



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO.

**TÍTULO: MicroRNAs y esteatosis hepática no
alcohólica.**

Autor: Fátima María Gil-Casares Miláns del Bosch.

Tutor: Aránzazu Sánchez Muñoz.

Convocatoria: Febrero 2017.

RESUMEN.

Los microRNA (miRNA) son pequeñas moléculas de ARN no codificante reguladoras de la expresión génica. Participan en distintos procesos fisiológicos, incluyendo la diferenciación, la transformación neoplásica, la replicación y la regeneración celular: de ahí su gran relevancia fisiopatológica. Hasta el momento las investigaciones con mayor evidencia de la influencia de los miRNA en la patogenia de distintas enfermedades se han hecho en cáncer, y en menor medida en enfermedades hepáticas y cardiovasculares [4].

De entre las enfermedades hepáticas, los miRNA se involucran activamente en la patogenia del cáncer hepatocelular, hepatitis víricas, cirrosis, de la esteatosis hepática alcohólica y no alcohólica y otras enfermedades hepáticas -relacionadas con la vía biliar o el sistema inmunológico-.

La investigación del rol de los miRNAs en la patogénesis de estas enfermedades podría llevar a nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas.

En esta revisión bibliográfica, repasamos los tres miRNAs más estudiados de los que actúan en la patogenia de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), sean miR122, miR34a y miR33; y su función reguladora en la misma describiendo sus principales dianas, con el fin de reseñar la posible aplicación clínica de los miRNAs como biomarcadores diagnósticos.

PALABRAS CLAVE: MicroRNA, Enfermedades hepáticas, Esteatosis, fibrosis, cirrosis...

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

INTRODUCCIÓN A LOS microRNAs.

Gracias a los estudios en genómica y proteómica de los últimos años, hoy entendemos mejor la patogenia de distintas enfermedades, aumentando el número de agentes moleculares identificados que intervienen en los procesos patológicos.

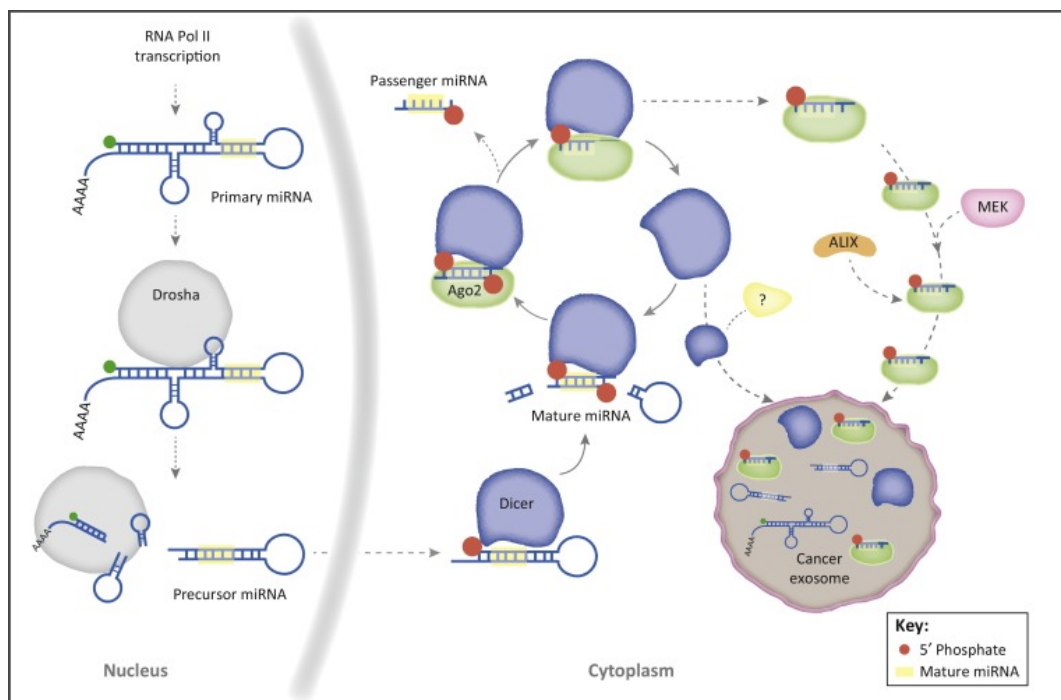
En hepatología, en la última década, los miRNA han sido identificados como moléculas fundamentales en la organogénesis del hígado, interviniendo también en la diferenciación de los distintos linajes hepatocelulares [4]. Según la etapa de la organogénesis en que se expresen

en mayor o menor proporción determinados miRNAs, su presencia podría relacionarse con distintos estadios de enfermedades hepáticas.

Los miRNAs son ácidos nucleicos pequeños, de entre 21 y 25 nucleótidos. Son moléculas de ARN endógeno que no codifican para proteína. Su función consiste en regular la transcripción génica, sea degradando el ARN mensajero sea inhibiendo la traducción. Cada miRNA tiene múltiples genes diana, pudiendo por tanto un mismo RNA controlar distintos procesos biológicos [1].

El origen de estas moléculas (Figura 1) proviene de la transcripción ya sea de genes que codifican para el propio miRNA -miRNA intergénicos- como de genes que codifican para proteínas entre las que se incluye el microRNA -microRNA intragénicos- [4]. En el caso de los miRNA intergénicos, las RNA polimerasas II o III (RNA Pol II/III) transcriben el gen, dando un miRNA primario (pri-miRNA). En el caso de los miRNA intragénicos el procedimiento es más largo: tienen que pasar por un proceso de maduración del mRNA por corte de intrones y empalme de exones, para producir su pri-mi-RNA. Posteriormente, los pri-miRNA pasan a ser precursores de miRNA (pre-miRNA) mediante el procesamiento por escisión -aún dentro del núcleo celular- por parte de la RNasa endonucleasa III (Drosha) y la proteína con la cual se acopla, DGCR8 (Pasha). El pre-miRNA será traslocado al citoplasma gracias a las proteínas RanGTP y Exportina 5 (Exp-5). Una vez el pre-miRNA se encuentra en el citoplasma, la ribonucleasa citoplasmática RNasa III (Dicer) junto con las proteínas TRBP y PACT cortan los bucles de los pre-mi-RNA, dando lugar a moléculas de 22 nucleótidos -aún de doble cadena-. De las dos hebras, sólo una es de miRNA maduro, siendo la otra de miRNA pasajero. El último paso de la biogénesis de los miRNA es la asociación de esta molécula de doble cadena con el complejo silenciador inducido por RNA (RISC), formado por las proteínas Dicer, TRBP, PACT, Gremlin 3 y una proteína de la familia Argonauta (AGO) que lleva a cabo el silenciamiento de los mRNA [4].

