de células Treg puede ser parcialmente responsable del grado de daño hepático en este modelo. En general, estos resultados *in vivo* muestran que el trasplante de médula ósea WT en ratones miR-155<sup>-/-</sup> revierte su fenotipo en el daño hepático agudo, y sugieren fuertemente que la expresión del miR-155 en células inflamatorias determina el grado de inflamación en el hígado.



**Figura 29. Expresión hepática de genes de mediadores inflamatorios en animales trasplantados.** Se evaluó por qPCR la expresión de diversos genes inflamatorios en el hígado de los animales trasplantados. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  respecto el grupo 155<sup>-/-</sup>-MO 155<sup>-/-</sup> con vehículo.

Los resultados de este segundo estudio muestran que existe una discrepancia en la expresión del miR-155 entre el hígado y las células inflamatorias en situaciones de daño hepático. Pero además los resultados *in vivo* nos muestran que el miR-155 es importante para un correcto reclutamiento de células inflamatorias y una correcta respuesta de los linfocitos T. Interesantemente, una restauración de la expresión del miR-155 en las células inflamatorias en animales miR-155<sup>-/-</sup> fue capaz de aliviar el daño y la inflamación hepática. Esto sugiere que restaurar la expresión del miR-155 en células inflamatorias de pacientes podría ser una interesante herramienta para disminuir el daño hepático.

# DISCUSIÓN

---



Esta tesis doctoral ha permitido profundizar en el conocimiento de los miRNAs hepáticos, en particular en aquellos desregulados en la enfermedad hepática. Hemos mostrado que la HA está caracterizada por un importante cambio en la expresión de los miRNAs, con 117 miRNAs desregulados. Hemos comparado este perfil de miRNAs en HA con perfiles en otras enfermedades hepáticas crónicas y hemos obtenido un grupo de miRNAs específicamente desregulados en la HA y por tanto potencialmente involucrados en la patofisiología de esta enfermedad. Además, mediante el análisis integrativo de los genes y los miRNAs desregulados en la HA, hemos podido identificar las vías clave de la HA potencialmente controladas por miRNAs.

Al mismo tiempo, hemos identificado al miR-182 y al miR-155 como importantes reguladores de la fisiopatología de la HA. El miR-182 fue inicialmente seleccionado por su alta expresión hepática en los pacientes con HA y posteriormente se demostró la correlación de su expresión con la severidad de la enfermedad y con un peor pronóstico. Los experimentos *in vivo* e *in vitro* indican que el miR-182 está relacionado con el daño colangiolar y la inflamación hepática. A su vez, hemos observado una sobreexpresión del miR-155 en la HA y la HAI principalmente; sin embargo hemos detectado una bajada de su expresión en células inflamatorias circulantes. Los datos *in vivo* han confirmado la importancia de la expresión del miR-155 en las células inflamatorias frente a un daño hepático; y hemos mostrado como una restauración de la expresión del miR-155 en células de la médula ósea podría ayudar a mitigar el daño y la inflamación en el hígado.

En el primer estudio se realizó un análisis transcriptómico de miRNAs para identificar aquellos que podrían estar particularmente involucrados en la patogénesis de la HA, para ello se incluyeron pacientes con *ALD-CH*, *HCV-CH* y *NASH-CH* en el análisis de los miRNAs hepáticos. Este diseño nos permitió, no solamente tener una visión global de los miRNAs desregulados en la HA sino también identificar un grupo de miRNAs desregulados específicamente en la HA en comparación con otras enfermedades crónicas del hígado. Dicho grupo está compuesto por 18 miRNAs, entre ellos el miR-182, lo que ya indicaba su potencial relevancia en la fisiopatología de la HA. Por el contrario, el miR-155 no se encontró entre los 18 miRNAs específicamente desregulados en la HA. Gracias al perfil de miRNAs en la HA también hemos podido

identificar, y posteriormente validar, la expresión hepática en HA de miRNAs como el miR-21 y el miR-214. Estos resultados confirman que estos miRNAs están involucrados en vías clave de las enfermedades hepáticas, donde habían sido previamente descritos; por ejemplo el miR-21 es conocido por regular la fibrosis [137,138] y la regeneración hepática [187,188]. Por otra parte, el miR-214 se ha descrito recientemente como un regulador de la fibrogénesis hepática mediante comunicación intercelular por exosomas [189].

Con el fin de identificar las vías o procesos fisiológicos en los que están involucrados los miRNAs específicamente desregulados en la HA, realizamos un análisis integrativo que nos permitiera conocer los potenciales genes diana de dichos miRNAs. La integración del perfil de expresión de miRNAs con el perfil transcriptómico en muestras pareadas de hígados de pacientes con HA identificó los potenciales genes dianas de los miRNAs involucrados en la HA. Posteriormente hallamos que los potenciales genes diana están implicados en el metabolismo de los ácidos biliares, el transporte y el metabolismo de xenobióticos. Conocer los genes dianas de estos miRNAs en el contexto de la fisiopatología de la HA nos da información sobre las vías desreguladas en esta enfermedad, sugiriendo como nuevas dianas terapéuticas no sólo a los miRNAs sino también a los genes diana.

La HA consiste en un episodio agudo que se produce sobre un hígado con enfermedad alcohólica crónica. Determinar los eventos que propician que un paciente con enfermedad hepática alcohólica desarrolle una HA es sumamente importante. Por ello, en este estudio, quisimos identificar miRNAs diferencialmente desregulados en la HA frente a la enfermedad hepática crónica por alcohol (*ALD-CH*). Con esta finalidad, comparamos ambos perfiles de expresión de miRNAs. Interesantemente, 51 miRNAs aparecieron desregulados en la HA frente a *ALD-CH*. El miR-182 apareció en esta comparativa como diferencialmente expresado entre ambos grupos. Sin embargo, la posterior validación de la expresión del miR-182 por qPCR, en pacientes con HA y *ALD-CH* no mostró diferencias estadísticamente significativas. Esto tampoco resulta sorprendente si tenemos en cuenta que los pacientes descompensados con *ALD-CH* tienen altos niveles de fosfatasa alcalina, bilirrubinostasis y reacción ductular; procesos

que también se encuentran en los pacientes con HA y que están potencialmente regulados por miRNAs como el miR-182.

Poco se sabe sobre el papel del miR-182 en la fisiología y la enfermedad del hígado [149,190,191]. Principalmente el miR-182 se ha relacionado con el desarrollo del cáncer y metástasis en varios tipos de cáncer [192,193], incluyendo el carcinoma hepatocelular y metástasis hepáticas [194,195]. En el contexto de la carcinogénesis, se ha descrito que el miR-182 promueve la invasión celular, la proliferación celular y la angiogénesis. Nosotros, en cambio, hemos identificado el miR-182 como uno de los miRNAs clave, diferencialmente expresados en la HA. La expresión del miR-182 se correlaciona con la gravedad de la enfermedad y un peor pronóstico de los pacientes con HA. En las células del hígado, nuestros datos *in vitro* sugieren que el miR-182 puede tener un papel relevante en los colangiocitos, promoviendo la expresión de mediadores inflamatorios, pero también en hepatocitos y macrófagos en los que el miR-182 induciría la expresión de *IL-6*. El miR-182 se ha propuesto como biomarcador en diversos tipos de cáncer ya que varios estudios observan su presencia en la circulación sanguínea [196–198]. Asimismo, en este estudio encontramos el miR-182 aumentado en sangre de pacientes con HA, no obstante, su insuficiente correlación con los índices de gravedad de la enfermedad y con el pronóstico de los pacientes, no respaldan al miR-182 como un biomarcador de utilidad en el contexto de la HA. La expresión de miRNAs clave durante la progresión de la enfermedad hepática alcohólica debería seguir estudiándose, utilizando cohortes más grandes de pacientes.

Como hemos discutido anteriormente, la fisiopatología de la HA se solapa con la de la enfermedad hepática alcohólica, pero teniendo también características propias. Todo este complejo escenario es difícilmente reproducible en un único modelo animal y, aunque en los últimos años se han intentado desarrollar modelos lo más próximos posibles [178,199], ningún modelo animal reúne todas las características de la fisiopatología de la HA. Esto limita poder estudiar los miRNAs adecuadamente en un sólo modelo *in vivo*, y por esta razón, en esta tesis, se han utilizado diversos modelos animales representando las diferentes características de la HA, como fibrosis, reacción ductular, endotoxemia, etc. De esta forma, intentamos acercarnos lo máximo posible a conocer la respuesta de los miRNAs frente a la fisiopatología de la HA. En el trascurso

del primer estudio, para superar esta limitación y poder identificar los posibles mecanismos detrás de la sobreexpresión del miR-182, se siguieron dos estrategias. En primer lugar, se evaluó la correlación de la expresión del miR-182 con los datos histológicos y clínicos de los pacientes con HA; y en segundo lugar, evaluamos su expresión en diferentes modelos animales de daño hepático, cada uno de los cuales es un modelo bien establecido de los mecanismos clave en el daño hepático y su resolución, como son la fibrosis, la reacción ductular, la colestasis, la inflamación o el daño por alcohol. Tanto los datos clínicos como los datos obtenidos de modelos animales sugieren que el miR-182 se asocia con el daño colangiolar y con la reacción ductular, ambas características directamente relacionadas con la patogénesis la HA y su pronóstico[12,57]. Asimismo, encontramos que el miR-182 está principalmente expresado en las células de la reacción ductular, lo que refuerza su relación con esta característica clave de la HA.

Para explorar los efectos del miR-182 *in vivo*, se realizó un estudio de pérdida de función, utilizando un *Decoy* específico para el miR-182. Este enfoque es particularmente interesante, ya que permiten el bloqueo específico a largo plazo del miRNA deseado. El tratamiento de animales alimentados con DDC, con un *Decoy*-182 provocó una reducción significativa de las transaminasas así como de los niveles séricos de LDH, lo que sugiere la implicación del miR-182 en el daño hepático. Sorprendentemente, tanto los ácidos biliares totales en el tejido hepático como los niveles séricos de fosfatasa alcalina, conocido marcador de colestasis e indicador de la retención de ácidos biliares, se redujeron en animales tratados con *Decoy*-182. Estos resultados sugieren que la inhibición del miR-182 tuvo un efecto sobre el contenido de ácidos biliares y la colestasis, los cuales son agentes citotóxicos que dan lugar a daño hepático e inflamación [200–202]. La disminución del daño hepático y la inflamación en ratones tratados con *Decoy*-182 podría ser un efecto indirecto de la reducción de los ácidos biliares hepáticos. Desvelar si, el miR-182 está regulando directamente genes implicados en el metabolismo y transporte de ácidos biliares, como si sólo está indirectamente asociado con el contenido de ácidos biliares necesita ser estudiado con mayor profundidad. Los resultados *in vivo* sugieren que la inhibición del miR-182 puede ser un objetivo prometedor para la HA, sin embargo se ha de ser cauteloso al

proponer un miRNA como potencial diana terapéutica ya que los miRNAs tiene efectos pleiotrópicos y se expresan en varios tejidos. Estudios futuros deberían confirmar que el miR-182 es una buena diana terapéutica para la HA, sin provocar la aparición de efectos secundarios.

En el segundo estudio profundizamos en la investigación del papel del miR-155, el cual estaba aumentado en el hígado de diversas enfermedades hepáticas crónicas. La gran cantidad de estudios relacionando la desregulación del miR-155 con el sistema inmune y con la diferenciación de varias células inflamatorias [185,186,203,204] nos hizo centrar nuestro interés en él, ya que la inflamación es un proceso clave en la HA pero especialmente en el desarrollo de las enfermedades hepáticas. Por lo tanto, decidimos investigar el papel del miR-155 en la fisiopatología del hígado de pacientes con HA y pacientes con HAI; intentando esclarecer la relación entre la desregulación del miR-155 y la inflamación o el daño hepático.

En condiciones fisiológicas, el miR-155 se expresa principalmente en el timo y el bazo, mientras que es prácticamente indetectable en otros tejidos [205]; sin embargo su expresión está desregulada en una amplia gama de enfermedades como neoplasias, diversos tipos de cáncer, enfermedades intestinales, etc. [206–209] Por lo tanto, la comprensión del papel de miR-155 es compleja, particularmente en enfermedades multifactoriales tales como las enfermedades hepáticas.

Nuestros resultados en muestras humanas indican una desregulación de la expresión del miR-155 en tejido hepático y en células inflamatorias durante la enfermedad hepática. Interesantemente, mientras que la expresión en el tejido hepático de los enfermos está aumentada, se encontró una marcada reducción de la expresión en las PBMCs (compuestas por linfocitos y monocitos). Las muestras de hígado y PBMCs de pacientes con HA son muestras pareadas, con lo que podemos afirmar que la expresión del miR-155 es antagónica entre el hígado y las células inflamatorias circulantes en estos pacientes. Sin embargo, en el caso de los pacientes con HAI no se pudieron obtener muestras pareadas. Mientras que las muestras de hígado pertenecen a pacientes con un brote agudo de HAI, las muestras de PBMCs corresponden a pacientes con una HAI en estado crónico, sometidos a tratamiento con

prednisona y azatioprina. Aunque nuestros resultados sean relevantes, sería necesaria la inclusión de muestras de PBMCs de pacientes con HAI en fase aguda para poder corroborar los resultados observados en pacientes tratados. Asimismo, los resultados en muestras humanas deberían ser validados en cohortes mayores de pacientes con el fin de esclarecer la relación entre el miR-155 y los parámetros clínicos y/o los pronósticos de los enfermos.

Como ya hemos explicado, la HA carece de un modelo animal capaz de representar todas las características clave de su fisiopatología. Por ello, para conocer la respuesta del miR-155 a los mecanismos de la HA, se evaluó su expresión en los modelos animales anteriormente mencionados, de fibrosis, intoxicación por etanol, reacción ductular, etc. Nuestros resultados muestran que existe una desregulación del miR-155 frente a todas las características clave de la HA, pero de manera muy destacada en un modelo de fibrosis más endotoxemia. Asimismo, en un modelo de daño agudo mediado por linfocitos T, modelo representativo de la HAI, también encontramos una sobreexpresión muy significativa de la expresión hepática del miR-155. Estos datos en modelos animales indican que existe una mayor desregulación hepática del miR-155 en aquellos modelos con mayor respuesta inflamatoria.

Con el fin de evaluar el papel del miR-155 en el daño hepático, se investigó el impacto de la deficiencia del miR-155 en dos modelos animales de daño hepático agudo con diferentes mecanismos de acción. Mientras que la lesión hepática inducida por paracetamol se inicia con la necrosis de los hepatocitos, activando los monocitos hepáticos y atrayendo otras células inflamatorias [210]; en cambio, el daño producido por ConA radica principalmente en un daño inmunológico debido a un rápido reclutamiento de linfocitos T en el hígado provocado por la activación de las células de Kupffer [182,211]. Curiosamente, mientras que los ratones deficientes en el miR-155 tratados con paracetamol no mostraron un aumento significativo del daño hepático, los ratones miR-155<sup>-/-</sup> sí eran más susceptibles al daño hepático inducido por ConA. Estos resultados sugieren la importancia de la expresión del miR-155 en las células inflamatorias cuando se produce un daño en el hígado por ConA, el cual simula una HAI. Además, demostramos que este miRNA juega un papel importante en el daño

hepático mediado por linfocitos T, modulando la extensión del daño y el reclutamiento de células inflamatorias.

Uno de los principales hallazgos de este estudio es la reducción del reclutamiento de células  $CD4^+CXCR3^+$  en ratones con deficiencia del miR-155 tratados con ConA. El receptor CXCR3 se expresa principalmente en Th1, pero a su vez se expresa en las células T reguladoras que se movilizan hasta los tejidos[212]. Estos resultados concuerdan con otros estudios que muestran un menor número de células Tregs en el bazo y el timo de ratones deficientes en el miR-155, sugiriendo que el miR-155 puede estar involucrado en el desarrollo y la función de las células T reguladoras [213]. Además, también hemos observado una reducción de la expresión hepática de *Foxp3* en ratones miR-155<sup>-/-</sup> tratados con ConA. En conjunto, estos resultados sugieren un reclutamiento reducido de células T reguladoras en este contexto. Consecuentemente, el trasplante de médula ósea *WT* en animales miR-155<sup>-/-</sup> restauró la expresión de *FoxP3*, destacando el potencial papel del miR-155 en el mantenimiento de la población Treg.

Para corroborar que la respuesta de linfocitos T colaboradores estaba influenciada por la expresión del miR-155, aislamos células  $CD4^+$  del bazo después de un daño por ConA y evaluamos su perfil de citoquinas. Observamos una reducción tanto de citoquinas inflamatorias como anti-inflamatorias, además de un descenso en la expresión génica de *Foxp3*. Nuestros resultados coinciden con otros estudios anteriores que han descrito el papel del miR-155 en la regulación de la maduración y la función de las células  $CD4^+$ , alterando así su respuesta [214–218]. Estos resultados sugieren la importancia de la expresión del miR-155 en la respuesta inflamatoria de los linfocitos T.

Con el fin de dilucidar si la expresión del miR-155 en las células inflamatorias puede determinar el daño hepático realizamos un trasplante de médula ósea, permitiéndonos evaluar el papel del miR-155 en las células inflamatorias frente a daño hepático. Aunque el quimerismo de la médula ósea injertada no fue del 100%, los efectos fueron notables. Curiosamente, en animales miR-155<sup>-/-</sup> con médula *WT* no se encontraron cambios en la infiltración global, evaluada por CD45, pero la expresión de

citoquinas proinflamatorias se redujo de forma contundente y significativa, mientras que la expresión de *Foxp3* se incrementó. Interesantemente, el trasplante de médula ósea normal en animales miR-155<sup>-/-</sup> consiguió reducir también el daño hepático. Estos resultados *in vivo*, sumados a los resultados encontrados en muestras humanas, sugieren que una correcta expresión del miR-155 en las células inflamatorias puede desempeñar un papel importante en la respuesta inflamatoria hepática.

