

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Implicación de las proteínas morfogenéticas óseas en la fisiopatología hepática

Implication of bone morphogenteic proteins in the liver pathophysiology

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Patricia Marañón Barnusell

DIRIGIDA POR

Águeda González Rodríguez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

Implicación de las proteínas morfogenéticas óseas en la fisiopatología hepática

Implication of bone morphogenetic proteins in the liver pathophysiology

El presente trabajo ha sido realizado en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Santa Cristina del Instituto de Investigación Sanitaria de la Princesa, bajo la dirección de la **Dra. Águeda González Rodríguez.**

OPTA AL GRADO DE DOCTORA

Patricia Marañón Barnusell

Madrid, 2023

A mi madre



AGRADECIMIENTOS

Disponible solo en el formato impreso.

Agradecimientos

ÍNDICE

RESUMEN	27
ABSTRACT	33
ABREVIATURAS	37
INTRODUCCIÓN	41
1. PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS	43
1.1. Definición y clasificación.....	43
1.2. Señalización de las proteínas BMP	44
1.2.1. Síntesis de proteínas BMP	44
1.2.2. Receptores de la ruta de señalización BMP	44
1.2.3. Transducción de la señal: proteínas Smad	45
1.2.4. Rutas de señalización BMP	46
1.2.5. Afinidad del ligando por el receptor	47
1.2.6. Correceptores y antagonistas.....	47
2. PROTEÍNAS BMP EN LA FISIOPATOLOGÍA HEPÁTICA	48
2.1. Anatomía y funciones del hígado.....	48
2.2. Fallo hepático agudo	49
2.2.1. Etiología del fallo hepático agudo.....	49
2.2.2. Fallo hepático agudo inducido por paracetamol	50
2.2.2.1. Descubrimiento y mecanismo de acción del paracetamol.....	50
2.2.2.2. Metabolismo de APAP en el hígado.....	51
2.2.2.3. Hepatotoxicidad por APAP	52
2.2.3. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento del fallo hepático agudo.....	54
2.2.4. Proteínas BMP en el fallo hepático agudo	57
2.3. Enfermedad hepática crónica.....	58
2.3.1. Fibrosis hepática	58
2.3.2. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad hepática crónica	60
2.3.3. Enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD)	61
2.3.3.1. Historia natural y progresión de la NAFLD.....	62
2.3.3.2. Patogénesis de la NAFLD	64
2.3.3.3. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la NAFLD	64
2.3.4. Proteínas BMP en la enfermedad hepática crónica.....	66
2.4. Proteínas BMP como biomarcadores	68
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
MATERIALES Y MÉTODOS	75

1. ESTUDIO CLÍNICO	77
1.1. Colección de muestras de pacientes con NAFLD	77
1.2. Colección de muestras de pacientes con sobredosis de APAP	78
2. MODELOS ANIMALES	78
2.1. Modelo experimental de fallo hepático agudo inducido por paracetamol	79
2.1.1. Administración del compuesto DMH2 en ratones sometidos a un modelo experimental de ALF inducido por APAP	80
2.2. Modelo experimental de fibrosis hepática	80
2.2.1. Modelo experimental de fibrosis hepática por toxicidad con CCl ₄	80
2.2.2. Modelo experimental de fibrosis hepática derivada de enfermedad colestásica	81
2.3. Modelo experimental de NAFLD	81
3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL TEJIDO HEPÁTICO	81
3.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E)	82
3.2. Tinción con Rojo Sirio	82
3.3. Ensayo de apoptosis TUNEL	83
3.4. Evaluación histológica de las muestras hepáticas	83
4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS TRANSAMINASAS GPT Y GOT	84
5. CULTIVOS CELULARES	84
5.1. Mantenimiento de las líneas celulares	84
5.2. Procedimientos experimentales con las líneas celulares	85
5.2.1. Silenciamiento génico de ALK2 y ALK3 en la línea celular Huh7 mediante infección lentiviral	85
5.2.2. Sobreexpresión de ALK2 en la línea celular Huh7 mediante infección lentiviral	86
5.2.3. Silenciamiento transitorio de BMP6 en la línea celular Huh7	86
5.2.4. Protocolo de muerte celular con APAP	87
5.2.5. Tratamiento con inhibidores farmacológicos de los receptores de BMP tipo I ..	87
5.2.6. Activación de macrófagos y tratamiento con la proteína recombinante BMP6 ..	87
5.2.7. Activación de células estrelladas hepáticas y tratamiento de células Huh7 con TGFβ	88
5.2.8. Protocolo esteatogénico con ácidos grasos	88
5.3. Análisis de hepatotoxicidad	88
5.3.1. Tinción con DAPI	88
5.3.2. Medida de la viabilidad celular por cristal violeta	89
5.3.3. Ensayo de citotoxicidad por liberación de LDH	89