De esta manera, el miRNA es un regulador postranscripcional de la expresión génica mediante la unión por complementariedad parcial antisentido en la región 3'UTR del RNAm blanco. Esta unión tiene consecuencias: dificulta o aborta la traducción del ARNm al que se une, contribuyendo así al silenciamiento de determinados genes. Al ser una unión complementaria parcial (la complementariedad no tiene que ser perfecta) cada miRNA puede unirse a diferentes RNAm. De hecho, ciertos estudios bioinformáticos avalan que cada miRNA puede interferir con la expresión de centenares de genes, y un sólo ARNm puede ser regulado por miRNAs distintos [4].



Trends in Cancer

Figura 1 [30]: Biogénesis de los miRNA. Transcripción del gen o intrón codificante para el miRNA por la RNA Pol II/III dando el pri-miRNA y procesamiento por parte del complejo Drosha/DGCR8 dando pri-miRNA en el núcleo. Translocación de pre-miRNA al citoplasma por la exportina 5 asociada a RanGTP. Procesamiento por Dicer, asociada a TRBP que genera una molécula de doble cadena. Ésta forma un complejo con RISC -destaca la proteína AGO de RISC- dando un mi-RNA maduro, preparado para interactuar con su diana.

INTRODUCCIÓN A EHGNA.

La esteatosis hepática no alcohólica es, en el mundo occidental, la primera causa de enfermedad hepática crónica. Esta patología se asocia frecuentemente con síndrome metabólico, resistencia a la insulina y obesidad. De hecho, muchos autores consideran el hígado graso como el componente hepático del síndrome metabólico.

La patogénesis de EHGNA se describe como un proceso constituido por dos etapas distintas. La primera consiste en la acumulación de ácidos grasos en forma de vacuolas grasas en el citoplasma del hepatocito. En la segunda etapa, se activan procesos necroinflamatorios -con aumento de mediadores como TNFalfa, y disminución de adiponectina, entre otros- que llevan al estrés oxidativo del retículo endoplásmico. Por ese estrés oxidativo, aumenta la lipólisis, generando una mayor concentración de ácidos grasos circulantes que sobrecargan la betaoxidación, induciendo lesión hepatocelular y fibrosis, y que puede terminar en cirrosis y carcinoma hepatocelular [5].

Aunque todavía hoy no se conoce con certeza el mecanismo molecular que explica toda la progresión de EHGNA, sí se han descrito varios factores que juegan un papel clave en este proceso.

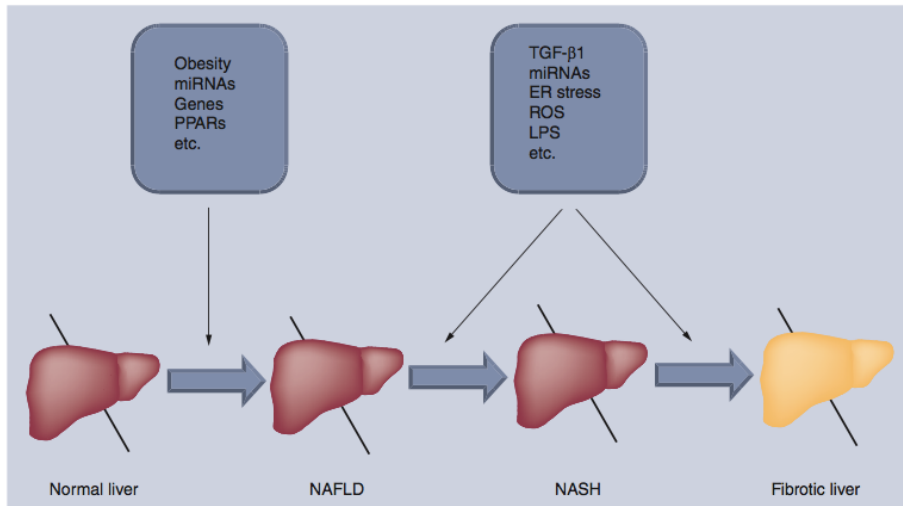


Figure 1. Schematic illustration of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis progression. Beginning with the simple hepatic steatosis, over time may progress to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and fibrosis. miRNAs involved in each step of the progression through interaction with their target gene or biological molecules, such as TGF- β 1.

Figura 2 [11]: Ilustración esquemática de la progresión EHGNA. EHGNA (NAFLD en la imagen, por su traducción del inglés Non alcoholic fatty liver disease se desarrolla desde la esteatosis simple y progresa a esteatohepatitis no alcohólica (NASH) e incluso fibrosis hepática por la intervención de varios de estos factores biológicos mencionados en el esquema. A destacar que tanto en el desarrollo de EHGNA desde la esteatosis simple como la progresión de EHGNA a fibrosis hepática se especifica que los miRNA juegan un papel importante.

Centrándonos en el papel de los miRNAs, la Figura 3 [8] nos muestra que, según el estadio en que se encuentre esta progresión, se expresan unos miRNAs u otros, con lo que la presencia de un determinado miRNA nos podría indicar si el hígado está sano, presenta esteatosis simple, esteatohepatitis, fibrosis o cirrosis.