Nuestros resultados no excluyen un papel del miR-155 en las células y el tejido hepático. Por el contrario, hemos observado que el miR-155 se expresa en el tejido hepático humano y de ratón y que su expresión aumenta con la lesión hepática aguda por ConA y en enfermedades hepáticas agudas o crónicas. Estas observaciones sugieren que el miR-155 puede tener un papel pleiotrópico en el contexto de la lesión hepática, y que una expresión correcta en el tejido hepático y las células inflamatorias puede ser importante en la enfermedad hepática. A su vez, profundizar en la implicación de los miRNAs en cada una de las células hepáticas que lo expresan nos daría más información de cómo estos miRNAs contribuyen a la enfermedad.

Estudios recientes, incluyendo nuestro primer estudio, han demostrado que la expresión del miR-155 se induce en tejido hepático y se detecta en la circulación en enfermedades hepáticas crónicas [128,219,220]. Estos estudios no sólo sugieren que el miR-155 puede desempeñar un papel en la progresión de las enfermedades hepáticas, sino también sugieren que puede ser un potencial biomarcador. En concreto, *Bala* y colaboradores han descrito que la deficiencia del miR-155 mitiga la inflamación y la esteatosis hepática en un modelo de fibrosis inducida por CCl<sub>4</sub>, así como en un modelo de ingesta de etanol [131]. Estos resultados que pueden parecer contradictorios a nuestro estudio, pero creemos que podrían ser debidos a una diferente regulación del miR-155 dependiendo de la duración del daño o dependiendo de las células que participan en dicho daño o enfermedad. En primer lugar, los tipos celulares que expresan el miR-155, pueden cambiar a lo largo de las diferentes fases de la progresión de la enfermedad [184,221,222], y segundo, la expresión de los genes diana también es diferente según si el contexto del daño hepático es crónico o agudo. Por lo tanto, las futuras estrategias terapéuticas destinadas a modificar la expresión del miR-155

deberán tener en cuenta su expresión y su papel en las diferentes etapas de la enfermedad hepática.

En esta tesis doctoral, hemos puesto de manifiesto la indudable importancia de dos miRNAs, el miR-182 y miR-155, en el contexto del daño hepático y hemos revelado su papel en aquellas células hepáticas sobre las que su desregulación tiene mayor impacto. Aun así, se necesitan estudios adicionales para profundizar en los efectos de la desregulación de estos miRNAs y de sus genes dianas en otros tipos celulares hepáticos relevantes para la enfermedad. Dichos estudios nos ayudarían a ampliar nuestro conocimiento sobre la función de los miRNAs en la fisiopatología de la enfermedad.

Entender los mecanismos moleculares que regulan la patogénesis de la HA es de suma importancia para el desarrollo de nuevas terapias. En 2012, publicamos el primer análisis transcriptómico de tejido hepático de pacientes con HA, que describe las principales vías desreguladas en esta condición [177]. Ahora hemos ampliado nuestra comprensión de la regulación de esta enfermedad mediante la descripción de un perfil de miRNAs en la HA y la identificación de miRNAs involucrados en su patogénesis. Los cambios globales de miRNAs en las enfermedades hepáticas alcohólicas, junto con la identificación, individualmente, de los principales miRNAs que pueden regular la HA, permitirá un mejor conocimiento de esta enfermedad, así como el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y la identificación de nuevos biomarcadores. Además, los miRNAs tienen un gran potencial como biomarcadores en el contexto de las enfermedades hepáticas, especialmente cuando se detecta en los fluidos corporales [162,220,223]. Otros estudios deberán evaluar si, además del miR-182, otros miRNAs descritos en nuestros estudios pueden encontrarse en fluidos corporales, para usarse como biomarcadores no invasivos del pronóstico de pacientes o con fines diagnósticos en la HA.

Los estudios incluidos en esta tesis muestran un gran número de miRNAs desregulados en el hígado de pacientes con HA. Si bien hemos profundizado en algunos de ellos, futuros estudios podrían revelar el papel de otros miRNAs incluidos en el perfil de la HA. No obstante, es importante destacar que mientras que algunos miRNAs podrían

participar en la patogénesis de la enfermedad, otros pueden ser sólo marcadores asociados con las características clínicas de la HA.

En conclusión, esta tesis doctoral confirma que los miRNAs participan en la fisiopatología de la HA; y además juegan un papel en procesos fisiopatológicos clave en la enfermedad. Además hemos aportado evidencias que sugieren que una restauración de la expresión de los miRNAs podría ayudar en el tratamiento de las enfermedades hepáticas y en la HA.

# CONCLUSIONES

---



Las principales conclusiones, a partir de los resultados obtenidos en los estudios realizados durante esta tesis doctoral, son las siguientes:

1. La hepatitis alcohólica se caracteriza por la expresión de un perfil específico de miRNAs desregulados en el hígado.
2. Los microRNAs desregulados en la hepatitis alcohólica regulan vías clave de la fisiopatología de esta enfermedad.
3. El miR-182 es uno de los principales miRNAs desregulados en la hepatitis alcohólica, y su expresión hepática está asociada con la severidad de la enfermedad y con un peor pronóstico de los pacientes.
4. El miR-182 está mayoritariamente expresado en la células de la reacción ductular, y su sobreexpresión se asocia a la bilirrubinostasis, el daño colangiolar y la inflamación.
5. La inhibición del miR-182 reduce el daño hepático en un modelo experimental.
6. El miR-155 es un miRNA sobreexpresado en el tejido hepático de varias enfermedades hepáticas, mientras que se encuentra infraexpresado en los linfocitos y monocitos circulantes.
7. La deficiencia del miR-155 supone un mayor daño hepático y un aumento de mediadores inflamatorios en el hígado. En cambio, supone una menor presencia de linfocitos T reclutados en tejido.
8. Los linfocitos T ayudadores deficientes en el miR-155 tienen un perfil de producción de citoquinas alterado.
9. La expresión del miR-155 en la médula ósea y células inflamatorias revierte parcialmente el daño hepático de los ratones deficientes en miR-155.
10. La inhibición del miR-182 en el hígado o la restauración de una correcta expresión del miR-155 en las células inflamatorias podrían ser buenas estrategias para mitigar el daño hepático.



# BIBLIOGRAFÍA

---



- [1] Ogawa K, Minase T, Enomoto K, Onoé T. Ultrastructure of fenestrated cells in the sinusoidal wall of rat liver after perfusion fixation. *Tohoku J Exp Med* 1973;110:89–101.
- [2] Ashkenazi A, Dixit VM. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* (80- ) 1998;281.
- [3] Malhi H, Gores GJ. Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury. *Gastroenterology* 2008;134:1641–54. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.002.
- [4] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science* (80- ) 1998;281.
- [5] Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol Rev* 2010;90:1165–94. doi:10.1152/physrev.00061.2009.
- [6] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209–18. doi:10.1172/JCI24282.
- [7] Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ 2014. doi:10.1038/nri3623.
- [8] Friedman SL. Hepatic fibrosis—Overview. *Toxicology* 2008;254:120–9. doi:10.1016/j.tox.2008.06.013.
- [9] Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V, et al. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 1999;29:403–11. doi:10.1002/hep.510290244.
- [10] Mao SA, Glorioso JM, Nyberg SL. Liver regeneration. *Transl Res* 2014;163:352–62. doi:10.1016/j.trsl.2014.01.005.
- [11] Zhou H, Rogler LE, Teperman L, Morgan G, Rogler CE. Identification of hepatocytic and bile ductular cell lineages and candidate stem cells in bipolar ductular reactions in cirrhotic human liver. *Hepatology* 2007;45:716–24. doi:10.1002/hep.21557.
- [12] Sancho-Bru P, Altamirano J, Rodrigo-Torres D, Coll M, Millan C, Jose Lozano J, et al. Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2012;55:1931–41. doi:10.1002/hep.25614 [doi].
- [13] Lukacs-Kornek V, Lammert F. The progenitor cell dilemma: Cellular and functional heterogeneity in assistance or escalation of liver injury 2016.

- doi:10.1016/j.jhep.2016.10.033.
- [14] Rodrigo-Torres D, Affo S, Coll M, Morales-Ibanez O, Millan C, Blaya D, et al. The biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells. *Hepatology* 2014. doi:10.1002/hep.27078 [doi].
- [15] Bogdanos DP, Gao B, Gershwin ME. *Liver Immunology. Compr. Physiol.*, vol. 3, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013, p. 567–98. doi:10.1002/cphy.c120011.
- [16] Szabo G, Dolganiuc A, Mandrekar P. Pattern recognition receptors: A contemporary view on liver diseases. *Hepatology* 2006;44:287–98. doi:10.1002/hep.21308.
- [17] Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, Kohlhepp M, Ergen C, Niemietz P, et al. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology* 2015;62:279–91. doi:10.1002/hep.27793.
- [18] Elsegood CL, Chan CW, Degli-Esposti MA, Wikstrom ME, Domenichini A, Lazarus K, et al. Kupffer cell-monocyte communication is essential for initiating murine liver progenitor cell-mediated liver regeneration. *Hepatology* 2015;62:1272–84. doi:10.1002/hep.27977.
- [19] Bayon LG, Izquierdo MA, Sirovich I, van Rooijen N, Beelen RH, Meijer S. Role of Kupffer cells in arresting circulating tumor cells and controlling metastatic growth in the liver. *Hepatology* 1996;23:1224–31. doi:10.1002/hep.510230542.
- [20] Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: The emerging view. *J Hepatol* 2009;51:212–23. doi:10.1016/j.jhep.2009.03.008.
- [21] Cubero FJ, Nieto N. Kupffer cells and alcoholic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2006;98:460–72.
- [22] Schwabe RF, Seki E, Brenner DA. Toll-Like Receptor Signaling in the Liver. *Gastroenterology* 2006;130:1886–900. doi:10.1053/j.gastro.2006.01.038.
- [23] Wan J, Benkdane M, Teixeira-Clerc F, Bonnafous S, Louvet A, Lafdil F, et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: A protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2014;59:130–42. doi:10.1002/hep.26607.
- [24] Louvet A, Teixeira-Clerc F, Chobert M-N, Deveaux V, Pavoine C, Zimmer A, et al.

- Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. *Hepatology* 2011;54:1217–26. doi:10.1002/hep.24524.
- [25] Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol* 2010;10:753–66. doi:10.1038/nri2858.
- [26] Khanna A, Morelli AE, Zhong C, Takayama T, Lu L, Thomson AW. Effects of Liver-Derived Dendritic Cell Progenitors on Th1- and Th2-Like Cytokine Responses In Vitro and In Vivo. *J Immunol* 2000;164.
- [27] Lau AH, Thomson AW. Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut* 2003;52:307–14.
- [28] Laso FJ, Vaquero JM, Almeida J, Marcos M, Orfao A. Chronic Alcohol Consumption Is Associated With Changes in the Distribution, Immunophenotype, and the Inflammatory Cytokine Secretion Profile of Circulating Dendritic Cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31:846–54. doi:10.1111/j.1530-0277.2007.00377.x.
- [29] Crispe IN, Alabraba EB, Lai V, Boon L, Wigmore SJ, Adams DH, et al. Liver antigen-presenting cells. *J Hepatol* 2011;54:357–65. doi:10.1016/j.jhep.2010.10.005.
- [30] Connolly MK, Bedrosian AS, Malhotra A, Henning JR, Ibrahim J, Vera V, et al. In Hepatic Fibrosis, Liver Sinusoidal Endothelial Cells Acquire Enhanced Immunogenicity. *J Immunol* 2010;185:2200–8. doi:10.4049/jimmunol.1000332.
- [31] Viñas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Berenguer C, Enrich C, et al. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 2003;38:919–29. doi:10.1053/jhep.2003.50392.
- [32] Holt AP, Houghton EL, Lalor PF, Filer A, Buckley CD, Adams DH. Liver Myofibroblasts Regulate Infiltration and Positioning of Lymphocytes in Human Liver. *Gastroenterology* 2009;136:705–14. doi:10.1053/j.gastro.2008.10.020.
- [33] Jaeschke H, Hasegawa T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int* 2006;26:912–9. doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01327.x.
- [34] Gujral JS, Liu J, Farhood A, Hinson JA, Jaeschke H. Functional importance of ICAM-1 in the mechanism of neutrophil-induced liver injury in bile duct-ligated mice. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2004;286.

- [35] Lawson J, Burns AR, Farhood A, Lynn Bajt M, Collins RG, Smith CW, et al. Pathophysiologic Importance of E- and L-Selectin for Neutrophil-Induced Liver Injury During Endotoxemia in Mice. *Hepatology* 2000;32:990–8. doi:10.1053/jhep.2000.19068.
- [36] Nagendra AR, Mickelson JK, Smith CW. CD18 integrin and CD54-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated human hepatocytes. *Am J Physiol* 1997;272:G408-16.
- [37] Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* 2012;44:88–106. doi:10.3109/03602532.2011.602688.
- [38] Gujral JS, Liu J, Farhood A, Jaeschke H. Reduced oncotic necrosis in Fas receptor-deficient C57BL/6J-lpr mice after bile duct ligation. *Hepatology* 2004;40:998–1007. doi:10.1002/hep.20380.
- [39] Gao B, Seki E, Brenner DA, Friedman S, Cohen JI, Nagy L, et al. Innate immunity in alcoholic liver disease. *AJP Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G516–25. doi:10.1152/ajpgi.00537.2010.
- [40] Ziol M, Tepper M, Lohez M, Arcangeli G, Ganne N, Christidis C, et al. Clinical and biological relevance of hepatocyte apoptosis in alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2001;34:254–60. doi:10.1016/S0168-8278(00)00047-7.
- [41] Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997;278:1626–9.
- [42] Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *J Leukoc Biol* 2009;86:513–28. doi:10.1189/JLB.0309135.
- [43] Laso FJ, Madruga JI, Giron JA, Lopez A, Ciudad J, San Miguel JF, et al. Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not active ethanol consumption. *Hepatology* 1997;25:1096–100. doi:10.1002/hep.510250508.
- [44] Arjona A, Boyadjieva N, Sarkar DK. Circadian rhythms of granzyme B, perforin, IFN-gamma, and NK cell cytolytic activity in the spleen: effects of chronic ethanol. *J*

- Immunol 2004;172:2811–7.
- [45] Hammerich L, Tacke F. Role of gamma-delta T cells in liver inflammation and fibrosis 2014. doi:10.4291/wjgp.v5.i2.107.
- [46] Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Maréchal R, Degré D, Demetter P, et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009;49:646–57. doi:10.1002/hep.22680.
- [47] Almeida J, Polvorosa MA, Gonzalez-Quintela A, Marcos M, Pastor I, Hernandez Cerceño ML, et al. Decreased Peripheral Blood CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Patients with Alcoholic Hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2013;37:1361–9. doi:10.1111/acer.12095.
- [48] Ma X, Hua J, Mohamood AR, Hamad ARA, Ravi R, Li Z. A high-fat diet and regulatory T cells influence susceptibility to endotoxin-induced liver injury. *Hepatology* 2007;46:1519–29. doi:10.1002/hep.21823.
- [49] Markwick LJJ, Riva A, Ryan JM, Cooksley H, Palma E, Tranah TH, et al. Blockade of PD1 and TIM3 Restores Innate and Adaptive Immunity in Patients With Acute Alcoholic Hepatitis. *Gastroenterology* 2015;148:590–602.e10. doi:10.1053/j.gastro.2014.11.041.
- [50] Ikeda A, Aoki N, Kido M, Iwamoto S, Nishiura H, Maruoka R, et al. Progression of autoimmune hepatitis is mediated by IL-18-producing dendritic cells and hepatic CXCL9 expression in mice. *Hepatology* 2014;60:224–36. doi:10.1002/hep.27087.
- [51] Vidali M, Hietala J, Occhino G, Ivaldi A, Sutti S, Niemelä O, et al. Immune responses against oxidative stress-derived antigens are associated with increased circulating tumor necrosis factor- $\alpha$  in heavy drinkers. *Free Radic Biol Med* 2008;45:306–11. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.012.
- [52] Matos LC, Batista P, Monteiro N, Ribeiro J, Cipriano MA, Henriques P, et al. Lymphocyte subsets in alcoholic liver disease. *World J Hepatol* 2013;5:46–55. doi:10.4254/wjh.v5.i2.46.
- [53] Orman ES, Odena G, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis, management, and novel targets for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28 Suppl 1:77–84. doi:10.1111/jgh.12030.
- [54] Altamirano J, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new targets for therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:491–501. doi:nrgastro.2011.134

- [pii]10.1038/nrgastro.2011.134 [doi].
- [55] Mathurin P, Deng QG, Keshavarzian A, Choudhary S, Holmes EW, Tsukamoto H. Exacerbation of Alcoholic Liver Injury by Enteral Endotoxin in Rats. *Hepatology* 2000;32:1008–17. doi:10.1053/jhep.2000.19621.
- [56] Dominguez M, Rincon D, Abraldes JG, Miquel R, Colmenero J, Bellot P, et al. A new scoring system for prognostic stratification of patients with alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2008;103:2747–56. doi:AJG2104 [pii]10.1111/j.1572-0241.2008.02104.x [doi].
- [57] Altamirano J, Miquel R, Katoonizadeh A, Abraldes JG, Duarte-Rojo A, Louvet A, et al. A histologic scoring system for prognosis of patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2014;146:1231–6. doi:S0016-5085(14)00055-9 [pii]10.1053/j.gastro.2014.01.018 [doi].
- [58] Lynch JP, Metz DC, Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. Stem Cells and Liver Regeneration Organization and Functions of Adult Mammalian Liver. *YGAST n.d.*;137:466–81. doi:10.1053/j.gastro.2009.05.044.
- [59] Turner R, Lozoya O, Wang Y, Cardinale V, Gaudio E, Alpini G, et al. Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *Hepatology* 2011;53:1035–45. doi:10.1002/hep.24157.
- [60] Mookerjee RP, Stadlbauer V, Lidder S, Wright GAK, Hodges SJ, Davies NA, et al. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *Hepatology* 2007;46:831–40. doi:10.1002/hep.21737.
- [61] Markwick LJJ, Riva A, Ryan JM, Cooksley H, Palma E, Tranah TH, et al. Blockade of PD1 and TIM3 Restores Innate and Adaptive Immunity in Patients With Acute Alcoholic Hepatitis. *Gastroenterology* 2015;148:590–602.e10. doi:10.1053/j.gastro.2014.11.041.
- [62] Christensen E, Gluud C. Glucocorticosteroids Are Not Effective in Alcoholic Hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3065–6. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.03065.x.
- [63] Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic Hepatitis. *N Engl J Med* 2009;360:2758–69. doi:10.1056/NEJMra0805786.
- [64] Heneghan MA, Yeoman AD, Verma S, Smith AD, Longhi MS. Autoimmune hepatitis. *Lancet* 2013;382:1433–44. doi:10.1016/S0140-6736(12)62163-1.