5.4. Cuantificación de estrés oxidativo mediante fluorescencia en placa	90
5.5. Detección del contenido lipídico intracelular mediante tinción con Oil Red O (ORO)	90
6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	90
6.1. Análisis de la expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica.....	90
6.2. Inmunodetección de proteínas mediante ELISA	91
6.3. Inmunodetección de proteínas mediante Western-Blot.....	91
6.3.1. Obtención de extractos de proteínas de sobrenadante celular	92
6.3.2. Obtención de extractos de proteínas totales de células	92
6.3.3. Cuantificación de proteínas	92
6.3.4. Electroforesis, transferencia húmeda e inmunodetección de proteínas.....	92
7. ANÁLISIS DE ARN	94
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	97
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
CAPÍTULO I	101
ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES BMP TIPO I ALK2 Y ALK3 EN EL FALLO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO POR PARACETAMOL	101
1. Evaluación de los efectos del silenciamiento génico de los receptores ALK2 y ALK3 frente a la toxicidad inducida por APAP.....	101
1.1. Silenciamiento génico de los receptores BMP tipo I ALK2 y ALK3.....	101
1.2. El silenciamiento del receptor de BMP tipo I ALK3 y no ALK2 protege contra la hepatotoxicidad inducida por APAP	103
2. Evaluación de los efectos de la sobreexpresión del receptor ALK2 frente a la toxicidad inducida por APAP	106
3. Evaluación de los efectos de la inhibición farmacológica de los receptores ALK2 y ALK3 frente al daño por APAP.....	109
3.1. Inhibición farmacológica de ALK2 y ALK3.....	109
3.2. La inhibición de la señalización mediada por ALK3 con el compuesto DMH2 confiere efectos protectores frente al daño inducido por APAP	110
3.3. La inhibición de ambos receptores ALK2 y ALK3 con el compuesto LDN no presenta efectos protectores frente al daño inducido por APAP	113
4. Evaluación de los efectos del inhibidor DMH2 en un modelo experimental de fallo hepático agudo inducido por APAP	114
4.1. El inhibidor DMH2 protege frente a la hepatotoxicidad inducida por APAP <i>in vivo</i>	115
5. CONCLUSIÓN	117
CAPÍTULO II	121