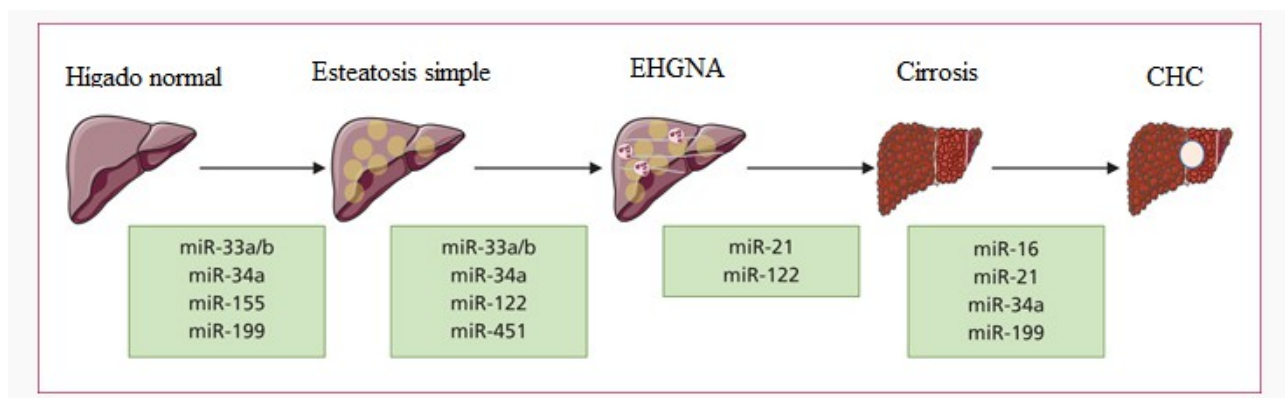


Figura 3: Principales miRNA hepáticos implicados en el desarrollo y la progresión de EHGNA hasta CHC (carcinoma hepatocelular). Figura adaptada de Canivet et al. [8].

El hígado graso, por ser una patología asintomática está infra-diagnosticada. Para diagnosticarla existen diferentes métodos, como podemos ver en la siguiente tabla (Tabla 1) [9].

TABLA 1. Marcadores serológicos y pruebas de imagen de hígado graso no alcohólico		
	Ventajas	Inconvenientes
Marcadores serológicos (NAFLD liver fat score, Fatty Liver Index)	Útiles para predecir la presencia de esteatosis Fácil Validados	No determinan el grado de esteatosis
Ecografía abdominal	Técnica de elección Accesible, fácil, bajo coste	Poco sensible para esteatosis leve (< 20%) Variabilidad interobservador. Obesidad, gas intestinal
Tomografía computarizada	Fácil de realizar Rendimiento similar a la ecografía	Menos accesible, coste elevado Poco sensible para esteatosis leve Irradiación
Resonancia magnética (RM)	Muy sensible (diagnóstico de esteatosis > 15%) No irradiación	Poco accesible, coste muy elevado Artefactos metálicos
RM espectroscópica	Diagnóstico de esteatosis > 5% Determina cambios > 0,5% con pérdida de peso	Coste muy elevado Poco disponible
CAP (controlled attenuation parameter)	Fácil Útil para predecir la presencia de esteatosis	Limitada para determinar el grado de esteatosis Poco accesible (de momento) Faltan estudios de validación

Según esta tabla, vemos que las posibilidades de diagnóstico son elevadas, pero ninguna es perfecta. Aquellas técnicas fáciles, accesibles y de bajo coste no son lo suficientemente precisas en su diagnóstico (los resultados son cualitativos, pero en ningún caso cuantitativos), y aquellas técnicas cuya sensibilidad es mayor son poco accesibles y de coste elevado.

En este contexto, y sabiendo que los microRNA son muy estables en circulación por viajar asociados a proteínas, encapsulados en microvesículas [18], se espera que se puedan utilizar como biomarcadores diagnósticos de EHGNA, mediante una simple extracción de sangre del paciente, llegando a un diagnóstico rápido, sencillo, accesible y de bajo coste.

El interés de esta revisión bibliográfica consiste en dar una visión amplia de los miRNAs que influyen de un modo más predominante en el desarrollo de la esteatosis hepática no alcohólica, facilitando la detección y seguimiento rápidos de esta patología tan prevalente hoy día.

La aplicación de los microRNA en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes puede tener grandes beneficios en la clínica: el gasto hospitalario se reduce -a mayor seguimiento en atención primaria, disminuye el desenlace cirrótico en numerosos casos-, aumenta la calidad de vida del paciente -con un tratamiento precoz de la esteatosis hepática disminuirían los casos de Diabetes Mellitus tipo II- y se facilitan nuevos estudios a nivel hepático, gracias a la obtención de resultados mediante pruebas menos invasivas que las utilizadas hoy día.

OBJETIVOS.

Esta revisión bibliográfica pretende resumir y recopilar la información de distintos estudios y revisiones sobre los miRNA y su papel determinante en la regulación del desarrollo y de la progresión de EHGNA.

METODOLOGÍA.

La práctica totalidad de los artículos utilizados provienen de la base de datos Pubmed.com, aunque también los hay de otras fuentes bibliográficas como sciencedirect.com, y bibliotecas online de la Universidad Complutense de Madrid y la Universidad de Navarra. También se realizó una búsqueda en google academic con los términos del tema central de esta revisión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

miRNA QUE INTERVIENEN EN LA PATOGÉNESIS DE EHGNA .

Según avanza la investigación, se ha visto que existen diferencias importantes en el progreso de EHGNA de unos pacientes a otros, y parece que estas diferencias podrían estar asociadas con una expresión alterada de microRNA, variable también de unos individuos a otros. Esto hace más complejo el establecimiento de pautas generales.

Son alrededor de 54 miRNA los que regulan 107 genes implicados en la patogénesis de la esteatosis hepática [11].

La Tabla 2 recoge 11 de estos 54 miRNA, que se expresan en hígado. Además, menciona algunos de los procesos biológicos regulados por ellos: procesos implicados en la progresión de EHGNA.

miRNA	Algunos de sus genes diana.	Proceso biológico que regulan.
--------------	------------------------------------	---------------------------------------

miR122	PPAR α , PPAR β , Smarcd1, Baf60a	Fibrogénesis. Esteatosis y actividad proinflamatoria.
miR21	PPAR α en hígado.	Metabolismo lipídico.
miR16	HGF y Smad7	Niveles asociados a fibrosis.
miR34a	SIRT1, FGFR, RXR α .	Esteatosis y actividad proinflamatoria.
miR192	SREBF1	Esteatosis y actividad pr-inflamatoria.
miR33a/b	SREBP, ABCA1...	Homeostasis del colesterol.
miR155	PPRE, PPAR α .	Atenúa esteatosis. Reduce TG y colesterol en sangre. Proceso proinflamatorio.

miR451	ATF2	Favorece proceso proinflamatorio.
miR107	Caveolin-1	Promueve acumulación de lípidos en hepatocitos. Hiperglucemia.
miR26a	Inhibidores de MAPKs.	Favorece sensibilidad a insulina.
miR301	IRF1, TRIM3	Disminuye glicogénesis hepática.