- [65] Liberal R, Grant CR, Holder BS, Cardone J, Martinez-Llordella M, Ma Y, et al. In autoimmune hepatitis type 1 or the autoimmune hepatitis-sclerosing cholangitis variant defective regulatory T-cell responsiveness to IL-2 results in low IL-10 production and impaired suppression. *Hepatology* 2015;62:863–75. doi:10.1002/hep.27884.
- [66] Grant CR, Liberal R, Holder BS, Cardone J, Ma Y, Robson SC, et al. Dysfunctional CD39<sup>POS</sup> regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2014;59:1007–15. doi:10.1002/hep.26583.
- [67] Cassim S, Bilodeau M, Vincent C, Lapierre P. Novel Immunotherapies for Autoimmune Hepatitis. *Front Pediatr* 2017;5:8. doi:10.3389/fped.2017.00008.
- [68] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, Ahringer J, Kimble J, Ahringer J, et al. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843–54. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
- [69] Montgomery MK, Xu S, Fire A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15502–7. doi:10.1073/PNAS.95.26.15502.
- [70] Tabara H, Grishok A, Mello CC. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 1998;282:430–1.
- [71] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* (80- ) 2001;294.
- [72] Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 2003;9:277–9. doi:10.1261/rna.2183803.
- [73] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D68–73. doi:10.1093/nar/gkt1181.
- [74] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:509–24. doi:10.1038/nrm3838.
- [75] Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, Xing Y, et al. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* 2010;16:495–505. doi:10.1261/rna.1731910.
- [76] Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and

- subcellular localization. *EMBO J* 2002;21:4663–70.
- [77] Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23:4051–60. doi:10.1038/sj.emboj.7600385.
- [78] Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415–9. doi:10.1038/nature01957.
- [79] Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. *Science* (80- ) 2001;293:834–8. doi:10.1126/science.1062961.
- [80] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363–6. doi:10.1038/35053110.
- [81] Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004;15:185–97. doi:10.1016/j.molcel.2004.07.007.
- [82] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003;115:209–16.
- [83] Eulalio A, Tirschler F, Izaurralde E. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 2009;15:1433–42. doi:10.1261/rna.1703809.
- [84] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008;2008:102–14. doi:10.1038/nrg2290.
- [85] Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, et al. Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. *Science* (80- ) 2005;309:1573–6. doi:10.1126/science.1115079.
- [86] Humphreys DT, Westman BJ, Martin DIK, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:16961–6. doi:10.1073/pnas.0506482102.
- [87] Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science* (80- ) 2007;318.

- [88] Place RF, Li L-C, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences n.d.
- [89] Oszolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev* 2008;22:3172–83. doi:10.1101/gad.1706508.
- [90] Thomas M, Lange-Grünweller K, Hartmann D, Golde L, Schlereth J, Streng D, et al. Analysis of Transcriptional Regulation of the Human miR-17-92 Cluster; Evidence for Involvement of Pim-1. *Int J Mol Sci* 2013;14:12273–96. doi:10.3390/ijms140612273.
- [91] Chang T-C, Yu D, Lee Y-S, Wentzel EA, Arking DE, West KM, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 2008;40:43–50. doi:10.1038/ng.2007.30.
- [92] Davis BN, Hata A. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal* 2009;7:18. doi:10.1186/1478-811X-7-18.
- [93] Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari F V., et al. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* 2007;449:919–22. doi:10.1038/nature06205.
- [94] Zuker M, Mathews DH, Turner DH. Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. *RNA Biochem. Biotechnol.*, Dordrecht: Springer Netherlands; 1999, p. 11–43. doi:10.1007/978-94-011-4485-8\_2.
- [95] Nicolas FE. Experimental Validation of MicroRNA Targets Using a Luciferase Reporter System, 2011, p. 139–52. doi:10.1007/978-1-61779-083-6\_11.
- [96] Sales G, Coppe A, Bisognin A, Biasiolo M, Bortoluzzi S, Romualdi C. MAGIA, a web-based tool for miRNA and Genes Integrated Analysis. *Nucleic Acids Res* 2010;38:W352–9. doi:10.1093/nar/gkq423.
- [97] Huang GT, Athanassiou C, Benos P V. mirConnX: condition-specific mRNA-microRNA network integrator. *Nucleic Acids Res* 2011;39:W416–23. doi:10.1093/nar/gkr276.
- [98] Vila-Casadesús M, Gironella M, Lozano JJ. MiRComb: An R Package to Analyse miRNA-mRNA Interactions. Examples across Five Digestive Cancers 2016. doi:10.1371/journal.pone.0151127.

- [99] Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92–105. doi:10.1101/gr.082701.108.
- [100] Bartel DP, Chen C-Z. Opinion: Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet* 2004;5:396–400. doi:10.1038/nrg1328.
- [101] Hand NJ, Master ZR, Le Lay J, Friedman JR. Hepatic function is preserved in the absence of mature microRNAs. *Hepatology* 2009;49:618–26. doi:10.1002/hep.22656.
- [102] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002;12:735–9. doi:10.1016/S0960-9822(02)00809-6.
- [103] Laudadio I, Manfroid I, Achouri Y, Schmidt D, Wilson MD, Cordi S, et al. A feedback loop between the liver-enriched transcription factor network and miR-122 controls hepatocyte differentiation. *Gastroenterology* 2012;142:119–29. doi:10.1053/j.gastro.2011.09.001.
- [104] Deng X-G, Qiu R-L, Wu Y-H, Li Z-X, Xie P, Zhang J, et al. Overexpression of miR-122 promotes the hepatic differentiation and maturation of mouse ESCs through a miR-122/FoxA1/HNF4a-positive feedback loop. *Liver Int* 2014;34:281–95. doi:10.1111/liv.12239.
- [105] Chen Y, Verfaillie CM. MicroRNAs: the fine modulators of liver development and function. *Liver Int* 2014;34:976–90. doi:10.1111/liv.12496.
- [106] Lee J, Padhye A, Sharma A, Song G, Miao J, Mo Y-Y, et al. A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via microRNA-34a inhibition. *J Biol Chem* 2010;285:12604–11. doi:10.1074/jbc.M109.094524.
- [107] Zhu H, Shyh-Chang N, Segrè A V, Shinoda G, Shah SP, Einhorn WS, et al. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell* 2011;147:81–94. doi:10.1016/j.cell.2011.08.033.
- [108] Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006;3:87–98. doi:10.1016/j.cmet.2006.01.005.

- [109] Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, et al. MiR-33 Contributes to the Regulation of Cholesterol Homeostasis. *Science* (80- ) 2010;328:1570–3. doi:10.1126/science.1189862.
- [110] Zhong D, Huang G, Zhang Y, Zeng Y, Xu Z, Zhao Y, et al. MicroRNA-1 and microRNA-206 suppress LXR $\alpha$ -induced lipogenesis in hepatocytes. *Cell Signal* 2013;25:1429–37. doi:10.1016/j.cellsig.2013.03.003.
- [111] Castoldi M, Vujic Spasic M, Altamura S, Elmén J, Lindow M, Kiss J, et al. The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice. *J Clin Invest* 2011;121:1386–96. doi:10.1172/JCI44883.
- [112] Takagi S, Nakajima M, Mohri T, Yokoi T. Post-transcriptional Regulation of Human Pregnane X Receptor by Micro-RNA Affects the Expression of Cytochrome P450 3A4. *J Biol Chem* 2008;283:9674–80. doi:10.1074/jbc.M709382200.
- [113] Takagi S, Nakajima M, Kida K, Yamaura Y, Fukami T, Yokoi T. MicroRNAs Regulate Human Hepatocyte Nuclear Factor 4 , Modulating the Expression of Metabolic Enzymes and Cell Cycle. *J Biol Chem* 2010;285:4415–22. doi:10.1074/jbc.M109.085431.
- [114] Ding J, Huang S, Wu S, Zhao Y, Liang L, Yan M, et al. Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDI $\alpha$ . *Nat Cell Biol* 2010;12:390–9. doi:10.1038/ncb2039.
- [115] Meng F, Henson R, Wehbe–Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer. *Gastroenterology* 2007;133:647–58. doi:10.1053/j.gastro.2007.05.022.
- [116] Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2257–61. doi:10.1073/pnas.0510565103.
- [117] Hou J, Lin L, Zhou W, Wang Z, Ding G, Dong Q, et al. Identification of miRNomes in Human Liver and Hepatocellular Carcinoma Reveals miR-199a/b-3p as Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell* 2011;19:232–43. doi:10.1016/j.ccr.2011.01.001.
- [118] Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang H-W, et al. Therapeutic microRNA Delivery Suppresses Tumorigenesis in a Murine Liver Cancer

- Model. Cell 2009;137:1005–17. doi:10.1016/j.cell.2009.04.021.
- [119] Ji J, Zhao L, Budhu A, Forgues M, Jia H-L, Qin L-X, et al. Let-7g targets collagen type I alpha2 and inhibits cell migration in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2010;52:690–7. doi:10.1016/j.jhep.2009.12.025.
- [120] Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* 2009;28:3526–36. doi:10.1038/onc.2009.211.
- [121] Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science* (80- ) 2005;309:1577–81. doi:10.1126/science.1113329.
- [122] Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J Hepatol* 2009;50:453–60. doi:10.1016/j.jhep.2008.06.010.
- [123] Wang S, Qiu L, Yan X, Jin W, Wang Y, Chen L, et al. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G1-modulated P53 activity. *Hepatology* 2012;55:730–41. doi:10.1002/hep.24809.
- [124] Zhang G, Li Y, Zheng S, Liu M, Li X, Tang H. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antiviral Res* 2010;88:169–75. doi:10.1016/j.antiviral.2010.08.008.
- [125] Bala S, Szabo G. MicroRNA Signature in Alcoholic Liver Disease. *Int J Hepatol* 2012;2012:498232. doi:10.1155/2012/498232.
- [126] Hsu S-H, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, et al. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest* 2012;122:2871–83. doi:10.1172/JCI63539.
- [127] Saravanan S, Thirugnanasambantham K, Hanieh H, Karikalan K, Sekar D, Rajagopalan R, et al. miRNA-24 and miRNA-466i-5p controls inflammation in rat hepatocytes. *Cell Mol Immunol* 2015;12:113–5. doi:10.1038/cmi.2014.67.
- [128] Bala S, Marcos M, Kodys K, Csak T, Catalano D, Mandrekar P, et al. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor {alpha} (TNF{alpha}) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J Biol*

- Chem 2011;286:1436–44. doi:M110.145870 [pii]10.1074/jbc.M110.145870 [doi].
- [129] Bala S, Tilahun Y, Taha O, Alao H, Kodys K, Catalano D, et al. Increased microRNA-155 expression in the serum and peripheral monocytes in chronic HCV infection. *J Transl Med* 2012;10:151. doi:10.1186/1479-5876-10-151.
- [130] Lutz P, M'haimid M, Pohlmann A, Lehmann J, Jansen C, Schierwagen R, et al. MicroRNA-155 is upregulated in ascites in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Sci Rep* 2017;7:40556. doi:10.1038/srep40556.
- [131] Bala S, Csak T, Saha B, Zatsiorsky J, Kodys K, Catalano D, et al. The pro-inflammatory effects of miR-155 promote liver fibrosis and alcohol-induced steatohepatitis. *J Hepatol* 2016;64:1378–87. doi:10.1016/j.jhep.2016.01.035.
- [132] Li Y, Ma D, Wang Z, Yang J. MicroRNA-155 Deficiency in Kupffer Cells Ameliorates Liver Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. *Transplantation* 2017;1. doi:10.1097/TP.0000000000001765.
- [133] Lambrecht J, Mannaerts I, van Grunsven LA. The role of miRNAs in stress-responsive hepatic stellate cells during liver fibrosis. *Front Physiol* 2015;6:209. doi:10.3389/fphys.2015.00209.
- [134] Coll M, Taghdouini A El, Perea L, Mannaerts I, Vila-Casadesús M, Blaya D, et al. Integrative miRNA and Gene Expression Profiling Analysis of Human Quiescent Hepatic Stellate Cells. *Sci Rep* 2015;5:11549. doi:10.1038/srep11549.
- [135] Roderburg C, Urban G-W, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* 2011;53:209–18. doi:10.1002/hep.23922.
- [136] Hyun J, Wang S, Kim J, Rao KM, Park SY, Chung I, et al. MicroRNA-378 limits activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis by suppressing Gli3 expression. *Nat Commun* 2016;7:10993. doi:10.1038/ncomms10993.
- [137] Wei J, Feng L, Li Z, Xu G, Fan X. MicroRNA-21 activates hepatic stellate cells via PTEN/Akt signaling. *Biomed Pharmacother* 2013;67:387–92. doi:10.1016/j.biopha.2013.03.014.
- [138] Zhang Z, Zha Y, Hu W, Huang Z, Gao Z, Zang Y, et al. The autoregulatory feedback loop of microRNA-21/programmed cell death protein 4/activation protein-1 (MiR-

- 21/PDCD4/AP-1) as a driving force for hepatic fibrosis development. *J Biol Chem* 2013;288:37082–93. doi:10.1074/jbc.M113.517953.
- [139] Kennedy LL, Meng F, Venter JK, Zhou T, Karstens WA, Hargrove LA, et al. Knockout of microRNA-21 reduces biliary hyperplasia and liver fibrosis in cholestatic bile duct ligated mice. *Lab Invest* 2016;96:1256–67. doi:10.1038/labinvest.2016.112.
- [140] Wu K, Ye C, Lin L, Chu Y, Ji M, Dai W, et al. Inhibiting miR-21 attenuates experimental hepatic fibrosis by suppressing both the ERK1 pathway in HSC and hepatocyte EMT. *Clin Sci* 2016;130.
- [141] Zhang J, Jiao J, Cermelli S, Muir K, Jung KH, Zou R, et al. miR-21 Inhibition Reduces Liver Fibrosis and Prevents Tumor Development by Inducing Apoptosis of CD24+ Progenitor Cells. *Cancer Res* 2015;75:1859–67. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1254.
- [142] Hsu S-H, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, et al. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest* 2012;122:2871–83. doi:10.1172/JCI63539.
- [143] Tsai W-C, Hsu S-D, Hsu C-S, Lai T-C, Chen S-J, Shen R, et al. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* 2012;122:2884–97. doi:10.1172/JCI63455.
- [144] Ding J, Li M, Wan X, Jin X, Chen S, Yu C, et al. Effect of miR-34a in regulating steatosis by targeting PPAR $\alpha$  expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* 2015;5. doi:10.1038/srep13729.
- [145] Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, et al. MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice. *Nat Commun* 2013;4:4625–33. doi:10.1038/ncomms3883.
- [146] Miller AM, Gilchrist DS, Nijjar J, Araldi E, Ramirez CM, Lavery CA, et al. MiR-155 Has a Protective Role in the Development of Non-Alcoholic Hepatosteatosis in Mice. *PLoS One* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0072324.
- [147] Csak T, Bala S, Lippai D, Kodys K, Catalano D, Iracheta-Vellve A, et al. MicroRNA-155 Deficiency Attenuates Liver Steatosis and Fibrosis without Reducing Inflammation in a Mouse Model of Steatohepatitis. *PLoS One* 2015;10:e0129251. doi:10.1371/journal.pone.0129251.

- [148] Hanin G, Yayon N, Tzur Y, Haviv R, Bennett ER, Udi S, et al. miRNA-132 induces hepatic steatosis and hyperlipidaemia by synergistic multitarget suppression. *Gut* 2017;gutjnl-2016-312869. doi:10.1136/gutjnl-2016-312869.
- [149] Dolganiuc A, Petrasek J, Kodys K, Catalano D, Mandrekar P, Velayudham A, et al. MicroRNA expression profile in Lieber-DeCarli diet-induced alcoholic and methionine choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis models in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;33:1704–10. doi:ACER1007 [pii]10.1111/j.1530-0277.2009.01007.x [doi].
- [150] Yin H, Hu M, Zhang R, Shen Z, Flatow L, You M. MicroRNA-217 promotes ethanol-induced fat accumulation in hepatocytes by down-regulating SIRT1. *J Biol Chem* 2012;287:9817–26. doi:10.1074/jbc.M111.333534.
- [151] Yin H, Liang X, Jogasuria A, Davidson NO, You M. miR-217 regulates ethanol-induced hepatic inflammation by disrupting sirtuin 1-lipin-1 signaling. *Am J Pathol* 2015;185:1286–96. doi:10.1016/j.ajpath.2015.01.030.
- [152] Dong X, Liu H, Chen F, Li D, Zhao Y. MiR-214 Promotes the Alcohol-Induced Oxidative Stress via Down-Regulation of Glutathione Reductase and Cytochrome P450 Oxidoreductase in Liver Cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2014;38:68–77. doi:10.1111/acer.12209.
- [153] Yeligar S, Tsukamoto H, Kalra VK. Ethanol-Induced Expression of ET-1 and ET-BR in Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Human Endothelial Cells Involves Hypoxia-Inducible Factor-1 and MicroRNA-199. *J Immunol* 2009;183:5232–43. doi:10.4049/jimmunol.0901084.
- [154] Han W, Fu X, Xie J, Meng Z, Gu Y, Wang X, et al. miR-26a enhances autophagy to protect against ethanol-induced acute liver injury. *J Mol Med* 2015;93:1045–55. doi:10.1007/s00109-015-1282-2.
- [155] Li M, He Y, Zhou Z, Ramirez T, Gao Y, Gao Y, et al. MicroRNA-223 ameliorates alcoholic liver injury by inhibiting the IL-6–p47<sup>phox</sup>–oxidative stress pathway in neutrophils. *Gut* 2017;66:705–15. doi:10.1136/gutjnl-2016-311861.
- [156] Tang Y, Banan A, Forsyth CB, Fields JZ, Lau CK, Zhang LJ, et al. Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2008;32:355–64. doi:ACER584 [pii]10.1111/j.1530-0277.2007.00584.x [doi].