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA 6 (BMP6) EN MODELOS EXPERIMENTALES DE FALLO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO POR PARACETAMOL.	121
1. Evaluación de la expresión de BMP6 en un modelo experimental de ALF inducido por APAP	121
1.1. La expresión hepática de BMP6 se encuentra aumentada en el hígado de ratones sometidos a un modelo experimental de DILI por APAP	123
1.2. La concentración circulante de BMP6 se encuentra aumentada en el suero de ratones sometidos a un modelo de ALF por APAP	125
2. Evaluación de la expresión circulante de BMP6 en una cohorte de pacientes con sobredosis de APAP	126
3. Caracterización de la expresión y liberación de BMP6 en un modelo <i>in vitro</i> de DILI por APAP	127
3.1. Expresión y liberación de BMP6 en hepatocitos murinos en presencia de APAP	127
3.2. Expresión y liberación de BMP6 en células Huh7 en presencia de APAP	129
4. Efecto del silenciamiento transitorio de BMP6 en la línea Huh7 en un modelo <i>in vitro</i> de DILI por APAP	130
4.1. El silenciamiento de BMP6 en células Huh7 no muestra efectos contra el daño inducido por APAP	131
5. Efecto del silenciamiento transitorio de BMP6 en la línea Huh7 sobre la línea THP1	133
5.1. El silenciamiento de BMP6 en Huh7 previene la diferenciación de macrófagos hacia el fenotipo antiinflamatorio (M2)	133
5.2. BMP6 promueve la diferenciación de macrófagos humanos hacia el fenotipo antiinflamatorio (M2)	134
6. CONCLUSIÓN	136
CAPÍTULO III	139
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA 8A (BMP8A) EN MODELOS EXPERIMENTALES DE FIBROSIS HEPÁTICA Y EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON FIBROSIS DERIVADA DE NAFLD.	139
1. Evaluación de la expresión hepática de BMP8A en diferentes modelos murinos de fibrosis hepática avanzada	139
1.1. La expresión hepática de BMP8A se encuentra aumentada en el hígado de ratones sometidos a un modelo experimental fibrosis por enfermedad colestásica	140
1.2. La expresión hepática de BMP8A se encuentra aumentada en el hígado de ratones sometidos a un modelo experimental de fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCl ₄)	142
1.3. La expresión hepática de BMP8A se encuentra aumentada en el hígado de ratones sometidos a un modelo experimental de fibrosis derivada de NAFLD	143
2. Evaluación de la expresión y secreción de BMP8A en un modelo <i>in vitro</i> de fibrosis	145
2.1. Modelo <i>in vitro</i> de fibrosis en la línea celular LX2	145

2.2. Las células Huh7 expresan y secretan BMP8A tras la estimulación con el secretoma de HSC activadas	146
3. Evaluación de la concentración circulante de BMP8A en el modelo de ratones sometidos a BDL	148
4. Cuantificación de la concentración sérica de BMP8A en una cohorte de pacientes con fibrosis hepática.....	149
4.1. Características de la población de estudio	149
4.2. La concentración de BMP8A está elevada en el suero de pacientes con fibrosis hepática avanzada.....	151
5. BMP8A es un predictor independiente de fibrosis avanzada	152
6. CONCLUSIÓN	157
CAPÍTULO IV.....	159
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA 2 (BMP2) EN MODELOS EXPERIMENTALES DE ESTEATOSIS HEPÁTICA Y EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON NAFLD.	159
1. Evaluación de la expresión hepática de BMP2 en un modelo experimental de NAFLD	159
1.1. La expresión hepática de BMP2 se encuentra aumentada en el hígado de ratones sometidos a un modelo experimental de NAFLD.....	161
2. Evaluación de la modulación de la expresión hepática y circulante de BMP2 en una cohorte de pacientes con NAFLD	162
2.1. Características de la población de estudio	162
2.2. La expresión hepática de BMP2 está aumentada en pacientes con NAFLD	164
2.3. Los niveles circulantes de BMP2 están aumentados en pacientes con NAFLD ...	165
3. La concentración circulante de BMP2 es un predictor independiente de NASH y el algoritmo SAN es capaz de discriminar NASH	167
4. Expresión de BMP2 en las células Huh7 sometidas a un modelo esteatogénico	170
5. CONCLUSIÓN	171
CONCLUSIONS.....	175
BIBLIOGRAFÍA	179
ANEXO I	211
ANEXO II	215