Tabla 2: miRNA expresados en hígado que intervienen en el desarrollo y progresión de EHGNA. En esta tabla se describen 11 de los 54 miRNA que regulan genes implicados en el desarrollo de la esteatosis hepática así como sus principales genes diana. Además se mencionan los procesos biológicos regulados a través de la interacción de estos miRNA con sus genes diana, procesos significativos en el desarrollo de EHGNA [2] [4] [8] [11].

Existiendo tantos miRNAs que parecen influir en el mecanismo de EHGNA, y teniendo en cuenta que cada miRNA regula no un único gen sino muchos, decidimos acotar nuestra búsqueda. Por ello nos centraremos en los tres miRNAs más estudiados en el contexto de la esteatosis hepática por tener una relevancia especial (sean miR122, miR34a y miR33) y describiremos su intervención en el metabolismo lipídico cuyo desequilibrio es el principal causante de la esteatosis hepática: origen de EHGNA.

La grasa hepática en un individuo sano procede de los ácidos grasos libres provenientes del tejido adiposo, de la lipogénesis de novo y de los ácidos grasos provenientes de la dieta. En el hepatocito, estas grasas se esterifican a triglicéridos y bien son liberados a sangre como partículas VLDL o bien son hidrolizados de nuevo para ser sustratos de la betaoxidación. Por lo tanto, la acumulación de grasa en el citoplasma del hepatocito puede deberse al aumento de ácidos grasos que alcanzan el hígado por la vena porta, al incremento de la lipogénesis de novo o a la disminución de la beta-oxidación o de la secreción de triglicéridos en forma de VLDL [24].

En pacientes que sufren EHGNA, el 60% de los triglicéridos hepáticos vienen de los ácidos grasos libres circulantes, el 25% deriva de la lipogénesis de novo y el 15% restante se forma por los ácidos grasos provenientes de la dieta [25].

Para estudiar los tres miRNAs citados y su influencia en el metabolismo lipídico, seguiremos lo que nos sugiere esta imagen [19] (Figura 4).

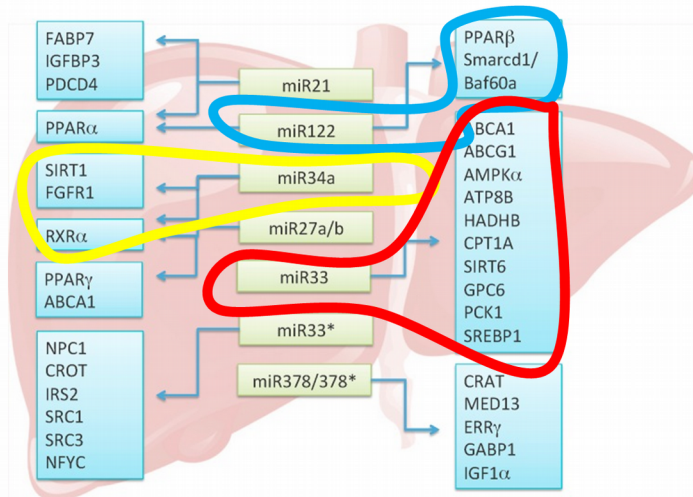


Figura 4 [19]: miRNAs que tienen un papel clave en el metabolismo lipídico e intervienen por tanto en el establecimiento de EHGNA y principales genes diana de estos miRNAs. Marcados los que nos competen en esta revisión bibliográfica: en azul, miR122 y cuatro de sus genes diana. En amarillo, miR34a y tres de sus genes diana y por último en rojo miR33 y diez de sus genes diana.

miRNA 122.

miRNA 122 es el único miRNA considerado como específico del hígado (el patrón de expresión de este miRNA no es ubicuo -no se expresa en otros tipos celulares-) [6]. Además, la expresión de miR122 representa el 70% de la expresión de miRNAs en hígado, por lo que cobra una importancia considerable como biomarcador de enfermedad hepática, y por consiguiente de EHGNA [12].

Los estudios realizados sugieren que sólo miR-122 podría regular la expresión de más de 170 genes [18], sin embargo y como hemos sugerido anteriormente, únicamente serán descritos parámetros que influyan en el metabolismo lipídico.

Aunque los conocimientos sobre la evolución de los niveles de miR122 son reducidos [33], diversos estudios sugieren que este miRNA puede utilizarse como biomarcador de la EHGNA [33]. Además, la mayoría de estudios se han realizado en modelos murinos, y posteriormente se ha visto que no son comparables a los humanos en todos los aspectos.

Citando un estudio hecho en ratones, la inhibición de la expresión de miR122 lleva a la regulación negativa de enzimas que intervienen en el metabolismo lipídico [5], y a la regulación al alza de enzimas que participan en la beta oxidación [32]. El silenciamiento de este miRNA tenía como consecuencia una importante reducción de la colesterolemia, asociada a una reducción en hígado de murinos de la expresión de genes que intervienen en la síntesis del colesterol. Cuando el ratón era alimentado con una dieta alta en grasa, miR122 conducía a una disminución de la síntesis endógena de colesterol [17]. Esto se explica porque, en ratones, el silenciamiento de miR122 resulta en una reducción hepática en la expresión de genes que participan en la síntesis del colesterol: 3-hidroxi-metilglutaril-CoA sintetasa 1 (HMGCS1), 7- dehidrocolesterol reductasa (Dhcr7) y 3-hidroxi-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCR) [31]. Además las observaciones resultaron coherentes con la represión por parte de este miR de la enzima FASN (enzima sintasa de ácidos grasos).