- [157] Saha B, Bruneau JC, Kodys K, Szabo G. Alcohol-Induced miR-27a Regulates Differentiation and M2 Macrophage Polarization of Normal Human Monocytes. *J Immunol* 2015;194:3079–87. doi:10.4049/jimmunol.1402190.
- [158] Lippai D, Bala S, Csak T, Kurt-Jones EA, Szabo G. Chronic alcohol-induced microRNA-155 contributes to neuroinflammation in a TLR4-dependent manner in mice. *PLoS One* 2013;8:e70945. doi:10.1371/journal.pone.0070945.
- [159] Qi Y, Zhang M, Li H, Frank JA, Dai L, Liu H, et al. MicroRNA-29b Regulates Ethanol-induced Neuronal Apoptosis in the Developing Cerebellum through SP1/RAX/PKR Cascade. *J Biol Chem* 2014;289:10201–10. doi:10.1074/jbc.M113.535195.
- [160] Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:4402–7. doi:10.1073/pnas.0813371106.
- [161] Arrese M, Eguchi A, Feldstein A. Circulating microRNAs: Emerging Biomarkers of Liver Disease. *Semin Liver Dis* 2015;35:043–54. doi:10.1055/s-0034-1397348.
- [162] Trebicka J, Anadol E, Elfimova N, Strack I, Roggendorf M, Viazov S, et al. Hepatic and serum levels of miR-122 after chronic HCV-induced fibrosis. *J Hepatol* 2013;58:234–9. doi:S0168-8278(12)00814-8 [pii]10.1016/j.jhep.2012.10.015 [doi].
- [163] Bala S, Petrasek J, Mundkur S, Catalano D, Levin I, Ward J, et al. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology* 2012;56:1946–57. doi:10.1002/hep.25873.
- [164] Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science (80- )* 2010;327:198–201. doi:science.1178178 [pii]10.1126/science.1178178 [doi].
- [165] Szabo G, Sarnow P, Bala S. MicroRNA silencing and the development of novel therapies for liver disease. *J Hepatol* 2012;57:462–6. doi:10.1016/j.jhep.2012.01.030.
- [166] Trang P, Medina PP, Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, et al. Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* 2010;29:1580–7. doi:10.1038/onc.2009.445.
- [167] Bader AG, Brown D, Winkler M. The Promise of MicroRNA Replacement Therapy n.d.

- doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2010.
- [168] Lennox K, Behlke M. Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides. *Gene Ther* 2011;18:1111–20. doi:10.1038/gt.2011.100.
- [169] Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods* 2007;4:721–6. doi:10.1038/nmeth1079.
- [170] Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *N Engl J Med* 2013;368:1685–94. doi:10.1056/NEJMoa1209026.
- [171] Brunt EM, Janney CG, Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467–74. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x.
- [172] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313–21. doi:10.1002/hep.20701 [doi].
- [173] Haraguchi T, Ozaki Y, Iba H. Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2009;37:e43. doi:10.1093/nar/gkp040.
- [174] Mullokandov G, Baccarini A, Ruzo A, Jayaprakash AD, Tung N, Israelow B, et al. High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries. *Nat Methods* 2012;9:840–6. doi:10.1038/nmeth.2078.
- [175] Fickert P, Stö U, Fuchsbichler A, Moustafa T, Marschall H-U, Weiglein AH, et al. A New Xenobiotic-Induced Mouse Model of Sclerosing Cholangitis and Biliary Fibrosis 2007. doi:10.2353/ajpath.2007.061133.
- [176] Smyth GK. *limma: Linear Models for Microarray Data*. *Bioinforma. Comput. Biol. Solut. Using R Bioconductor*, New York: Springer-Verlag; n.d., p. 397–420. doi:10.1007/0-387-29362-0\_23.
- [177] Affo S, Dominguez M, Lozano JJ, Sancho-Bru P, Rodrigo-Torres D, Morales-Ibanez O, et al. Transcriptome analysis identifies TNF superfamily receptors as potential therapeutic targets in alcoholic hepatitis. *Gut* 2013;62:452–60. doi:gutjnl-2011-301146 [pii]10.1136/gutjnl-2011-301146 [doi].

- [178] Bertola A, Mathews S, Ki SH, Wang H, Gao B. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc* 2013;8:627–37. doi:10.1038/nprot.2013.032.
- [179] Tsukamoto H, Mkrtchyan H, Dynnyk A. Intragastric Ethanol Infusion Model in Rodents. *Methods Mol. Biol.*, vol. 447, 2008, p. 33–48. doi:10.1007/978-1-59745-242-7\_3.
- [180] Tujios S, Fontana RJ. Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:202–11. doi:10.1038/nrgastro.2011.22.
- [181] Martin-Murphy B V., Kominsky DJ, Orlicky DJ, Donohue TM, Ju C. Increased susceptibility of natural killer T-cell-deficient mice to acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology* 2013;57:1575–84. doi:10.1002/hep.26134.
- [182] Wang H-X, Liu M, Weng S-Y, Li J-J, Xie C, He H-L, et al. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2012;18:119–25. doi:10.3748/wjg.v18.i2.119.
- [183] Heymann F, Hamesch K, Weiskirchen R, Tacke F. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. *Lab Anim* 2015;49:12–20. doi:10.1177/0023677215572841.
- [184] Vigorito E, Kohlhaas S, Lu D, Leyland R. miR-155: an ancient regulator of the immune system. *Immunol Rev* 2013;253:146–57. doi:10.1111/imr.12057.
- [185] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren M V, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 2007;316:608–11. doi:10.1126/science.1139253.
- [186] Mashima R. Physiological roles of miR-155. *Immunology* 2015;145:323–33. doi:10.1111/imm.12468.
- [187] Dippold RP, Vadigepalli R, Gonye GE, Hoek JB. Chronic ethanol feeding enhances miR-21 induction during liver regeneration while inhibiting proliferation in rats. *AJP Gastrointest Liver Physiol* 2012;303:G733–43. doi:10.1152/ajpgi.00019.2012.
- [188] Ng R, Song G, Roll GR, Frandsen NM, Willenbring H. A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver regeneration. *J Clin Invest* 2012;122:1097–108. doi:10.1172/JCI46039.
- [189] Chen L, Charrier A, Zhou Y, Chen R, Yu B, Agarwal K, et al. Epigenetic regulation of

- connective tissue growth factor by MicroRNA-214 delivery in exosomes from mouse or human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2014;59:1118–29. doi:10.1002/hep.26768.
- [190] El Sobky SA, El-Ekiaby NM, Mekky RY, Elemam NM, Mohey Eldin MA, El-sayed M, et al. Contradicting roles of miR-182 in both NK cells and their host target hepatocytes in HCV. *Immunol Lett* 2016;169:52–60. doi:10.1016/j.imlet.2015.10.013.
- [191] Van Keuren-Jensen KR, Malenica I, Courtright AL, Ghaffari LT, Starr AP, Metpally RP, et al. microRNA changes in liver tissue associated with fibrosis progression in patients with hepatitis C. *Liver Int* 2016;36:334–43. doi:10.1111/liv.12919.
- [192] Liu Z, Liu J, Segura MF, Shao C, Lee P, Gong Y, et al. MiR-182 overexpression in tumourigenesis of high-grade serous ovarian carcinoma. *J Pathol* 2012;228:204–15. doi:10.1002/path.4000.
- [193] Sachdeva M, Mito JK, Lee C-L, Zhang M, Li Z, Dodd RD, et al. MicroRNA-182 drives metastasis of primary sarcomas by targeting multiple genes. *J Clin Invest* 2014;124:4305–19. doi:10.1172/JCI77116.
- [194] Wang J, Li J, Shen J, Wang C, Yang L, Zhang X. MicroRNA-182 downregulates metastasis suppressor 1 and contributes to metastasis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2012;12:227. doi:10.1186/1471-2407-12-227.
- [195] Huynh C, Segura MF, Gaziel-Sovran A, Menendez S, Darvishian F, Chiriboga L, et al. Efficient in vivo microRNA targeting of liver metastasis. *Oncogene* 2011;30:1481–8. doi:10.1038/onc.2010.523.
- [196] Chen L, Chu F, Cao Y, Shao J, Wang F. Serum miR-182 and miR-331-3p as diagnostic and prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2015. doi:10.1007/s13277-015-3430-2.
- [197] Meng X, Joosse SA, Muller V, Trillsch F, Milde-Langosch K, Mahner S, et al. Diagnostic and prognostic potential of serum miR-7, miR-16, miR-25, miR-93, miR-182, miR-376a and miR-429 in ovarian cancer patients. *Br J Cancer* 2015. doi:10.1038/bjc.2015.340.
- [198] Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, Calatrava A, Mancarella C, Masia E, Casanova J, et al. Identification of miR-187 and miR-182 as biomarkers of early diagnosis and prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol* 2014;192:252–9. doi:10.1016/j.juro.2014.01.107.

- [199] Nanji AA, French SW. Animal Models of Alcoholic Liver Disease—Focus on the Intra-gastric Feeding Model n.d.
- [200] Allen K, Jaeschke H, Copple BL. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: A novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *Am J Pathol* 2011;178:175–86. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.026.
- [201] Rust C, Wild N, Bernt C, Vennegeerts T, Wimmer R, Beuers U. Bile acid-induced apoptosis in hepatocytes is caspase-6-dependent. *J Biol Chem* 2009;284:2908–16. doi:10.1074/jbc.M804585200.
- [202] O'Brien KM, Allen KM, Rockwell CE, Towery K, Luyendyk JP, Copple BL. IL-17A synergistically enhances bile acid-induced inflammation during obstructive cholestasis. *Am J Pathol* 2013;183:1498–507. doi:10.1016/j.ajpath.2013.07.019.
- [203] O'Connell RM, Zhao JL, Rao DS, Lee R, Feinbaum R, Ambros V, et al. MicroRNA function in myeloid biology. *Blood* 2011;118:2960–9. doi:10.1182/blood-2011-03-291971.
- [204] mir-155 an ancient regu...pdf n.d.
- [205] Tam W. Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene* 2001;274:157–67. doi:10.1016/S0378-1119(01)00612-6.
- [206] Kong W, He L, Coppola M, Guo J, Esposito NN, Coppola D, et al. *MicroRNA-155* regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting *FOXO3a* in breast cancer. *J Biol Chem* 2016;291:22855–22855. doi:10.1074/jbc.A110.101055.
- [207] Rothchild AC, Sissons JR, Shafiani S, Plaisier C, Min D, Mai D, et al. MiR-155–regulated molecular network orchestrates cell fate in the innate and adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci* 2016;113:E6172–81. doi:10.1073/pnas.1608255113.
- [208] Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E -miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:7024–9. doi:10.1073/pnas.0602266103.
- [209] Wan J, Xia L, Xu W, Lu N. Expression and Function of miR-155 in Diseases of the Gastrointestinal Tract. *Int J Mol Sci* 2016;17. doi:10.3390/ijms17050709.

- [210] Krenkel O, Mossanen JC, Tacke F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2014;3:331–43. doi:10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.01.
- [211] Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 1992;90:196–203. doi:10.1172/JCI115836.
- [212] Chen D, Bromberg JS. T Regulatory Cells and Migration. *Am J Transplant* 2006;6:1518–23. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01372.x.
- [213] Lu L-F, Thai T-H, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, et al. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity* 2009;30:80–91. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.010.
- [214] Seddiki N, Brezar V, Ruffin N, Lévy Y, Swaminathan S. Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease. *Immunology* 2014;142:32–8. doi:10.1111/imm.12227.
- [215] O’Connell RM, Kahn D, Gibson WSJ, Round JL, Scholz RL, Chaudhuri AA, et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* 2010;33:607–19. doi:10.1016/j.immuni.2010.09.009.
- [216] Kohlhaas S, Garden OA, Scudamore C, Turner M, Okkenhaug K, Vigorito E. Cutting edge: the Foxp3 target miR-155 contributes to the development of regulatory T cells. *J Immunol* 2009;182:2578–82. doi:10.4049/jimmunol.0803162.
- [217] Yao R, Ma Y-L, Liang W, Li H-H, Ma Z-J, Yu X, et al. MicroRNA-155 Modulates Treg and Th17 Cells Differentiation and Th17 Cell Function by Targeting SOCS1. *PLoS One* 2012;7:e46082. doi:10.1371/journal.pone.0046082.
- [218] Thai T-H, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the Germinal Center Response by MicroRNA-155. *Science (80- )* 2007;316.
- [219] Bala S, Csak T, Saha B, Zatsiorsky J, Kodys K, Catalano D, et al. The pro-inflammatory effects of miR-155 promote liver fibrosis and alcohol-induced steatohepatitis. *J Hepatol* 2016. doi:10.1016/j.jhep.2016.01.035.
- [220] Bala S, Petrasek J, Mundkur S, Catalano D, Levin I, Ward J, et al. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology* 2012;56:1946–57. doi:10.1002/hep.25873.

- [221] O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1604–9. doi:10.1073/pnas.0610731104.
- [222] Jablonski KA, Gaudet AD, Amici SA, Popovich PG, Guerau-De-Arellano M. Control of the Inflammatory Macrophage Transcriptional Signature by miR-155. *PLoS One* 2016;11. doi:10.1371/journal.pone.0159724.
- [223] Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clin Chim Acta* 2013;424:99–103. doi:10.1016/j.cca.2013.05.021.



# ANEXO

---



## ORIGINAL ARTICLE

# Integrative microRNA profiling in alcoholic hepatitis reveals a role for microRNA-182 in liver injury and inflammation

Delia Blaya,<sup>1,2</sup> Mar Coll,<sup>1,2</sup> Daniel Rodrigo-Torres,<sup>1,2</sup> Maria Vila-Casadesús,<sup>1,2</sup> José Altamirano,<sup>1</sup> Marta Llopis,<sup>1,2</sup> Isabel Graupera,<sup>1,2</sup> Luis Perea,<sup>1,2</sup> Beatriz Aguilar-Bravo,<sup>1,2</sup> Alba Díaz,<sup>3</sup> Jesus M Banales,<sup>2,4</sup> Joan Clària,<sup>1,5</sup> Juan José Lozano,<sup>2</sup> Ramon Bataller,<sup>1,6</sup> Juan Caballería,<sup>1,2,7</sup> Pere Ginès,<sup>1,2,7</sup> Pau Sancho-Bru<sup>1,2</sup>

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311314>).

For numbered affiliations see end of article.

**Correspondence to**

Dr Pau Sancho-Bru, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), C/ Roselló, 149-153, third floor, Barcelona 08036, Spain; [psancho@clinic.ub.es](mailto:psancho@clinic.ub.es)

Received 17 December 2015

Revised 1 April 2016

Accepted 17 April 2016

**ABSTRACT**

**Objective** MicroRNAs (miRNAs) are well-known regulators of disease pathogenesis and have great potential as biomarkers and therapeutic targets. We aimed at profiling miRNAs in alcoholic hepatitis (AH) and identifying miRNAs potentially involved in liver injury.

**Design** MiRNA profiling was performed in liver samples from patients with AH, alcohol liver disease, non-alcoholic steatohepatitis, HCV disease and normal liver tissue. Expression of miRNAs was assessed in liver and serum from patients with AH and animal models. Mimic and decoy miR-182 were used in vitro and in vivo to evaluate miR-182's biological functions.

**Results** MiRNA expression profile in liver was highly altered in AH and distinctive from alcohol-induced cirrhotic livers. Moreover, we identified a set of 18 miRNAs predominantly expressed in AH as compared with other chronic liver conditions. Integrative miRNA-mRNA functional analysis revealed the association of AH-altered miRNAs with nuclear receptors, IGF-1 signalling and cholestasis. Interestingly, miR-182 was the most highly expressed miRNA in AH, which correlated with degree of ductular reaction, disease severity and short-term mortality. MiR-182 mimic induced an upregulation of inflammatory mediators in biliary cells. At experimental level, miR-182 was increased in biliary cells in mice fed with 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) diet but not upregulated by alcohol intake or fibrosis. Inhibition of miR-182 in DDC-fed mice reduced liver damage, bile acid accumulation and inflammatory response.

**Conclusions** AH is characterised by a deregulated miRNA profile, including miR-182, which is associated with disease severity and liver injury. These results highlight the potential of miRNAs as therapeutic targets and biomarkers in AH.

**BACKGROUND AND AIMS**

Alcoholic liver disease (ALD) is a major cause of mortality worldwide and a major indication for liver transplantation in Europe and North America. Alcoholic hepatitis (AH) appears in patients with underlying ALD and heavy alcohol intake. Severe forms of AH still have a high short-term mortality,

**Significance of this study****What is already known on this subject?**

- Alcoholic hepatitis (AH) develops in patients with underlying alcoholic liver disease (ALD) and heavy alcohol intake and has a high short-term mortality. The pathogenesis of AH is still poorly understood; it is characterised by inflammatory cell infiltration, hepatocellular damage, steatosis, fibrosis, ductular reaction expansion and cholestasis.
- MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA known to participate in the regulation of important pathophysiological pathways in liver diseases. miRNAs have been shown to be good diseases biomarkers as well as novel therapeutic targets.
- MiR-182 is involved in organogenesis, cancer development and metastasis in several types of cancer.