Índice de tablas

Tabla 1. Inhibidores farmacológicos de los receptores de BMP tipo I ALK2 y ALK3.	87
Tabla 2. Lista de anticuerpos usados para Western blot.	94
Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos para RT-qPCR.	95
Tabla 4. Características de la población de estudio.	150
Tabla 5. Análisis univariante y multivariante de las variables independientes asociadas a fibrosis avanzada en la población de estudio	153
Tabla 6. Precisión diagnóstica de BFS.	155
Tabla 7. Comparación del rendimiento diagnóstico de BFS y otros algoritmos ampliamente utilizados para detectar alto riesgo de fibrosis avanzada (F3-F4).....	156
Tabla 8. Características de la población de estudio.	163
Tabla 9. Análisis univariante y multivariante de las variables independientes asociadas a NASH en la población de estudio	168
Tabla 10. Precisión diagnóstica de SAN	170

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de clasificación de las proteínas BMP, receptores y proteínas Smad... 45	45
Figura 2. Rutas de señalización de las proteínas BMP..... 46	46
Figura 3. Metabolismo de APAP en el hígado..... 52	52
Figura 4. Hepatotoxicidad por APAP. 54	54
Figura 5. Activación de HSC en respuesta a un daño hepático crónico..... 60	60
Figura 6. Progresión de la enfermedad de hígado graso no alcohólico 63	63
Figura 7. Silenciamiento génico de los receptores BMP tipo I ALK2 y ALK3 en células Huh7 102	102
Figura 8. Señalización en las líneas estables silenciadas en ALK2 y ALK3 102	102
Figura 9. Modulación de la expresión de genes diana de la señalización mediada por ALK2 y ALK3 103	103
Figura 10. El silenciamiento génico de ALK3 aumenta la supervivencia celular frente al APAP. 104	104
Figura 11. El silenciamiento génico de ALK3 protege frente al daño inducido por APAP .. 105	105
Figura 12. El silenciamiento génico de ALK3 protege frente al estrés oxidativo derivado del APAP 106	106
Figura 13. Sobreexpresión del receptor ALK2..... 107	107
Figura 14. Efectos de la sobreexpresión del receptor ALK2 frente a la toxicidad inducida por APAP 108	108
Figura 15. Tratamiento de las células Huh7 con inhibidores farmacológicos de los receptores de BMP tipo I ALK2 y ALK3..... 109	109
Figura 16. Señalización en las células tratadas con inhibidores farmacológicos de ALK2 y ALK3..... 110	110
Figura 17. Efecto de los inhibidores farmacológicos de ALK2 y ALK3 sobre la viabilidad celular en presencia de APAP 111	111
Figura 18. La inhibición de ALK3 con DMH2 protege frente a la toxicidad inducida por APAP. 111	111
Figura 19. La inhibición de ALK3 con DMH2 protege frente al estrés oxidativo derivado del APAP 112	112
Figura 20. Efectos de la inhibición de ALK2 y ALK3 con LDN frente al daño inducido por APAP 114	114
Figura 21. El post tratamiento con DMH2 aumenta la viabilidad celular en presencia de APAP..... 114	114
Figura 22. Tratamiento con DMH2 en un modelo experimental de ALF inducido por APAP. 115	115
Figura 23. El inhibidor DMH2 protege frente a la hepatotoxicidad inducida por APAP <i>in vivo</i> 116	116