Sin embargo, los resultados en humanos en un principio son inversos. El silenciamiento de miR122 en células HepG2, conduce a un incremento inicial de HMGCR y SREBP-2 (su mecanismo será descrito más adelante), que son claves en la síntesis del colesterol. La síntesis de colesterol endógeno en humanos se ve aumentada en el primer momento en que miR122 se ve inhibido [17]. El silenciamiento de miR122 conduce también a un aumento de AMPK, importante también en el metabolismo de lípidos (vía descrita también más adelante). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos por los que esto ocurre [34].

Según Gatfield et al., la supresión de miR-122 en el hígado mostró una marcada disminución en los niveles totales de triglicéridos en suero[27]. Esto se debe a que miR122 activa a MTP (proteína microsomal de transferencia de triglicéridos) aumentándose la concentración de VLDL en sangre [34].

Todo esto nos muestra que la regulación de miR122 es distinta en humanos y en ratones, lo que dificulta notoriamente la investigación, además de confundir a lectores que consulten únicamente estudios realizados a murinos y extrapolen a humanos.

En pacientes con EHGNA, se ha visto que miR122 en hepatocitos se expresa mayoritariamente en una región vecina a la pared celular, sugiriéndose que miR122 está listo para ser exportado al torrente sanguíneo. Este descubrimiento relaciona los bajos niveles de miR122 en hepatocitos de pacientes con EHGNA con los altos niveles de miR122 circulantes de los mismos, más que con una regulación negativa de la expresión del miRNA. Es decir: EHGNA está asociado con niveles superiores de miR122 en suero que un paciente sano, pero

niveles inferiores de miR122 en tejido hepático que un individuo sano. Este aumento de miR122 en suero activa las células estrelladas hepáticas y los procesos fibrogénicos.

Como primera diana describiremos dos isoformas de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs). Pertenecen a la familia de receptores activados por el peroxisoma, que son receptores nucleares que interaccionan con fragmentos de ADN, regulando la expresión de genes que influyen en el control de la homeostasis lipídica o la inflamación.[24]. PPAR α y PPAR β se encuentran en hígado y ambos presentan una función catabólica [27].

PPAR α es la isoforma predominante en hígado[27]. Es el principal regulador de la oxidación de ácidos grasos, por inducir la expresión de genes que intervienen en ella. En un estudio en ratones en que se silenció PPAR α , en condiciones de ayuno o alimentados con una dieta alta en grasas, se desarrolló EHGNA. Inversamente, en los ratones a los que se estimuló PPAR gracias al uso de un agonista, mejoró la esteatosis hepática del ratón por inducir la oxidación de ácidos grasos hepáticos, inhibir la lipogénesis hepática y mejorar la inflamación del hígado [26]. En EHGNA, los niveles de miR122 en suero se ven aumentados. Estos niveles inhibirían PPAR α , lo que favorece aún más la progresión de EHGNA a esteatohepatitis.

Por otro lado, estudios de Western Blot con extractos de hígado sugieren que el silenciamiento de miR122 aumentaba en dos o tres veces la expresión de PPAR β [27]. Es decir: existe una regulación positiva de PPAR β por inactivación de miR122. En EHGNA, se produce la acumulación de colesterol libre en células estrelladas hepáticas, lo que aumenta la expresión de miR122, suprimiéndose la señalización de PPARs. Esto activa factores proinflamatorios que finalmente desencadenan una fibrosis hepática.

Además de regular la expresión de los receptores PPAR, miR122 también regula la expresión de dos factores que actúan en conjunto y que están además relacionados con la expresión de PPAR α . Estos son Smarcd1 y Baf60a [27]. Forman parte de un complejo de remodelación de la cromatina [27]. La sobreexpresión de estos factores de transcripción en el hepatocito induce la activación de proteínas implicadas en la oxidación de ácidos grasos, es decir: presentan el mismo efecto que un agonista de PPAR α [27]. Además, tanto Smarcd1 como Baf60a no solo interactúan con PPAR α , sino que esta interacción es necesaria para llevar a cabo su función. Estos genes se regulan negativamente mediante un mecanismo

directo vía miR122. Cuando miR122 está silenciado, aumenta la expresión de Smarcd1 y Baf60a [27].

miRNA 34a.

Mir-34a tiene un papel fundamental en el mantenimiento celular: regula la activación de la senescencia, la detención del ciclo celular y la apoptosis. Por ello, parece ser un factor central en el desarrollo de NASH, dada la necrosis hepática que se produce en esta enfermedad.

Uno de los principales genes diana de miR34a es la Sirtuina 1 (SIRT1). miR34a se une al ARNm de esta proteína, reprimiendo su traducción, aunque no influye en su degradación. SIRT 1 es una desacetilasa dependiente de NAD. Entre sus dianas se encuentra p53: al desacetilar a p53, se modula la apoptosis en circunstancias de estrés oxidativo [12]. p53 es un factor que, en su forma activa, favorece el control del ciclo de división celular y la apoptosis. La forma activa es la forma acetilada en residuos de lisina concretos. Cuando SIRT1 desacetila a p53, ésta pierde sus funciones, favoreciéndose la división descontrolada y la resistencia frente a señales pro-apoptóticas [23]. Esto conduce a un aumento de la inflamación. miR34a inhibe la traducción de SIRT1, y es clave por tanto en la regulación de la inflamación que promueve el establecimiento de EHGNA [17]. Por este motivo, tanto la inhibición de miR34, como de p53 o la inducción de SIRT1 están siendo puntos de investigación como posibles dianas terapéuticas [17].

Además, SIRT-1 ejerce una regulación indirecta sobre la proteína quinasa estimulada por el AMP (AMPK). Al aumentar SIRT1, aumentan los niveles de la cinasa LKB1, que fosforila a AMPK en función del cociente AMP/ATP con el fin de que regule el metabolismo sea mediante las vías anabólicas o catabólicas. AMPK activa (la forma fosforilada por LKB1) fosforila a su vez otras proteínas de sistemas de señalización intracelular de vías catabólicas que producen ATP y en la inhibición de vías anabólicas que consumen ATP. Por ejemplo, AMPK fosforila a 3-hidroxi-3-metilglutarilCoa reductasa (HMGCR). Esta última es la enzima que cataliza la reacción por la que HMGC_oA pasa a ácido mevalónico: reacción imprescindible en la síntesis del colesterol.