**What are the new findings?**

- MiRNA profiling in liver tissue revealed that AH is characterised by a specific miRNA expression profile differentiated from other chronic liver diseases including alcohol-induced cirrhosis.
- Integrative miRNA-mRNA functional analysis revealed the association of AH-altered miRNAs with fatty acid metabolism, bile acid transport and cholestasis.
- MiR-182 is the most highly expressed miRNA in liver tissue in patients with AH and its expression correlates with disease severity, markers of ductular reaction and outcome.
- MiR-182 is mainly expressed in ductular reaction cells and hepatocytes and mediates hepatocellular injury and promotes inflammation. Blockade of MiR-182 in experimental animal models reduces liver injury, bile acid accumulation and expression of pro-inflammatory genes.

mainly due to incomplete response of patients to current available treatments (ie, corticosteroids and pentoxifylline).<sup>1</sup> The pathogenesis of AH is still

**To cite:** Blaya D, Coll M, Rodrigo-Torres D, *et al.* Gut Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/gutjnl-2015-311314

## Significance of this study

**How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?**

► Understanding the molecular mechanisms regulating the pathogenesis of AH is of utmost importance for the development of new therapies in AH. In this study, we provide the first miRNA profile in AH and we identify individual miRNA potentially involved in AH pathogenesis. Importantly, we show that miR-182 is highly expressed in AH and correlates with disease severity and important features of AH. Moreover, experimental studies suggest its involvement in liver injury, inflammation and bile acid accumulation. All together, this study highlights the importance of miRNAs in AH and emphasises the potential of miRNAs as new therapeutic targets as well as future biomarkers.

poorly understood; it is characterised by inflammatory cell infiltration, hepatocellular damage, steatosis, fibrosis, ductular reaction and cholestasis.<sup>2</sup> Moreover, several histological features have been associated with disease severity and poor outcome in AH, including the degree of fibrosis, neutrophil infiltration, bilirubinostasis and ductular reaction.<sup>3 4</sup>

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA of ~ 22 nucleotides, which are post-transcriptional regulators of gene expression by targeting the 3' untranslated region of the mRNA.<sup>5</sup> MiRNA-target mRNA pairing leads to cleavage or translation inhibition depending on total or partial complementarity.<sup>6 7</sup> The interaction of miRNA with target mRNA is complex; while each miRNA is able to recognise and target several gene transcripts, these can also be targeted by several miRNAs.<sup>8 9</sup> Moreover, the gene and miRNA expression profile depends on the tissue, cell type or pathophysiological condition; therefore, the formation of miRNA-mRNA pair requires not only the complementarity but also the coexistence in time and place of both molecules. Liver diseases such as non-alcoholic steatohepatitis (NASH), hepatocellular carcinoma (HCC), HCV liver disease, ALD and biliary diseases are reportedly associated with important changes in miRNAs expression.<sup>10–15</sup> These studies highlight the importance of miRNAs to understand the pathophysiology of liver diseases and to develop future therapies. However, there is very limited information regarding the expression of miRNAs in AH and their role in the pathogenesis of liver disease.

In the present study, we have identified a profile of miRNAs expressed in AH. By performing an integrative analysis of miRNA and mRNA data, we have shown that altered miRNAs in AH are associated with the regulation of key features of AH. Additionally, we selected miR-182 for further analysis based on its expression in AH, predicted targeted genes and potential biological functions. MiR-182 expression was high in AH, associated with disease severity and involved in liver injury.

**MATERIALS AND METHODS****Patients**

Samples were selected from a cohort of consecutive patients with clinical, analytical and histological features of AH admitted to the Liver Unit of the Hospital Clinic of Barcelona from July 2009 to January 2014. Forty-eight liver samples from patients

with AH were selected based on total RNA availability and quality, and were used to perform miRNA array and hepatic miRNA expression validation. The clinical and biochemical parameters of patients with AH included in this study are shown in [table 1](#), with no differences between the two cohorts (miRNA array cohort (n=13) and validation cohort (n=35)). Inclusion criteria for patients with AH were excessive alcohol consumption (>60 g/day) previous to admission, elevated levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT),  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, bilirubin and histological diagnosis of AH. Liver samples of patients were obtained by transjugular biopsy at admission. On the other hand, exclusion criteria included the presence of HCC or other associated potential causes of liver disease other than alcohol consumption. Severe AH was defined as a Maddrey's discriminant function >32 and/or an age-bilirubin-international normalised ratio-creatinine (ABIC) score  $\geq 6.71$  at admission.<sup>16</sup> Patients with severe AH were treated with prednisone orally 30 mg/day for 4 weeks followed by a 2-week taper period. During hospitalisation, patients were treated according to current international and local guidelines. All patients received nutritional as well as psychological assistance to help achieve alcohol abstinence.

Patients with other aetiologies included in the study are further described in online supplementary material.

**Array studies**

High-quality RNA samples from 13 AH, 5 ALD-induced cirrhosis (ALD-CH), 5 NASH-induced cirrhosis (NASH-CH), 4 HCV-induced cirrhosis (HCV-CH) and 6 normal livers were hybridised on a GeneChip miRNA 3.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, California, USA) as described in online supplementary material. MiRNA array data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus with accession number GSE59492 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=mbuxqymfdghrwd&acc=GSE59492>).

**MiRNA-mRNA profile integration and functional analysis**

Among all samples analysed by miRNA array, eight AH and four normal liver samples were previously assessed for gene expression microarray analysis.<sup>17</sup> Both paired miRNA and mRNA expression profiles were used for the integrative analysis by MiRComb package, as previously described.<sup>18</sup> Functional analysis of significant dysregulated gene targets was performed with Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen; Red Wood, California, USA). Canonical pathways and category disease annotation with  $p < 0.05$  were considered.

**Determination of miR-182 in serum samples**

Serum samples of 28 patients with AH and 8 control individuals were used to extract total RNA enriched in small RNAs with miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen). Spike-in control (cel-miR-39a-3p) was added before extraction to later normalisation in the absence of an endogenous control. cDNA synthesis and qPCR were performed using miR-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) following manufacturer's instructions.

**Mouse models**

Animal models representing features of AH were performed: (1) ductular reaction model obtained with 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) diet; (2) ethanol intake; (3) fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) treatment and (4) acute-on-chronic liver injury mimicked by the induction of chronic damage with CCl<sub>4</sub> plus acute ethanol (see online

**Table 1** Comparisons of demographic, clinical and haemodynamic characteristics between patients with alcoholic hepatitis in the microarray cohort and validation cohort

	Microarray cohort (n=13) Median (25–75 IQR)	Validation cohort (n=35) Median (25–75 IQR)	p Value
<i>Characteristics</i>			
Age (years)	54 (41–56)	52 (45–55)	ns
Male, n (%)	8 (62)	27 (73)	ns
Alcohol intake (g/day)	100 (90–100)	100 (85–175)	ns
Corticosteroids, n (%)	5 (39)	18 (49)	ns
Cirrhosis (%)	9 (69)	30 (81)	ns
<i>Laboratory and haemodynamic parameters</i>			
Haemoglobin (g/dL)	11 (8–12)	11 (10–13)	ns
Leucocyte count $\times 10^9/L$	8.7 (6.4–11.9)	8.0 (5.8–12.2)	ns
Platelet count $\times 10^9/L$	90 (45–193)	118 (76–197)	ns
AST (U/L)	109 (61–193)	125 (70–185)	ns
ALT (U/L)	45 (32–78)	44 (23–59)	ns
Serum Na (mmol/L)	133 (129–136)	135 (131–139)	ns
Serum albumin (g/dL)	2.6 (2.4–2.9)	2.7 (2.3–3.2)	ns
Serum creatinine (mg/dL)	0.6 (0.6–1.0)	0.8 (0.60–1.0)	ns
Serum bilirubin (mg/dL)	11 (5–21)	6 (2–20)	ns
INR	1.6 (1.3–2.2)	1.5 (1.3–1.7)	ns
HVPG (mm Hg)	19 (15–25)	19 (13–21)	ns
<i>Alcoholic hepatitis severity scores at admission</i>			
MELD score	22 (16–26)	19 (13–24)	ns
ABIC score	7.9 (6.3–8.8)	7.3 (6.7–8.3)	ns
<i>Clinical complications during hospitalisation</i>			
AKI*, n (%)	3 (23)	14 (38)	ns
Infection, n (%)	7 (53)	12 (32)	ns

\*Acute kidney injury was defined as an abrupt (within 48 h) reduction in kidney function currently defined as an absolute increase in serum creatinine of  $\geq 0.3$  mg/dL ( $\geq 26.4$   $\mu$ mol/L), a percentage increase in serum creatinine of  $\geq 50\%$  (1.5-fold from baseline) based on Acute Kidney Injury Network criteria.

ABIC, age-bilirubin-INR-creatinine score; AKI, acute kidney injury; ALT, alanine aminotransferase level; AST, aspartate aminotransferase level; HVPG, hepatic venous pressure gradient; INR, international normalised ratio; MELD, model for end-stage liver disease.

supplementary material). Animal procedures were conducted according to European Union regulations and were approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona.

#### In vivo inhibition of miR-182 through a miRNA decoy in mice with DDC diet

Decoy systems to inhibit miRNA functions have been developed during the past 10 years.<sup>19 20</sup> Among others, tough decoys (TuD) are plasmid constructs with hairpin-shape structures containing an internal loop with miRNA-binding sequences able to capture miRNA into stable complexes. Each decoy would be able to block a specific miRNA depending on the binding sequence.

Decoy to inhibit miR-182 and decoy control miR-1306 were developed by Dr. Brown Laboratory.<sup>21</sup> Plasmid vectors of decoy-control or decoy-182 were cloned in *Escherichia coli* and were provided as bacterial stabs. *E. coli* was grown in Luria Broth medium overnight at 37°C. Thereafter, plasmid vectors were purified using PureLink Hipure Plasmid Maxiprep Kit (Life Technologies). To perform an in vivo delivery of decoys, plasmids were complexed with transfection reagent Jet PEI (PolyPlus, Illkirch, France) following the manufacturer's instructions. CD57/BL6 male 8-week-old mice were injected intraperitoneally with 50  $\mu$ g of plasmid every 48 h during 1 week, with a total of four injections. Also, 24 h after the first injection mice were fed with 0.1% DDC diet or chow diet. Animals were sacrificed after 7 days of diet, blood and livers were collected.

#### In vitro miR-182 mimic transfection

H69 human cholangiocytes cell line (a gift from Dr. D. Jefferson, Tufts University, Boston, Massachusetts, USA), primary mouse hepatocytes and a macrophage mouse cell line (RAW 264.7) were transfected with 50 nM of hsa-miR-182 or mmu-miR-182, respectively (Exiqon, Vedbaek Denmark). Further information is detailed in online supplementary material.

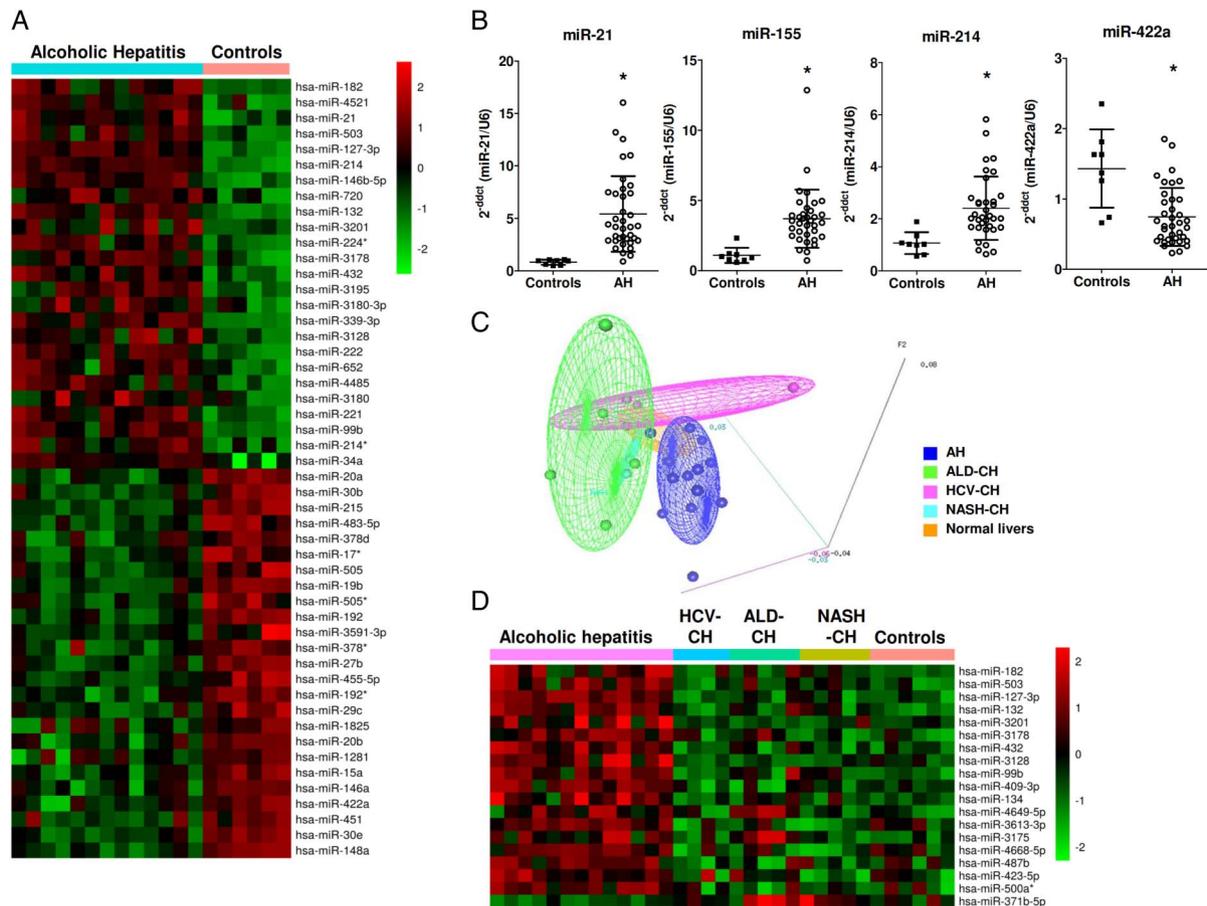
#### Statistical analysis

Statistical analysis of the miRNA expression among groups and their correlation with clinical parameters and patient mortality were performed as described in online supplementary material.

## RESULTS

### MiRNA expression profile in AH

In order to evaluate whether miRNA expression is altered in AH, we performed a wide miRNA profile analysis by microarray in 13 samples of liver tissue from patients with AH and 6 normal liver fragments. Unsupervised clustering analysis grouped AH and normal samples separately, showing the difference in miRNA expression between groups ( $p < 0.05$ ). The miRNA expression array revealed an important dysregulation of miRNA expression in AH compared with normal liver. In total, 111 miRNAs were upregulated in AH while 66 miRNAs were downregulated in AH versus normal samples (figure 1A). To validate the results from the microarray, we evaluated the hepatic expression of miRNAs known to be involved in liver diseases but not described in AH such as



**Figure 1** Profile of microRNA (miRNA) in alcoholic hepatitis (AH). (A) Heat map of the most differentially regulated miRNAs in patients with AH (n=13) compared with normal livers (n=6) ( $p < 0.05$ ). Red-coloured pixels correspond to an increased abundance of the miRNA in the indicated sample, whereas green pixels indicate decreased miRNA levels. (B) Validation by qPCR of four dysregulated miRNA in a confirmatory cohort of AH liver tissues (n=35) compared with normal liver (n=8). Results are expressed as mean ± SD. (C) Multidimensional scaling analysis representing the 33 samples that underwent miRNA array profiling. The different samples are placed in the three-dimensional space according to their miRNA expression. AH samples are represented in dark blue (n=13), alcoholic liver disease-induced cirrhosis (ALD-CH) in green (n=5), HCV-CH in pink (n=4), non-alcoholic steatohepatitis (NASH)-CH in light blue (n=5) and normal livers in orange (n=6). (D) Heat map of the 18 miRNA specifically dysregulated in AH with respect to other liver diseases. In total, 17 were found to be increased in AH and only 1 was downregulated ( $p < 0.05$ ).

miR-21, miR-155, miR-214 and miR-422a by qPCR in a confirmatory cohort of patients with AH (n=35) and normal liver fragments (n=8). MiR-21, miR-155 and miR-214 were confirmed to be significantly upregulated and miR-422a downregulated in AH (figure 1B).

### MiRNA expression profile in AH and other chronic liver disease

Next, we aimed at exploring whether altered miRNAs were exclusively expressed in AH (an acute-on-chronic condition) or are commonly altered in other chronic liver diseases. The miRNAs expression profile was assessed in liver samples from cirrhotic patients with ALD-CH and also NASH-CH and HCV-CH.

A multidimensional scaling analysis performed with all the samples analysed by miRNA array showed that samples belonging to the AH group were homogeneously distributed, with a wide separation from the other groups (figure 1C). These results suggest that AH express a profile of miRNAs different from chronic liver diseases, including ALD. As shown in figure 1D, 18 miRNAs were differentially expressed in AH compared with the other liver diseases analysed. Interestingly, among them, 17 miRNAs were upregulated and only 1 was

downregulated. It is important to note that the set of upregulated miRNAs in AH showed a low level of expression in all the other aetiologies, suggesting that they may be regulating specific pathways underlying AH.

Importantly, a paired comparison of AH samples with samples from patients with ALD-CH showed that the miRNA expression profile clearly differentiated between the two groups, with 51 miRNAs differentially regulated in AH versus normal and ALD-CH (see online supplementary figure S1).

Altogether, these results suggest that AH is characterised by a specific miRNA profile, which differentiates AH from other chronic liver diseases.

To determine which genes may be regulated by the 18 differentially expressed miRNAs in AH, we performed an integrative analysis with Mircomb Package combining data from the miRNA profile and mRNA transcriptome from the same AH samples. The software selected miRNA-mRNA pairs that fulfilled the following two conditions; first, they presented a significant negative correlation between miRNA and gene expression, and second the miRNA-mRNA pair presented a predicted sequence complementarity. Remarkably, a functional analysis of genes potentially targeted by the 18 miRNAs expressed in AH, uncovered their relationship with pathways related to

nuclear receptors PXR, RXR or FXR and also with hepatic cholestasis as shown in [table 2](#).