Figura 24. El inhibidor DMH2 protege frente al estrés oxidativo inducido por APAP <i>in vivo</i> ..	117
Figura 25. La inhibición de la ruta de señalización mediada por ALK3 protege frente al daño hepático inducido por APAP.	119
Figura 26. Modelo experimental de ALF inducido por APAP.	122
Figura 27. La expresión hepática de BMP6 esta aumentada en un modelo experimental de ALF inducido por APAP	124
Figura 28. Niveles circulantes de BMP6 en el modelo experimental de ALF inducido por APAP.	126
Figura 29. Cuantificación de BMP6 circulante en una cohorte de pacientes con sobredosis de APAP.	127
Figura 30. Modelo <i>in vitro</i> de muerte celular por APAP en la línea de hepatocitos murinos WTiib.	128
Figura 31. Los hepatocitos murinos expresan y secretan BMP6 en presencia de APAP...	129
Figura 32. Modelo <i>in vitro</i> de muerte celular por APAP en las células Huh7..	129
Figura 33. Las células Huh7 expresan y secretan BMP6 en presencia de APAP	130
Figura 34. Silenciamiento transitorio de BMP6 en las células Huh7.	131
Figura 35. El silenciamiento de BMP6 en Huh7 no protege de la toxicidad por APAP.	132
Figura 36. Efecto en células Huh7 del BMP6 secretado por Huh7 en presencia de APAP	132
Figura 37. Efecto en macrófagos del BMP6 secretado por células Huh7 en presencia de APAP.	134
Figura 38. BMP6 promueve la diferenciación de macrófagos humanos hacia el fenotipo antiinflamatorio (M2)	135
Figura 39. El aumento de expresión hepática de BMP6 inducida por APAP favorece la diferenciación de macrófagos hacia el fenotipo M2.	136
Figura 40. Modelo experimental de fibrosis hepática derivada de enfermedad colestásica.	141
Figura 41. La expresión hepática de BMP8A esta aumentada en un modelo experimental de fibrosis mediante BDL	141
Figura 42. La expresión hepática de BMP8A esta aumentada en un modelo experimental de fibrosis inducida por CCl ₄ .	142
Figura 43. Modelo experimental de fibrosis hepática derivada de NAFLD.	144
Figura 44. La expresión hepática de BMP8A esta aumentada en un modelo experimental de fibrosis inducida por dieta.	144
Figura 45. Modelo de fibrosis <i>in vitro</i> en las células LX2.	146
Figura 46. El medio condicionado de células LX2 activadas induce la expresión y liberación de BMP8A en las células Huh7..	147
Figura 47. La estimulación con TGF β induce la expresión de BMP8A en Huh7.	148
Figura 48. Niveles circulantes de BMP8A en el modelo experimental de fibrosis hepática mediante BDL.	149

Figura 49. Los niveles circulantes de BMP8A se encuentran aumentados en una cohorte de pacientes con fibrosis hepática.....	151
Figura 50. BMP8A es un predictor independiente de fibrosis avanzada.	152
Figura 51. Precisión diagnóstica del algoritmo BMP8A fibrosis score (BFS)	154
Figura 52. La concentración hepática y circulante de BMP8A se encuentra aumentada en modelos de fibrosis hepática.	157
Figura 53. Caracterización del modelo animal de NAFLD	160
Figura 54. La expresión hepática de BMP2 se encuentra aumentada en el hígado de ratones sometidos a un modelo experimental de NAFLD.....	161
Figura 55. La expresión hepática de BMP2 está incrementada en pacientes con NAFLD.	164
Figura 56. Los niveles circulantes de BMP2 se encuentran aumentados en pacientes con NAFLD	166
Figura 57. Los niveles séricos de BMP2 no están influenciados por otras variables clínicas.	167
Figura 58. Precisión diagnóstica del algoritmo <i>Screening Algorithm for NASH (SAN)</i>	169
Figura 59. Expresión de BMP2 en células Huh7 tratadas con ácido palmítico.	171
Figura 60. La expresión hepática y los niveles circulantes de BMP2 están aumentados en NAFLD en paralelo a la progresión de la enfermedad.....	172

RESUMEN

Las proteínas morfogenéticas óseas (en inglés *bone morphogenetic proteins*, BMP) son factores de crecimiento pertenecientes a la familia del factor de crecimiento transformante β (en inglés *transforming growth factor beta*, TGF β), que han demostrado su implicación en la regulación de diferentes procesos celulares y su papel en la homeostasis de diferentes órganos y sistemas. En cuanto a la relación de estas proteínas con la fisiología hepática, se sabe que juegan un papel crucial en diferentes estadios del desarrollo embrionario hepático y que están asimismo implicadas en la homeostasis del hígado en la etapa adulta. Aunque cada vez son más los estudios centrados en este campo, todavía no se ha descrito el papel que estas proteínas juegan en diferentes enfermedades hepáticas. Por ello, en este trabajo se han estudiado diferentes modelos experimentales de daño hepático y cohortes de pacientes con enfermedad hepática, con el fin de dilucidar la implicación de las proteínas BMP en la fisiopatología hepática.