Al sobreexpresarse miR34a, se suprime SIRT1, con lo que no se expresa LKB1 y AMPK queda sin fosforilar. AMPK no puede fosforilar a HMGCR, quedando ésta en su

forma activa, no fosforilada, y aumenta la síntesis del colesterol endógeno en dos veces [20] que se acumula en el citoplasma del hepatocito favoreciendo la aparición de esteatosis [20].

Por otro lado, miR34a regula inhibe RXR α , una isoforma RXR (receptor nuclear específico) altamente expresada en el hígado [28]. Este receptor regula la homeostasis lipídica. En estudios en ratones, se determinó que las concentraciones de triglicéridos en suero de ratones que tenían silenciado RXR α fueron notoriamente superiores [28]. La sobreexpresión de RXR α inhibe la síntesis de colágeno, reduciendo la progresión de la fibrosis hepática. La disminución de RXR α aumenta la susceptibilidad a esteatosis hepática así como a esteatohepatitis [28].

Además, miR34a inhibe FGFR1 (Receptor del factor de crecimiento de fibroblasto), receptor clave en la regulación del metabolismo hidrocarbonado. Esto hace que los niveles de factor de crecimiento del fibroblasto (FGF) libres se vean aumentados, por no tener receptor al que unirse. FGF es un factor que induce el ciclo celular, facilitado la proliferación de células precursoras, como los colagenoblastos -un tipo de fibroblastos-. Al proliferar los colagenoblastos, aumenta la fibrosis. De hecho, los niveles plasmáticos de FGF se correlacionan con el estadio de fibrosis hepática [29].

miRNA 33.

Otro miRNA que participa en la regulación de los ácidos biliares, la betaoxidación de los ácidos grasos y el metabolismo del colesterol, es miR33. Se ha descrito que miR33 inhibe genes implicados tanto en el metabolismo de los ácidos grasos como en la señalización de la insulina en los hepatocitos: de ahí su papel fundamental en la patogénesis de EHGNA.

miR33 tiene dos isoformas: miR33a y miR33b, cada una proveniente de una isoforma de su gen anfitrión que será descrito más adelante como una de las dianas del mismo miRNA. De estas dos isoformas, la que está relacionada con la EHGNA es miR33a, dado que sólo la expresión de este último aumenta de manera progresiva con el desarrollo de EHGNA [17].

Las dianas identificadas para miR33 incluyen los transportadores dependientes de ATP (ABCA1 y ABCG1) la proteína-quinasa α activada por AMP (AMPK α), una ATPasa transportadora de amonifosfolípidos tipo 8B (ATP8B1), el gen HADHB que codifica para una proteína mitocondrial trifuncional que actúa como una enoil-CoA-hidratasa, una 3-hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa y una 3-cetotiolasa de ácidos grasos de cadena larga, la carnitina-palmitoil transferasa 1A (CPT1A), la sirtuina 6 (SIRT6), el glican 6 (GPC6), la

fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (PCK1) y su propio gen hospedador -del que proviene miR33- la proteína de unión al elemento regulador del esterol, SREBP. El papel de SREBP será descrito y discutido más adelante.

En estudios hechos en ratones, se mostró que el silenciamiento de miR33 aumentó los niveles plasmáticos de HDL [19]. Al inhibirse miR33, se expresan además en mayor medida ABCA1 y ABCG1-genes codificantes de un transportador dependiente de la unión de ATP-, aumentándose el flujo de salida (eflujo) de colesterol tanto a ApoA1 como a HDL. Los niveles de expresión de miR33a -regulador post-transcripcional de ABCA1- se correlacionaron positivamente con la severidad de EHGNA [17]. Por lo tanto, la sobreexpresión de miR33 en hepatocitos que ocurre en EHGNA genera una disminución en la expresión de ABCA1 y, con ella, del eflujo de colesterol.

Además, estudios adicionales, también en ratones, afirman que la acumulación de colesterol libre en las células estrelladas hepáticas promueve la progresión de EHGNA a fibrosis hepática, se intuye que mediante el aumento de miR33a, llevando a la supresión de ABCA1 y del eflujo de colesterol [17]. Es decir, que miR33a podría contribuir en el desarrollo de EHGNA por la acumulación del colesterol hepático que se produce al dificultar el eflujo de éste mediante los transportadores ABCA1. Esto nos lleva a pensar que quizá una modulación controlada de miR33 podría ser una potencial alternativa terapéutica.

Aunque los mecanismos de regulación de AMPK α -descrita anteriormente por su relación con SIRT1, diana de miR34a- aún no se conocen completamente [20], la activación de esta proteína quinasa reduce tanto la resistencia a la insulina como la esteatosis hepática, gracias a que estimula la oxidación y la cetogénesis de los ácidos grasos hepáticos [23]. Esto nos lleva a pensar que miR33a ejerce una regulación por disminución: al aumentarse la expresión de miR33a, se suprime la de AMPK α .

ATP8B1 es un transportador canalicular específico del hepatocito necesario para la secreción biliar: proceso fundamental para la homeostasis de esteroides. La modificación de los niveles de miR33 genera, a través de la regulación de ATP8B1, cambios en la secreción biliar, lo que conduce a un aumento de esteroides en la bilis llevando a un transporte inverso del colesterol: el colesterol regresa a los hepatocitos, favoreciendo la aparición de esteatosis, e influyendo por tanto en el establecimiento de EHGNA [21].

Por otro lado, HADHB es la subunidad β de la proteína trifuncional mitocondrial. Ésta cataliza los tres últimos pasos de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena

larga [23]. Existen hallazgos que indican que miR33 es capaz de inhibir la expresión de HADHB, lo que lleva a una deficiencia en la oxidación de ácidos grasos en células hepáticas, llevando a la acumulación de estas grasas en el citoplasma, estableciéndose el primer estadio de la esteatosis [22].