### MiR-182 expression correlates with disease severity and key features of AH

We selected miR-182 for further evaluation since it was the most highly expressed miRNA in AH. The expression of miR-182 was assessed by qPCR in a confirmatory cohort of AH patients (n=35), showing an increase of 3.12-fold (p=0.001) in AH versus normal livers. Moreover, expression of miR-182 was higher in AH compared with liver samples from patients with HCV-CH and NASH ([figure 2A](#)). However, expression of miR-182 was not significantly different in AH and ALD-CH liver samples (3.12±1.96 and 2.65±1.52 fold vs normal livers, respectively), suggesting that it is not exclusively expressed in AH condition.

To further investigate the potential role of miR-182 in the pathogenesis of AH, we assessed whether its expression correlated with severity scores. We found a positive correlation between miR-182 hepatic expression and MELD score (p<0.001) ([figure 2B](#)) and also ABIC (p=0.005) (see online supplementary figure S2). Moreover, expression of miR-182 correlated with serum bilirubin levels (p<0.001) ([figure 2C](#)) and bilirubinostasis evaluated by histological assessment as previously described<sup>3</sup> (p=0.01) ([figure 2D](#)). Interestingly, there was a positive correlation between miR-182 expression and keratin 7 and epithelial cell adhesion molecule (EPCAM), two markers of ductular reaction known to be associated with disease severity<sup>4</sup> ([figure 2E, F](#)).

Next, we evaluated the association of miR-182 expression with short-term mortality of patients with AH. MiR-182 expression was higher in those patients who died within 90 days after admission (see online supplementary figure S2). Moreover, Kaplan–Meier analysis using a cut-off with the highest sensitivity and specificity (2.9-fold ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )) compared with normal tissue (sensitivity 79%, specificity 74%; area under the receiver operating characteristic (AUROC) curve 0.76, 95% CI (0.56 to 0.96); p=0.01) showed the association of miR-182 expression above 2.9 with short-term mortality ([figure 2G](#)). Finally, to assess

whether miR-182 could be detected circulating, we performed a qPCR in serum samples from patients with AH (n=28) versus control individuals (n=8). As shown in [figure 2H](#), we found a marked increase in the expression of miR-182 in AH serum samples over normal individuals (p<0.05). Interestingly, miR-182 serum levels were not altered at 7 days after corticosteroid treatment in patients with AH. Moreover, miR-182 serum level did not correlate with liver tissue levels and was not associated with disease severity or mortality in patients with AH (see online supplementary figure S3), suggesting that at serum level it may not be a good biomarker in AH.

### MiR-182 expression in animal models of liver injury

Although recent publications described animal models showing some of the features of severe ALD,<sup>22, 23</sup> no described animal model reproduces all the clinical features of AH, including an important degree of fibrosis, inflammation, ductular reaction and cholestasis. Therefore, miR-182 expression was evaluated not only in animal models of ethanol intake, but also models of fibrosis and ductular reaction alone and in combination with ethanol intake. As shown in [figure 3A, B](#), no differences were found in hepatic expression of miR-182 in animals treated with CCl<sub>4</sub> or ethanol alone. Conversely, a combined treatment of CCl<sub>4</sub> plus ethanol induced a mild, although significant increase in miR-182 expression (1.68-fold, p<0.05) ([figure 3B](#)). Remarkably, in mice treated with DDC diet, which induces liver injury, inflammation, ductular reaction and cholestasis, miR-182 was upregulated in a time-dependent manner ([figure 3C](#)). However, combination of DDC with ethanol intake did not change the miR-182 expression ([figure 3D](#)). MiR-182 was not upregulated in an animal model of NASH (16 weeks feeding with high-fat diet) or in animals with acute T-cell-mediated liver injury (acute concanavalin A-treated animals, data not shown).

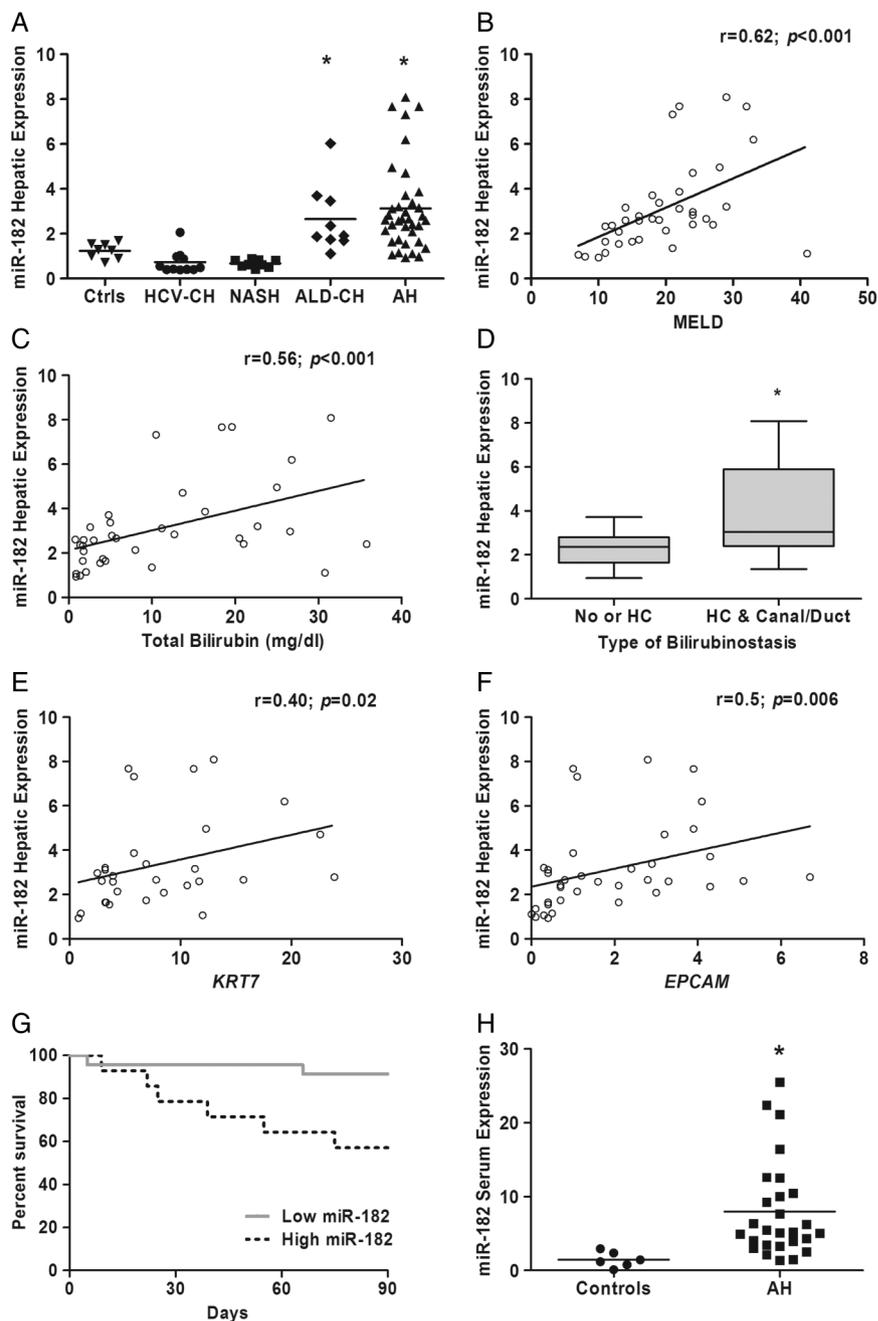
To assess the cell source of miR-182, parenchymal and non-parenchymal cells were isolated from mice fed with DDC diet. As shown in [figure 3E](#), miR-182 was enriched in ductular reaction cells compared with whole liver tissue and not expressed in non-parenchymal cells (p<0.05). Although to a lesser effect, miR-182 was also expressed in hepatocytes ([figure 3F](#)),

**Table 2** Pathways regulated by the 18 microRNAs differentially expressed in alcoholic hepatitis

Ingenuity canonical pathways	p Value	Genes
PXR/RXR activation	2×10 <sup>-8</sup>	NR1I3,PPARGC1A,RXRA,GSTA2,PRKAG2,HNF4A,CYP2C19,AKT2,FOXO1,FOXO3,CYP2A6
FXR/RXR activation	3.4×10 <sup>-7</sup>	PKLR,SLC10A1,SLC22A7,NR5A2,AKT2,PPARGC1A,CLU,RXRA,LCAT,HNF4A,FGFR4,FOXO1,CYP27A1
IGF-1 signalling	4.8×10 <sup>-5</sup>	STAT3,IRS2,IRS1,PRKAG2,MAP2K1,AKT2,FOXO1,IGF1,FOXO3
AMPK signalling	7.4×10 <sup>-5</sup>	IRS2,PPARGC1A,SMARCA2,ACACB,IRS1,PRKAG2,HNF4A,AKT2,FOXO1,FOXO3,PPP2R5C,ADRA1A
Wnt/β-catenin signalling	1.9×10 <sup>-4</sup>	CTNNB1,TGFBR3,SOX5,TLE1,LRP6,TCF7L2,NR5A2,AKT2,PPP2R5C,FZD5,ACVR2B
PPARα/RXRα activation	3×10 <sup>-4</sup>	ADCY1,PPARGC1A,TGFBR3,RXRA,IRS1,PRKAG2,NCOR1,CYP2C19,ACAA1,MAP2K1,ACVR2B
PTEN signalling	0.001	BCL2L11,TGFBR3,MAGI1,FGFR4,MAP2K1,AKT2,FOXO1,FOXO3
Glucocorticoid receptor signalling	0.001	TAF15,SMARCA2,NR3C2,PRKAG2,MAP2K1,AKT2,VCAM1,NFATC3,STAT3,TSC22D3,CEBPB,NCOR1,FOXO3
PI3K signalling in B lymphocytes	0.002	NFATC3,ITPR2,IRS2,CAMK2D,IRS1,MAP2K1,AKT2,FOXO3
Leptin signalling in obesity	0.002	ADCY1,STAT3,PRKAG2,MAP2K1,AKT2,FOXO1
Molecular mechanisms of cancer	0.002	BRCA1,BCL2L11,CTNNB1,CAMK2D,IRS1,PRKAG2,MAP2K1,RAP1A,AKT2,FZD5,ADCY1,RHOB,LRP6,XIAP,FOXO1
Hepatic cholestasis	0.002	ADCY1,SLC10A1,SLC22A7,RXRA,PRKAG2,HNF4A,FGFR4,NR5A2,CYP27A1
Dopamine receptor signalling	0.002	ADCY1,PPP1R10,PRKAG2,MAOB,PPP2R5C,QDPR
Insulin receptor signalling	0.002	PPP1R10,IRS2,IRS1,PRKAG2,MAP2K1,AKT2,FOXO1,FOXO3
Xenobiotic metabolism signalling	0.003	NR1I3,CHST13,PPARGC1A,CAMK2D,RXRA,GSTA2,CYP2C19,MAF,MAP2K1,MAOB,PPP2R5C,CITED2
Epithelial adherens junction signalling	0.004	CTNNB1,TGFBR3,MAGI1,TCF7L2,WASL,RAP1A,AKT2,ACVR2B
LPS/IL-1-mediated inhibition of RXR function	0.005	NR1I3,CHST13,PPARGC1A,SLC10A1,RXRA,GSTA2,CYP2C19,NR5A2,MAOB,CYP2A6

AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase; FXR, farnesoid x receptor; IGF, insulin-like growth factor; LPS, lipopolysaccharide; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PTEN, phosphatase and tensin homolog; RXR, retinoid x receptor.

**Figure 2** MiR-182 is increased in alcoholic hepatitis (AH) and correlates with scores of disease severity. (A) Hepatic expression of miR-182 assessed by qPCR in AH (n=35) compared with normal liver (n=8), HCV-cirrhosis (CH) liver (n=11), non-alcoholic steatohepatitis (NASH) liver (n=9) and ALD-induced CH (ALD-CH) liver (n=9) samples. \* $p < 0.05$  vs controls, HCV-CH, NASH. (B) Hepatic expression of miR-182 correlates with MELD score; and with (C) baseline total serum bilirubin (mg/dL). (D) Hepatic expression of miR-182 among different types of bilirubinostasis. HC, hepatocellular; Canal/Duct, canalicular and/or ductular. \* $p = 0.01$ . Hepatic expression of miR-182 also correlates with hepatic expression of genes encoding liver progenitor cells (LPC) markers as (E) *Keratin 7* (F) and *EPCAM*. (G) Kaplan–Meier analysis showing 90-day mortality according to miR-182 hepatic expression in patients with AH. A threshold of  $2^{-\Delta\Delta ct} = 2.9$  was determined as a cut-off value with the best sensitivity and specificity to define patients with low ( $2^{-\Delta\Delta ct} < 2.9$ ) or high ( $2^{-\Delta\Delta ct} \geq 2.9$ ) hepatic expression of miR-182. ( $p = 0.01$ ). (H) miR-182 expression was determined in serum samples of patients with AH versus control individuals ( $p < 0.05$ ); expression was normalised with a Spike-In (cel-miR-39a-3p).



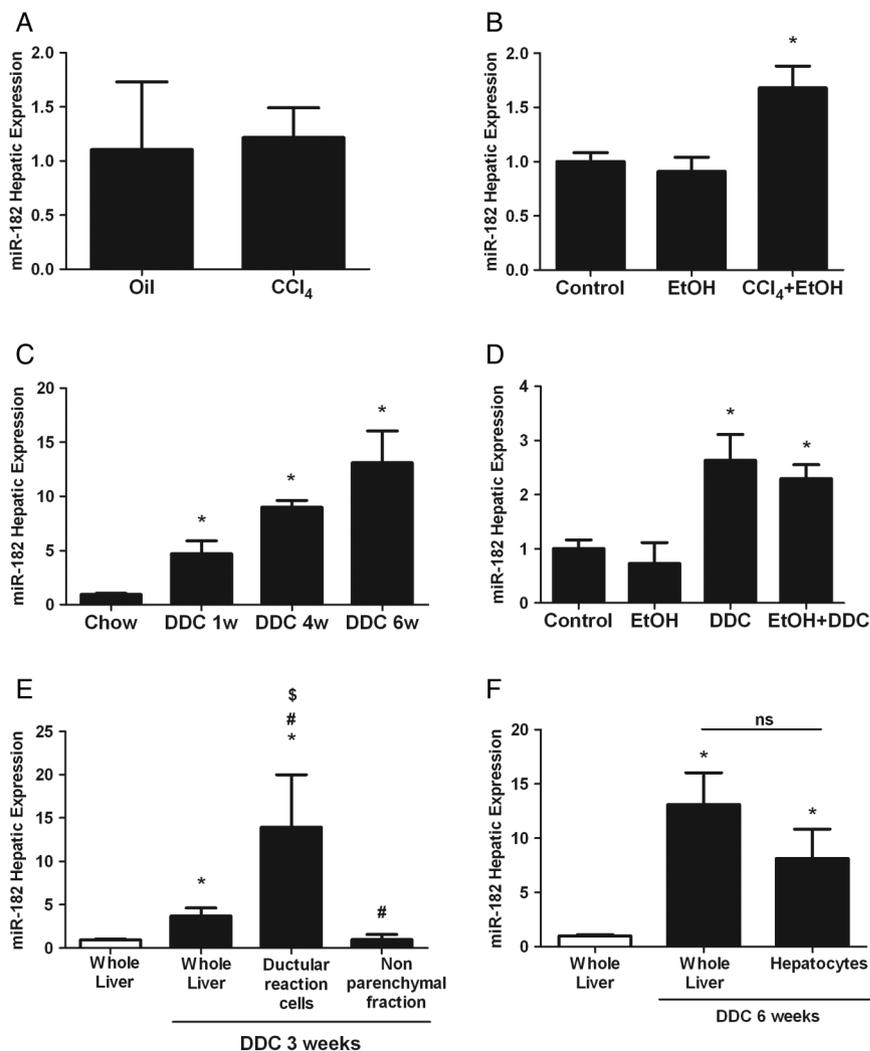
indicating that in injured liver miR-182 is expressed predominantly in ductular reaction cells and also in hepatocytes.

### Functional analysis of miR-182

In order to evaluate the potential role of miR-182 in liver injury, we blocked miR-182 function in DDC-treated mice by using a miR-182 decoy (decoy-182). MiRNA decoys are constructs that act as sponges binding to mature miRNAs and preventing the pairing to target mRNA. Healthy mice treated with decoy-182 or decoy-control did not show changes in liver transaminases and biochemical parameters (figure 4A). Importantly, administration of decoy-182 in DDC-treated animals induced a reduction of liver injury as shown by a decrease of ALT, AST and lactate dehydrogenase (LDH) serum levels compared with decoy-control (figure 4A). Moreover, decoy-182 decreased serum alkaline phosphatase (AP) levels as well as total bile acids in liver tissue, suggesting that miR-182

may be involved in bile acids metabolism and cholestasis (figure 4A,B). As shown in figure 4C, expression levels of key inflammatory genes such as *Mcp-1*, *Ccl20*, *Cxcl5*, *Cxcl1* or related to apoptosis like *Bcl2* were reduced in DDC-treated animals that received decoy-182 compared with decoy-control. Decoy-182 treatment in DDC induced a non-significant increase in *Slc1a1* expression and did not change the expression of *Cfl-1* in whole liver tissue (figure 4C). Liver histology and the extension of ductular reaction were assessed by a blinded pathologist. However, no major changes were observed in neutrophil infiltration (figure 4D). Because miR-182 was mainly expressed in ductular reaction, we selected the H69 human cholangiocyte cell line to assess the role of miR-182 in vitro. Transfection of H69 with a miR-182 mimic induced a downregulation of predicted targets *SLC1A1* and *Coflin1* and an upregulation of inflammatory and cell cycle genes such as *CCL20*, *CXCL1*, *IL-8* and *Cyclin D1* (figure 5A). Moreover,

**Figure 3** Differential hepatic expression of miR-182 in animal models of liver injury. MiR-182 hepatic expression in (A) mice treated with carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) (n=4) for 2 weeks; (B) mice treated with single ethanol gavage (n=3) or mice administered with CCl<sub>4</sub> plus ethanol gavage (n=4); (C) mice treated with 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) diet during 1 week (n=5), 4 weeks (n=5) and 6 weeks (n=3) compared with chow-fed mice (n=3); (D) mice fed with Lieber-de-Carli diet supplemented with ethanol (n=5), DDC (n=3) or ethanol plus DDC (n=6). To investigate the contribution of cells types to miR-182 expression, (E) non-parenchymal cells (n=3) and ductular reaction cells (n=3) were compared with whole liver (n=3). Whole livers and cell fractions were obtained from mice fed with DDC diet for 3 weeks (\*p<0.05 vs whole liver; #p<0.05 vs whole liver DDC; \$p<0.05 vs negative fraction). (F) Hepatocytes were isolated from liver of mice treated with DDC diet during 6 weeks and miR-182 expression was assessed. Results expressed as mean±SD.



transfection of primary hepatocytes and macrophages with a miR-182 mimic induced a downregulation of the predicted target gene *Cofilin1* and an upregulation of interleukin (IL)-6 in both cell types but did not change the expression of most inflammatory genes (figure 5B, C).