CPT1a es una enzima mitocondrial cuya función consiste en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana uniéndolos a la carnitina. Es la enzima limitante que determina la velocidad de la oxidación de los ácidos grasos [23]. miR33 inhibe la expresión de CPT1a: por lo tanto en pacientes de EHGNA, en que miR33 está aumentada, los ácidos grasos no son transportados a través de la membrana celular, por lo que se acumulan en citoplasma, generando esteatosis [23].

Otro gen diana de miR33 es la histona desacetilasa SIRT6. En un estudio hecho en ratones se informa de que la deficiencia de SIRT6 provoca importantes hipoglucemias, por lo que parece tener un papel importante en el metabolismo de la glucosa. Además, en ese mismo estudio se vió que la disrupción de este gen mediada por miR33 tiene como consecuencia la formación de hígado graso por favorecer la glucólisis y la síntesis de triglicéridos [23].

La regulación del proteoglicano GPC6 y la de PCK1 por parte de miR33 tiene efectos en el metabolismo de la glucosa: concretamente, en la gluconeogénesis hepática. La sobreexpresión de miR33 en hepatocitos inhibe la expresión de estas dos hormonas, reduciéndose considerablemente la producción de glucosa. Aunque no jueguen un papel directo en el metabolismo de lípidos y por tanto en la patogénesis de EHGNA, los nombramos porque sí lo hacen indirectamente mediante el desajuste de la homeostasis de lípidos y glucosa.

Por último, siguiendo el esquema de la Figura 4, miR33 regula el gen SREBP. Éste es su gen anfitrión: miR33 proviene de él. Este gen tiene dos isoformas, SREBP1 y SREBP2, y de cada una de éstas surge una de las isoformas de miR33, a y b respectivamente. Ambas son factores de transcripción, proteínas de unión al elemento regulador del estero. Se distinguen principalmente en que SREBP1 actúa en la biosíntesis de ácidos grasos en casos de resistencia a la insulina (condición, al menos incipiente, común en individuos con EHGNA) mientras que SREBP2 participa en la biosíntesis del colesterol.

Al venir del mismo gen, SREBP y miR33 se coexpresan y funcionan por tanto de manera concomitante [23].

El papel en el organismo de SREBP consiste en controlar los niveles de colesterol celular, tanto en el interior de la célula como en la membrana [23]. Un aumento de la actividad de SREBP lleva a una mayor acumulación de lípidos en la célula. [23].

Como hemos citado anteriormente, miR33 regula diversos genes clave en el transporte del colesterol, como son los transportadores ABCA1. Al regular estos genes, se interpreta que miR33 protege a la célula frente a la pérdida excesiva de esteroides celulares [23].

SREBP es sintetizado como una forma precursora anclada al retículo endoplásmico y a la membrana nuclear que requiere de un proceso proteolítico para ser activa. Esa forma activa, o forma madura, migra al núcleo celular para regular la transcripción.

El proceso proteolítico, y por tanto la liberación de SREBP activo, se ve regulado por los niveles de colesterol. El factor SCAP (SREBP cleavage activating protein) anclado también al retículo endoplásmico tiene un dominio que se asemeja a la HMGCR, sujeto a la degradación estimulada por el esteroide. Así, SCAP actuará como un sensor que detecta la presencia de esteroide. A menores niveles de colesterol, SCAP sufre un cambio de conformación por el que se liberan dos proteínas Insig. formándose el complejo SREBP-SCAP. Éste complejo migra del retículo endoplásmico al aparato de Golgi, donde actúan unas proteasas llamadas RIP (de su nombre en inglés, regulated intramembrane proteolysis) [24]. Una vez las proteasas liberan el extremo N-terminal de SREBP, SREBP ya activo migra al núcleo celular donde ejerce su función: se une a su promotor activando la transcripción de sus genes blanco: genes entre los que se encuentra el mismo SREBP. Sin embargo, cuando el contenido de esteroides intracelular es suficiente, SCAP se unirá al colesterol, que promueve su interacción con Insig., manteniendo el SREBP y el SCAP separados en el retículo endoplásmico [24].

Existen numerosos factores que regulan los niveles de SREBP, desde factores nutritivos y hormonales, hasta el estado nutritivo del individuo -insulinemia- y otros factores de transcripción. De éstos, el nivel de insulina en sangre puede aumentar hasta en 40 veces en ARNm de SREBP [24]. En muchos casos, EHGNA está asociado a un estado de insulinorresistencia, en que los niveles de insulina en sangre, aunque inefectivos, son elevados. Por este motivo la regulación de SREBP por la insulina cobra una importancia especial en esta revisión. A través de la vía Akt/PKB, la insulina decrece la afinidad de SCAP por las proteínas Insig., lo que favorece la formación del complejo SCAP-SREBP que será procesado activando a SREBP, aumentando a la vez su sobreexpresión, y con ella la de

miR33, que regulará todos los genes nombrados anteriormente. Esto tendrá efectos en el eflujo del colesterol, disminuyéndolo, en la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos y en la inducción de la síntesis de ácidos grasos y colesterol, favoreciendo además su permanencia en la célula y acumulación impulsando el desarrollo de EHGNA a esteatohepatitis.

Está en investigación el potencial uso de inhibidores de SREBP para disminuir la expresión de miR33, lo que ralentizaría la progresión de EHGNA.

CONCLUSIONES.

Tras buscar cómo influyen distintos miRNAs en la enfermedad de hígado graso no alcohólica, se ha podido comprobar que la desregulación en la expresión de un gran número de ellos puede contribuir al mal funcionamiento del organismo. Son muchos los que participan en la patogénesis de esta enfermedad. En esta revisión bibliográfica se ha visto que miR122 influye de manera directa en esta patogénesis, regulando PPAR α , PPAR β y otros genes del metabolismo lipídico que favorecen la acumulación de grasas en los hepatocitos contribuyendo al establecimiento de EHGNA. También se ha resaltado la importancia de miR34a por regular factores de transcripción como SIRT1 que modula la apoptosis de las células hepáticas, y factores transcripcionales como RXR o FGFR, que promueven la fibrosis. Por último se han descrito numerosos genes diana de miR33, a resaltar SREBP2 y transportadores como ABCA1 y ABCG1, que intervienen en la homeostasis del colesterol -que se desregula en pacientes con EHGNA- y, una vez más, en el metabolismo lipídico, promovándose la infiltración y acumulación de lípidos en hepatocitos.

Todos estos aspectos nos llevan a discutir sobre posibles dianas terapéuticas que están ahora en estudio, como inhibidores de los miRNA estudiados (por ejemplo de miR122) o de los genes diana o anfitriones de los mismos (de especial importancia, SREBP2) que podrían ser de gran utilidad en la prevención, el diagnóstico y/o el tratamiento de EHGNA.

BIBLIOGRAFÍA.

1.Martín Angulo y col. (2012). Rol de los microRNA en las enfermedades pulmonares. *Archivos de bronconeumología*, 48, 325-30.

2.T. Zerjal, M.L. et al. (2015). Les microRNA circulants: de nouveaux biomarqueurs pour des caractères économiquement importants chez les poules? *11. Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours, France*, p.1-5.

3.Santomauro M. y col. (2012). Non-alcoholic fatty liver disease and its association with clinical and biochemical variables in obese children and adolescents: effect of a one-year intervention on lifestyle. *Endocrinología y Nutrición: órgano de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición* 59(6), 346-53.

4.Forero-Forero J. y col. (2016) Emergence of micro-RNAs as potential biomarkers in different diseases. *Iatreia Medellín* 29(3), 323-33.

5. Michelotti y col. (2013). NAFLD, NASH and liver cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 10, 656–665.

6.Haider BA et al. (2014). A critical evaluation of microRNA biomarkers in non-neoplastic disease. *PLoS One*, 9(2), e89565.

7.Xin Wei Wang y col. (2012). MicroRNAs in Liver Disease. *Gastroenterology*, 142(7),1431–1443.

8.C. M. Canivet et al. (2017). Génétique et épigénétique dans la non-alcoholic fatty liver disease. *Hepato-gastro et oncologie digestive*, 24(7),719.

9.Llorenç Caballería Rovira et al. (2017). Esteatosis hepática: diagnóstico y seguimiento. *FMC: Formación médica continuada en atención primaria*, 24(7),378-89.

10. M.C. Luna Aguirre. (2013). Determinación de genes regulados por microRNAs, involucrados en la leucemia linfocítica aguda tipo b (LLA-b). *Colección digital UANL*. Tesis doctoral 1080240813.

11. Yuping Wang et al. (2015). Molecular regulation of miRNAs and potential biomarkers in the progression of hepatic steatosis to NASH. *Biomarkers in medicine*, 9(11).

12. Robert Vincent y col. (2014). Recent Advances in Understanding of NASH: MicroRNAs as Both Biochemical Markers and Players. *Curr Pathobiology Reports*, 2(3),109–115.

13. Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB et al. (2009). Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene*, 28, 3526–3536.
14. Hisamitsu Miyaaki, Tatsuki Ichikawa et al. (2014). Significance of serum and hepatic microRNA-122 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International*, 34(7), e302-7.
15. Ming-xia Liu, Man Gao et al. (2017) Dicer1/miR-29/HMGCR axis contributes to hepatic free cholesterol accumulation in mouse non-alcoholic steatohepatitis. *Acta Pharmacologica Sinica* 38(5), 660-671.
16. F. Caballero, A. Fernández, A.M. De Lacy, J.C. Fernández-Checa, J. Caballería y C. García-Ruiz. (2009). Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *Journal of Hepatology*, 50(4), 789-796.
17. Joel Vega-Badilloa. (2017). Dysregulation in hepatic cholesterol homeostasis and its implications in nonalcoholic steatohepatitis. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(1), 50-65.
18. Carlos J. Pirola y col. (2013). Circulating MicroRNA-122 signature in nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease: A new endocrine system in metabolic syndrome. *Hepatology*, 57(6), 2545–2547.
19. Yang Z. y col. (2015). Emerging role of microRNAs in lipid metabolism. *Acta Pharmacologica Sinica* 5(2),145-50.
20. Sanshiro Tateya et al. (2013). VASP Increases Hepatic Fatty Acid Oxidation by Activating AMPK in Mice. *Diabetes*, 62(6), 1913–1922.
21. Allen, R. M. et al. (2012). miR-33 controls the expression of biliary transporters, and mediates statin- and diet-induced hepatotoxicity. *EMBO Molecular Medicine*, 4(9), 882–895.
22. Joel Vega-Badillo et al.. (2016). Hepatic miR-33a/miR-144 and their target gene ABCA1 are associated with steatohepatitis in morbidly obese subjects. *Liver International*, 36(9),1383-91.

23. Dávalos, A. et al. (2011). miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(22), 9232–9237.
24. Elvira López-Oliva Muñoz y Emilia Muñoz Martínez. (2014). SREBP-1c, ChREBP y LXR: Su influencia en el desarrollo del hígado graso no alcohólico. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 80(1), 14-48.
25. Donnelly, K.L. y col. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation* 115, 1343-1351.
26. Stienstra, R. y col. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against obesity-induced hepatic inflammation. *Endocrinology* 148, 2753-2763.
27. Gatfield, D. et al. (2009). Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes & Development*, 23(11), 1313–1326.
28. Yan Liu et al. (2015). Association of serum retinoic acid with hepatic steatosis and liver injury in nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 102(1), 130-137.
29. Yuki Oda et al. (2014). Retinoid X receptor α in human liver is regulated by miR-34a. *Biochemical Pharmacology*, 90(2), 179-187.
30. Julia Winter et al. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*, 11(3), 228-234.
31. O. Cheung, P. Puri et al. (2008). Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatol. Baltim. Md.*, 48 (6) , 1810-1820.
32. Bruno Sangro. (2011). MicroRNAs: posibles implicaciones terapéuticas en las enfermedades hepáticas. *Gastroenterología Hepatología Continuada*, 10(4).
33. Hiroya Yamada et al. (2015). Longitudinal study of circulating miR-122 in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease. *Clinica Chimica Acta* (446), 267–271.

34. Hu, Jun y Xu et al. (2012). *MiR-122 in hepatic function and liver diseases. Protein and cell.* 3. 364-71.

35. Alejandro Belmonte Fernández. Las HDAC en la regulación de la expresión génica y el cáncer. *Universidad Pablo de Olavide. Sevilla.*