All together, these results suggest that miR-182 may be involved in cholangiocyte and liver injury and promote liver inflammation.

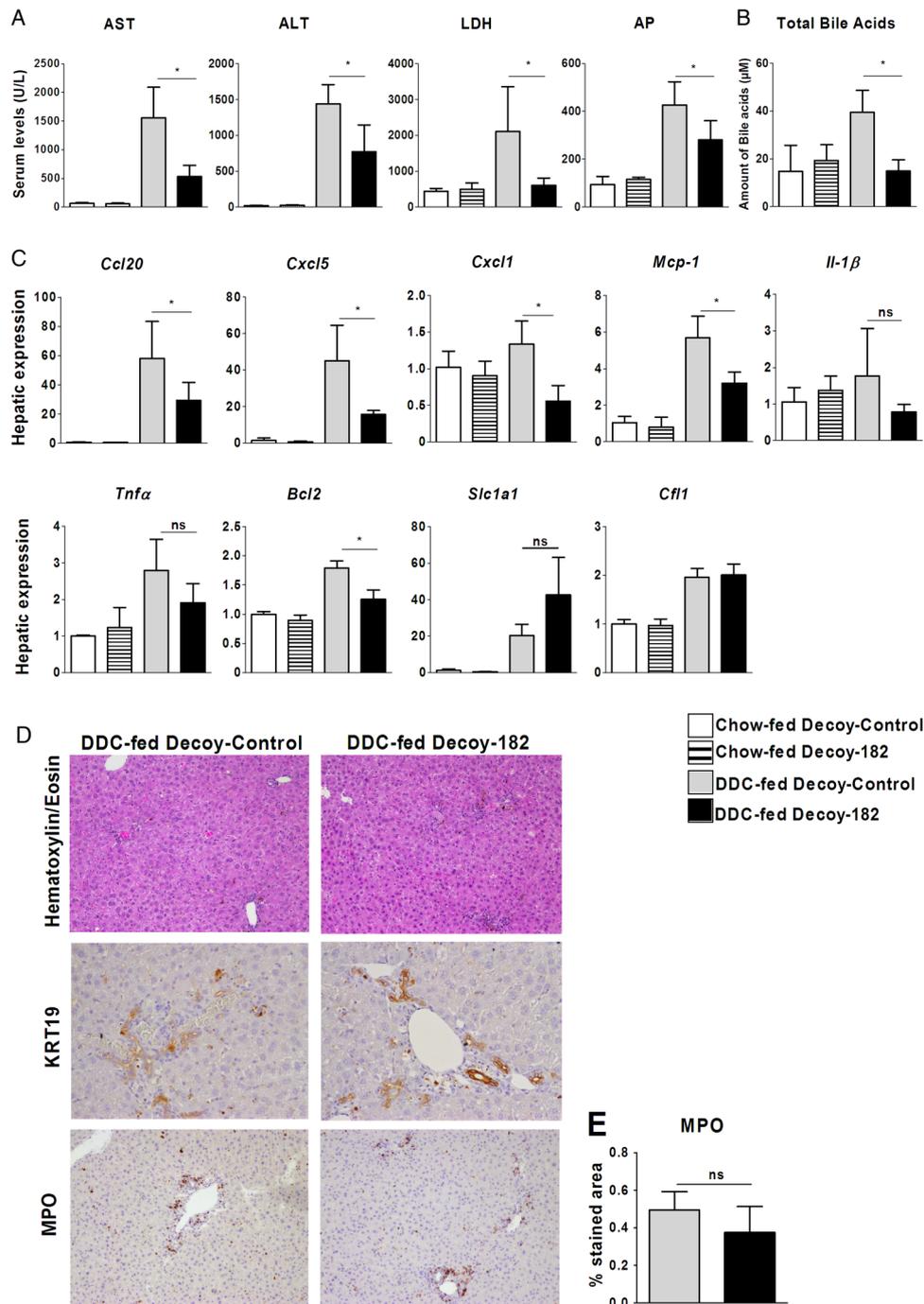
## DISCUSSION

In this study, we show that AH is characterised by an important change in miRNA expression. We compared the miRNA profile in different liver diseases to identify miRNAs that may be involved in the pathogenesis of AH. As a key differentially expressed miRNA, we identified miR-182, which expression correlates with disease severity and patient outcome. Experimental analysis of miR-182 in vitro and in vivo suggests that miR-182 may be involved in liver cell injury and inflammation. Moreover, integrative analysis of dysregulated miRNAs in AH and the role of their target genes suggest that key features of AH may be highly regulated by miRNAs, thus pointing out miRNAs as good targets to modulate the pathophysiology of AH.

In this study, we showed a global view of the miRNA landscape in AH. Moreover, we identified individual miRNAs with high probabilities of playing an important role in AH. In this

regard, we highlighted several miRNAs differentially expressed in AH. While most miRNAs identified have never been described in the context of liver disease, others such as miR-21, miR-155 and miR-214 have already been reported as regulators of key pathways in liver diseases. MiR-21 is known to regulate liver fibrosis<sup>24–26</sup> and regeneration.<sup>27–28</sup> MiR-155 has been described to be expressed in inflammatory cells in alcohol-induced liver disease<sup>29</sup> and in animal models of alcohol intake.<sup>30</sup> Moreover, a recent study described miR-214 as a regulator of liver fibrogenesis by exosomal intercellular communication.<sup>31</sup>

An important finding of this study is the identification of a set of miRNAs dysregulated in AH compared with chronic liver diseases. The inclusion of patients with ALD-CH, HCV-CH and NASH-CH in this study has yielded important information regarding which genes particularly involved in AH pathogenesis may be regulated by miRNAs. Interestingly, the computational integrative analysis with miRNAs and gene expression data suggested that miRNAs in AH may be regulating genes involved in bile acid metabolism, transport and xenobiotic metabolism. By microarray analysis, we identified 51 miRNAs potentially deregulated in AH compared with ALD-CH and normal liver. However, the expression of miR-182 in patients with AH and ALD-CH evaluated by qPCR did not yield statistically significant differences. These results may be due to the fact that decompensated patients with ALD-CH have high levels of AP,



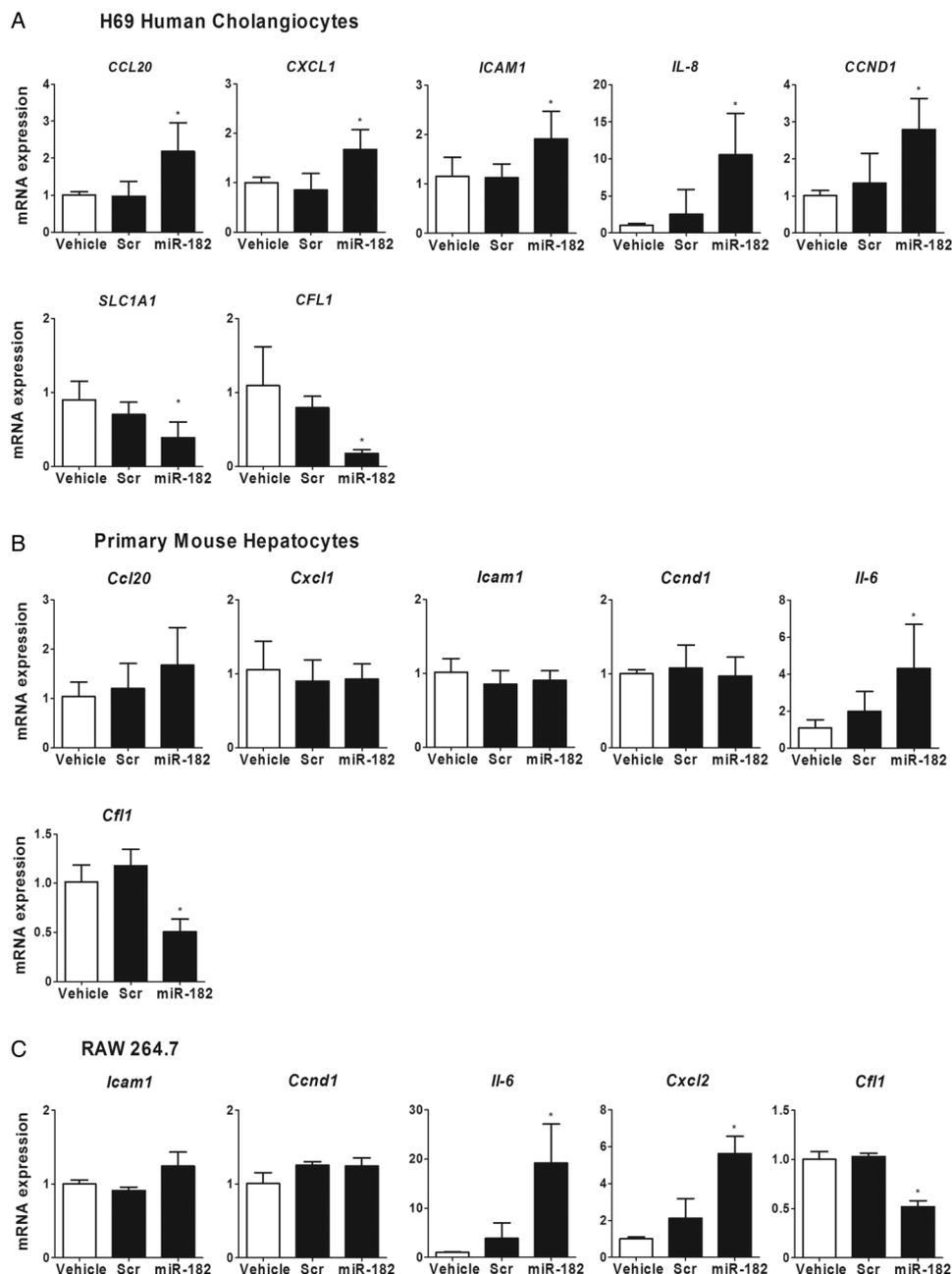
**Figure 4** Inhibition of miR-182 in 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) diet mouse model. Mice were fed with chow or DDC diet during 1 week and both groups were treated with four injections of a decoy-control or a decoy-182. (A) Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase (AP) serum levels were measured. (B) Levels of total bile acids measured in whole liver. (C) Hepatic gene expression measured by quantitative PCR and expressed as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . (D) Representative images of haematoxylin/eosin staining and immunohistochemistry of Keratin 19 and myeloperoxidase (MPO) in livers of DDC-fed mice treated with decoy-control or decoy-182. (E) Quantification of MPO-positive areas. Significances are shown above bars: \* $p < 0.05$ ; ns, non-significant.

bilirubinostasis and ductular reaction, parameters that correlate with miR-182 expression. Further studies should assess the expression of key miRNAs during the progression of ALD in bigger cohorts of patients in order to identify miRNAs specifically expressed in AH.

From all the miRNAs evaluated, we selected miR-182 for further evaluation based on its high expression in AH and its correlation with severity scores, including the outcome of patients with AH. Little is known about the role of miR-182 in

liver physiology and disease.<sup>13 32 33</sup> MiR-182 has been mainly described to be involved in cancer development and metastasis in several types of cancer,<sup>34–37</sup> including HCC and liver metastasis.<sup>38 39</sup> In the context of carcinogenesis, miR-182 has been reported to promote cell invasion, cell proliferation and angiogenesis. In liver, in vitro data suggest that miR-182 may have a role mainly in cholangiocytes, promoting the expression of inflammatory mediators, but also in hepatocytes and macrophages in which miR-182 induce the expression of IL-6.

**Figure 5** Mimicking the effects of miR-182 in vitro. Genes related to injury, inflammation and potential target genes of miR-182 were evaluated by qPCR in (A) H69 human cholangiocytes, (B) primary mouse hepatocytes and (C) a mouse macrophage cell line RAW 264.7. \* $p < 0.05$  vs cells transfected with scramble). Scr, scramble.



Notably, miR-182 has been proposed as a biomarker since several studies report its presence in blood circulation.<sup>40–42</sup> Although miR-182 can be found increased in blood in patients with AH, the poor correlation with disease severity scores and patients outcome suggest that may not be useful as a biomarker in the context of AH.

The lack of an appropriate animal model that reproduces the main features of AH precluded the assessment of the role of miR-182 in a single animal model. To overcome this limitation and to identify the possible mechanisms behind the induction of miR-182 upregulation, we undertook two approaches. First, we evaluated the correlation of miR-182 expression with histological and clinical data from patients with AH; and second, we evaluated its expression in different animal models of liver injury, each of which is a well-established model of key features of liver injury and resolution such as fibrosis, ductular reaction and cholestasis, inflammation or alcohol toxicity. Both clinical data and the data obtained from animal models suggested that

miR-182 is associated with cholangiocyte damage and ductular reaction, all relevant features in AH and known to be directly related to AH pathogenesis and patient outcome.<sup>3–4</sup> Moreover, we also found miR-182 to be mainly expressed in ductular reaction cells.

In order to explore the effects of miR-182 in vivo, we performed a loss-of-function study using a decoy for miR-182. In recent years, DNA-encoded miRNA decoys have been used to understand the role of miRNAs in vitro and in vivo in different disease models.<sup>43–45</sup> This approach is particularly interesting since it allows the long-term specific blockage of the desired miRNA. Treatment of DDC-fed animals with decoy-182 induced an important reduction of transaminases as well as LDH serum levels, suggesting the implication of miR-182 in liver injury. Interestingly, decoy-182 treatment had a profound effect on bile acid content and cholestasis since both, total bile acids in liver tissue and serum levels of AP, a surrogate marker of bile acid retention and a well-known marker of cholestasis,

were reduced in animals treated with decoy-182. Moreover, bile acid accumulation can have a cytotoxic effect causing liver injury and inflammation.<sup>46–48</sup> Therefore, reduced liver injury and inflammation observed in mice treated with decoy-182 could be an indirect effect resulting from the reduction of bile acid liver levels. Whether miR-182 is targeting genes involved in bile acid metabolism and transport or it is only indirectly associated with bile acid content will deserve further investigation. Although *in vitro* and *in vivo* studies with miR-182 suggest that interfering miR-182 may be a promising target in AH, further studies are required to better understand its role in liver disease. Moreover, we have to be cautious when proposing an miRNA as potential target for therapy since miRNAs are highly pleiotropic and expressed in several tissues and conditions.

This study does not provide information regarding the possible role of most of the miRNAs identified in AH. While some miRNAs might participate in the pathogenesis of the disease, others may be just markers associated with clinical features of AH. Interestingly, miRNAs have a great potential as biomarkers in the context of liver diseases, especially when detected in body fluids<sup>12 49 50</sup>; additional studies are necessary to evaluate whether other miRNAs besides miR-182 may be found in body fluids and can be used as non-invasive biomarkers of patient prognosis or for diagnostic purposes in AH.

Understanding the molecular mechanisms regulating the pathogenesis of AH is of utmost importance for the development of new therapies for AH. In 2012, we published the first transcriptome analysis of liver tissue from patients with AH, describing the main pathways dysregulated in this condition.<sup>17</sup> We have now expanded our understanding of the regulation of AH by describing an miRNA profile in AH and identifying miRNA involved in AH pathogenesis. Global miRNA changes in alcoholic liver diseases, together with the identification of key individual miRNAs that may regulate AH, will certainly stimulate our understanding of this disease, the development of new therapeutic strategies and the identification of biomarkers.

#### Author affiliations

<sup>1</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Department of Pathology, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Department of Liver and Gastrointestinal Diseases, Biodonostia Research Institute—Donostia University Hospital, University of the Basque Country (UPV/EHU), Ikerbasque, San Sebastian, Spain

<sup>5</sup>Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic and Department of Physiological Sciences I, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>6</sup>Division of Gastroenterology and Hepatology, Departments of Medicine and Nutrition, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA

<sup>7</sup>Liver Unit, Hospital Clínic, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

**Acknowledgements** This work was performed in the Centre Esther Koplowitz. The authors wish to thank Cristina Millán for her excellent technical support. For their advice and support, the authors want to thank Dr Silvia Affò and Dr Oriol Morales-Ibanez. They are indebted to the Genomics Unit and Cytometry and Cell Sorting Facility of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) for their technical help. The human cholangiocytes cell line (H69) was kindly provided by Dr Doug Jefferson, Department of Integrative Physiology and Pathobiology, Sackler School, Tufts University School of Medicine, Boston, MA. The keratin 19 (TROMA-III) antibody was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biology (Iowa City, IA). JA is part of the National System of Researches (SNI) and wishes to express his gratitude to the Mexican National Council of Science and Technology (CONACYT, Mexico City, Mexico) for partially supporting his predoctoral stay at IDIBAPS.

**Contributors** DB performed the experiments, collected and analysed the data, interpreted the data and wrote the manuscript. MV-C generated the integration

package miRComb and performed the integration analysis. MC, DR-T, ML, LP and BA collected and interpreted data and contributed to critical revision of the manuscript. JA and IG collected human samples and analysed the data. JLL generated the integration package miRComb and interpreted the data of the microarray. AD performed histological analysis of human and mouse samples. JMB, JC, RB, JC and PG helped to design some parts of the study and interpreted the data and contributed to critical revision of the manuscript. PS-B conceived and designed the study, interpreted the data and wrote the manuscript.

**Funding** This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria Carlos III (FIS), co-financed by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Unión Europea, 'Una manera de hacer Europa' (FIS P114/00320, P112/00330, FIS P112/01265 and FIS P111/01990 to PS-B, PG, JC and RB, respectively) and from the NIH (1U01AA021908-01-33490 to PS-B and 1U01AA021908 to RB). PS-B is funded by Instituto de Salud Carlos III, Miguel Servet (CP11/00071 and CON14/00129) and co-financed by Fondo Europeo de Desarrollo Europeo (FEDER), Unión Europea, 'Una manera de hacer Europa'. PG is funded by Agencia de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) 2014 SGR 708, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) and Institutí Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA). MC and IG are funded by Instituto de Salud Carlos III, by Sara Borrell and Rio Hortega grants respectively. MV-C and DR-T received a grant from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, FPU programme.

**Competing interests** None declared.

**Patient consent** Obtained.

**Ethics approval** Ethics Committee of the Hospital Clínic of Barcelona.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

#### REFERENCES

- Singal AK, Kamath PS, Gores GJ, *et al*. Alcoholic hepatitis: current challenges and future directions. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:555–64; quiz e31–2.
- Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 2011;141:1572–85.
- Altamirano J, Miquel R, Katoonizadeh A, *et al*. A histologic scoring system for prognosis of patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2014;146:1231–9. e1–6.
- Sancho-Bru P, Altamirano J, Rodrigo-Torres D, *et al*. Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2012;55:1931–41.
- Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 2011;12:99–110.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–97.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010;11:597–610.
- Andachi Y. A novel biochemical method to identify target genes of individual microRNAs: identification of a new *Caenorhabditis elegans* let-7 target. *RNA* 2008;14:2440–51.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, *et al*. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005;433:769–73.
- Cheung O, Puri P, Eicken C, *et al*. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology* 2008;48:1810–20.
- Peng X, Li Y, Walters KA, *et al*. Computational identification of hepatitis C virus associated microRNA-mRNA regulatory modules in human livers. *BMC Genomics* 2009;10:373.
- Trebicka J, Anadol E, Elfimova N, *et al*. Hepatic and serum levels of miR-122 after chronic HCV-induced fibrosis. *J Hepatol* 2013;58:234–9.
- Dolganovic A, Petrusek J, Kodys K, *et al*. MicroRNA expression profile in Lieber-DeCarli diet-induced alcoholic and methionine choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis models in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;33:1704–10.
- Meng F, Glaser SS, Francis H, *et al*. Epigenetic regulation of miR-34a expression in alcoholic liver injury. *Am J Pathol* 2012;181:804–17.
- Marin JJ, Bujanda L, Banales JM. MicroRNAs and cholestatic liver diseases. *Curr Opin Gastroenterol* 2014;30:303–9.
- Dominguez M, Rincón D, Abrealde JG, *et al*. A new scoring system for prognostic stratification of patients with alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2008;103:2747–56.
- Affò S, Dominguez M, Lozano JJ, *et al*. Transcriptome analysis identifies TNF superfamily receptors as potential therapeutic targets in alcoholic hepatitis. *Gut* 2013;62:452–60.
- Coll M, El Taghdouini A, Perea L, *et al*. Integrative miRNA and Gene Expression Profiling Analysis of Human Quiescent Hepatic Stellate Cells. *Sci Rep* 2015;5:11549.

- 19 Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods* 2007;4:721–6.
- 20 Haraguchi T, Ozaki Y, Iba H. Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2009;37:e43.
- 21 Mulloikandov G, Baccarini A, Ruzo A, et al. High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries. *Nat Methods* 2012;9:840–6.
- 22 Bertola A, Mathews S, Ki SH, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc* 2013;8:627–37.
- 23 Tsukamoto H, Mkrtchyan H, Dymnyk A. Intragastric ethanol infusion model in rodents. *Methods Mol Biol* 2008;447:33–48.
- 24 Wei J, Feng L, Li Z, et al. MicroRNA-21 activates hepatic stellate cells via PTEN/AKT signaling. *Biomed Pharmacother* 2013;67:387–92.
- 25 Zhang Z, Zha Y, Hu W, et al. The autoregulatory feedback loop of microRNA-21/programmed cell death protein 4/activation protein-1 (MiR-21/PDCD4/AP-1) as a driving force for hepatic fibrosis development. *J Biol Chem* 2013;288:37082–93.
- 26 Zhang Z, Gao Z, Hu W, et al. 3,3'-Diindolylmethane ameliorates experimental hepatic fibrosis via inhibiting miR-21 expression. *Br J Pharmacol* 2013;170:649–60.
- 27 Ng R, Song G, Roll GR, et al. A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver regeneration. *J Clin Invest* 2012;122:1097–108.
- 28 Dippold RP, Vadigepalli R, Gonye GE, et al. Chronic ethanol feeding enhances miR-21 induction during liver regeneration while inhibiting proliferation in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303:G733–43.
- 29 Bala S, Marcos M, Kodys K, et al. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor [alpha] (TNF[alpha]) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J Biol Chem* 2011;286:1436–44.
- 30 Lippai D, Bala S, Csak T, et al. Chronic alcohol-induced microRNA-155 contributes to neuroinflammation in a TLR4-dependent manner in mice. *PLoS ONE* 2013;8:e70945.
- 31 Chen L, Charrier A, Zhou Y, et al. Epigenetic regulation of connective tissue growth factor by MicroRNA-214 delivery in exosomes from mouse or human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2014;59:1118–29.
- 32 Geng X, Chang C, Zang X, et al. Integrative proteomic and microRNA analysis of the priming phase during rat liver regeneration. *Gene* 2016;575(Pt 1):224–32.
- 33 Van Keuren-Jensen KR, Malenica I, Courtright AL, et al. microRNA changes in liver tissue associated with fibrosis progression in patients with hepatitis C. *Liver Int* 2016;36:334–43.
- 34 Liu Z, Liu J, Segura MF, et al. MiR-182 overexpression in tumourigenesis of high-grade serous ovarian carcinoma. *J Pathol* 2012;228:204–15.
- 35 Li P, Sheng C, Huang L, et al. MiR-183/-96/-182 cluster is up-regulated in most breast cancers and increases cell proliferation and migration. *Breast Cancer Res* 2014;16:473.
- 36 Zhang Y, Wang X, Wang Z, et al. miR-182 promotes cell growth and invasion by targeting forkhead box F2 transcription factor in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2015;33:2592–8.
- 37 Sachdeva M, Mito JK, Lee CL, et al. MicroRNA-182 drives metastasis of primary sarcomas by targeting multiple genes. *J Clin Invest* 2014;124:4305–19.
- 38 Wang J, Li J, Shen J, et al. MicroRNA-182 downregulates metastasis suppressor 1 and contributes to metastasis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2012;12:227.
- 39 Huynh C, Segura MF, Gaziel-Sovran A, et al. Efficient in vivo microRNA targeting of liver metastasis. *Oncogene* 2011;30:1481–8.
- 40 Chen L, Chu F, Cao Y, et al. Serum miR-182 and miR-331-3p as diagnostic and prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2015;36:7439–47.
- 41 Meng X, Joosse SA, Müller V, et al. Diagnostic and prognostic potential of serum miR-7, miR-16, miR-25, miR-93, miR-182, miR-376a and miR-429 in ovarian cancer patients. *Br J Cancer* 2015;113:1358–66.
- 42 Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, Calatrava A, et al. Identification of miR-187 and miR-182 as biomarkers of early diagnosis and prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol* 2014;192:252–9.
- 43 Zhu Q, Sun W, Okano K, et al. Sponge transgenic mouse model reveals important roles for the microRNA-183 (miR-183)/96/182 cluster in postmitotic photoreceptors of the retina. *J Biol Chem* 2011;286:31749–60.
- 44 de Melo Maia B, Ling H, Monroig P, et al. Design of a miRNA sponge for the miR-17 miRNA family as a therapeutic strategy against vulvar carcinoma. *Mol Cell Probes* 2015;29:420–6.
- 45 Jung J, Yeom C, Choi YS, et al. Simultaneous inhibition of multiple oncogenic miRNAs by a multi-potent microRNA sponge. *Oncotarget* 2015;6:20370–87.
- 46 Allen K, Jaeschke H, Copple BL. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *Am J Pathol* 2011;178:175–86.
- 47 Rust C, Wild N, Bernt C, et al. Bile acid-induced apoptosis in hepatocytes is caspase-6-dependent. *J Biol Chem* 2009;284:2908–16.
- 48 O'Brien KM, Allen KM, Rockwell CE, et al. IL-17A synergistically enhances bile acid-induced inflammation during obstructive cholestasis. *Am J Pathol* 2013;183:1498–507.
- 49 Yamada H, Suzuki K, Ichino N, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clin Chim Acta* 2013;424:99–103.
- 50 Bala S, Petrusek J, Mundkur S, et al. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology* 2012;56:1946–57.



## Integrative microRNA profiling in alcoholic hepatitis reveals a role for microRNA-182 in liver injury and inflammation

Delia Blaya, Mar Coll, Daniel Rodrigo-Torres, Maria Vila-Casadesús, José Altamirano, Marta Llopis, Isabel Graupera, Luis Perea, Beatriz Aguilar-Bravo, Alba Díaz, Jesus M Banales, Joan Clària, Juan José Lozano, Ramon Bataller, Juan Caballería, Pere Ginès and Pau Sancho-Bru

*Gut* published online May 10, 2016

---

Updated information and services can be found at:

<http://gut.bmj.com/content/early/2016/05/10/gutjnl-2015-311314>

---

*These include:*

### References

This article cites 50 articles, 8 of which you can access for free at:  
<http://gut.bmj.com/content/early/2016/05/10/gutjnl-2015-311314#BIBL>

### Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

---

### Topic Collections

Articles on similar topics can be found in the following collections

[Hepatitis other](#) (153)  
[Pancreas and biliary tract](#) (1932)

---

### Notes

---

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>

## AGRADECIMIENTOS

---







Desde que estaba en la facultad de Biología supe que era una “bióloga de bata” y en seguida tuve claro que quería hacer la tesis doctoral ya que era la mejor manera de introducirme en la investigación. Por eso, cuando entré en este grupo como técnico de laboratorio, para ocuparme de un proyecto de investigación estaba muy emocionada. Pero después de un año quise convertir ese proyecto en mi tesis doctoral, un día entré al despacho, hecha un flan, a preguntarle a Pau que pensaba y él contestó: “¡Pues claro! ¿¿No lo habíamos hablado ya??” ¡Así empezó esta aventura!

Como no podía ser de otra manera quiero agradecer esta tesis a toda la gente que me ha acompañado estos 5 años. Primero quiero darle las gracias a Pau por seleccionarme y sobre todo por aquel *¡Pues claro!* Pau, sé que somos dos personas muy diferentes, pero creo que nos hemos entendido muy bien y dicen los chicos que cuando entro al despacho siempre te hago reír. Además, laboralmente hemos crecido juntos como doctoranda y director. Así que gracias Pau por dejar que me adentrara en esta profesión que me encanta.

Después quiero dar las gracias a la “familia” del laboratorio que me acogió aquel febrero de 2012, primero a Dani, Uri, Silvia, Eva y la Millán. A vosotros no haría falta que os explicase porque tenéis un hueco TAN especial en estos agradecimientos. Gracias Dani “marido-laboral” por ser un ejemplo de cómo siempre hay que intentar hacerlo perfecto, sé que a veces he sido dura contigo pero lo hacía porque quería que sacaras todo el potencial que hay en ti! Eres un super-científico! Gracias Uri por alegrar el laboratorio con tus sustos, tus canciones y tu buen humor! Ojala de verdad acabemos trabajando juntos!! Gracias Evis por ser una gran amiga, desde el primer día que hablé contigo supe que estábamos hechas la una para la otra y después de nuestra primera birroterapia no hubo marcha atrás. Además, laboralmente has sido un ejemplo de perseverancia. Gracias Silvia porque tú has sido la que más me ha enseñado de ciencia, me transmitiste tu amor por este trabajo y me has dado grandes trucos, TVB Simia! Gracias Cris por enseñarme tanto a nivel personal y laboral; tú me has enseñado que llegar hasta aquí requiere esfuerzo e ilusión y además me has enseñado que uno ha de luchar siempre por sus derechos. I loveiiuuuuu chicos! I love u soooo much!

También quiero agradecer al resto del Lab: Isa, Mar, Marta, Luis, Elisa y mis cheerleaders Bea y Jùlia. Gracias a todos por apoyarme cuando me habéis visto mal, por soportarme cuando me pongo en plan Señorita Rottenmeier y sobre todo por hacerme reír! Somos un Lab genial y no creo que encuentre un ambiente laboral tan increíble como el que tenemos. A las “mamis del lab” deciros además, que se nota vuestro instinto maternal y que cuidáis de nosotros. También quiero dar un mensaje especial para mis Cheerlys: sois unas tías increíbles y haréis unas tesis

## AGRADECIMIENTOS

de 10 (pero tenéis que ser más ordenadas!! XD). Habéis llenado el lab de energía, pero sobretodo me habéis alegrado a mí!

También quiero dar las gracias a “los Claria” tanto pasados como presentes, no sé la de experimentos, reactivos, consejos y trucos que me habéis dado! Sois los mejores vecinos que se pueden tener!

Pero no me quiero olvidar de nadie en la planta 3, por ello gracias a TODA la planta 3 del CEK, creo que en algún momento u otro os he molestado a todos y cada uno de vosotros! Jajaja Así que gracias por echarme un cable con reactivos o experimentos, pero sobretodo por las conversaciones de pasillo o de office ;-)

Y por supuesto a la Pepa! Gracias Pepa porque sin ti la planta 3 sería un absoluto caos! Eres una trabajadora nata y te mereces todos los regalos que te hacemos!

Ahora ya pego el salto a la vida personal... al principio, cuando pensaba en los agradecimientos no sabía si hablar de la gente de fuera del Lab, pero sencillamente no tendría las ganas, las fuerzas y la alegría en el trabajo sino fuera por toda la gente que me rodea! De hecho, mucha personas importante para mi están fuera, porque esta murciana que llevo a Barcelona hace casi 8 años ha tenido que aprender a construir toda una vida lejos de casa, de la familia y de muchos amigos... lo que supone aprender a vivir añorando... Ojala hubiera podido teneros a todos más cerca...

Gracias a mis biólogas: Viole, Angie, Gilda y Candy, por hacer de la carrera una de las etapas de mi vida en que más me he reído! Nenas somos el grupo más variopinto que existe y aun así 15 años y mucha distancia más tarde siempre tengo ganas de veros! Que viva siempre el comando 1,60!

Y a todo el resto de mi pequeñas/os: a las murcianas (Flor, M<sup>a</sup>Do, Ana, Lali), los compis de Bellaterra (Olivia y Paolo), Aitzar, Maitetxu y Sebas; gracias por escucharme quejarme de esta tesis, pero sobre todo gracias por seguir a mi lado, por las cervezas, los cafés y las horas de charla. A Sebas tengo que agradecerle especialmente el diseño de mi portada! A todos deciros que en los momentos más duros de estos años he contado los amigos que tengo alrededor y me he sentido increíblemente afortunada (suena a tópico, pero en mi caso es verdad! Jajaja)

También quiero dar las gracias a Xavi, de esta tesis has llegado en la segunda parte, pero te ha dado tiempo a ayudarme a solucionar más de un bloqueo mental! Todo lo demás que tengo que decirte petit, te lo diré en otra ocasión ;-)

Bueno, toca ponerse extra-ñoña porque toca agradecer a la familia. Tengo una familia bastante grande y en ella tengo auténticos ejemplos de vida, de como uno ha de luchar y ser feliz a pesar de todo. Por eso quiero agradecer a los Blaya, a los Martínez y a los Diez de Revenga. Tener 32 años de recuerdos y que los felices sean significativamente superiores, no lo puede decir cualquiera!

De entre todos ellos tengo 3 personas para las que no hay suficientes adjetivos:

Mi padre: Gracias papá, por ser un ejemplo de gran trabajador, siempre te han preocupado mucho mis estudios y mi carrera; yo he intentado siempre que te sintieras orgulloso de mí, espero haberlo conseguido.

Mi hermana: Gracias Blanca por ser un apoyo y una amiga, eres una mujer muy valiente y una madre increíble, ¡estoy muy orgullosa de ti! Y muchísimas gracias por haberme dado ese sobrino! (¡Deja de hacerte la loca y dame la receta de cómo se hace tan bien!)

Y mi madre: Gracias mamá por tu apoyo incondicional, tu cariño sin límites y tu gran sentido del humor. Me haces reír como nadie y si nos juntamos las 3 ya hay que sacar los pañales! Sé que eres la persona que más me quiere en este mundo pero yo si te quisiera más reventaría!

Por último, a los tres quiero deciros que si hay algo constante en este mundo de locos es vuestro apoyo y vuestro amor, espero que sepáis que yo también estaré SIEMPRE para vosotros! Os quiero hasta el infinito!

Es curioso escribir estas palabras de agradecimiento cuando todavía quedan algunas semanas para defender este trabajo, pero lo cierto es que me encanta poder agradeceros que, directa o indirectamente, me hayáis acompañado en este camino. Ha sido UN PLACER hacer esta tesis! Han sido una gozada estos 5 años, GRACIAS Y MIL VECES GRACIAS!