Actualmente, la toxicidad por paracetamol (en inglés *acetaminophen*, APAP) es una de las principales causas de fallo hepático agudo (en inglés *acute liver failure*, ALF), especialmente en países occidentales. Este daño se caracteriza por presentar una progresión fulminante, por lo que un diagnóstico precoz, así como un pronóstico acertado son de gran importancia a la hora de establecer el mejor enfoque terapéutico. En este sentido, se han realizado un gran número de estudios con el fin de encontrar biomarcadores efectivos para el pronóstico de dicha patología, así como nuevas dianas farmacológicas en un intento de desarrollar nuevas terapias. Por ello, se quiso evaluar el papel de la señalización de las proteínas BMP mediante el estudio de los receptores BMP tipo I: ALK2 y ALK3 en modelos de hepatotoxicidad inducida por APAP. Se observó que la modulación de la expresión de estos receptores influye en la respuesta de las células derivadas de hepatoma Huh7 frente a los efectos del APAP. La inhibición de ALK3, tanto mediante silenciamiento génico, como mediante el uso del inhibidor farmacológico DMH2, presentó efectos protectores frente al daño inducido por APAP; lo cual se reflejó en una menor muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis, así como una reducción del estrés oxidativo. Estos resultados fueron reproducibles *in vivo*, donde se observó que el post tratamiento con DMH2 en ratones sometidos a una sobredosis de APAP previene del daño hepático producido por este fármaco y del estrés oxidativo derivado del mismo. Por otro lado, en el modelo experimental de ALF inducido por APAP, se observó un aumento de expresión hepática de BMP6 que se vio reflejada en una mayor concentración en suero de esta proteína. De hecho, el contenido circulante de BMP6 en pacientes con sobredosis de APAP mostró una correlación positiva y significativa con los niveles en suero de la transaminasa GPT. Estos resultados se observaron también en los modelos celulares de toxicidad por APAP, donde las células Huh7 y los hepatocitos murinos (WTiib) expresaron y secretaron BMP6 en presencia de APAP. Asimismo, se observó que BMP6 juega un papel

Resumen

clave en la comunicación entre hepatocitos y macrófagos, promoviendo la expresión de marcadores M2 en estos últimos, en un intento de contrarrestar la respuesta inflamatoria.

Las enfermedades hepáticas crónicas (en inglés *chronic liver disease*, CLD) se caracterizan por presentar fibrosis hepática, la cual se desencadena como respuesta a un daño hepático crónico, y se considera el principal factor de riesgo para establecer el pronóstico de estas patologías. La enfermedad del hígado graso no alcohólico (en inglés *nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD) es la principal causa de CLD a nivel global, siendo la esteatohepatitis (en inglés *nonalcoholic steatohepatitis*, NASH) el estadio clínico más relevante dado su carácter progresivo. Actualmente, la biopsia hepática es la única herramienta diagnóstica validada para diferenciar los diferentes estadios de la NAFLD. Sin embargo, se trata de una técnica invasiva que presenta riesgos y complicaciones, por lo que no está recomendada para uso rutinario en la práctica clínica. Por ello, la búsqueda de nuevos biomarcadores para el diagnóstico/pronóstico de las CLD está ganando relevancia en los últimos años. Puesto que las proteínas BMP ya han sido propuestas como biomarcadores asociados a diferentes patologías, se planteó estudiar su posible papel en la progresión de las CLD. Para ello, se establecieron diferentes modelos experimentales de fibrosis hepática en los que se observó un aumento en la expresión hepática de BMP8A paralelo al grado de fibrosis. Del mismo modo, en una cohorte de pacientes con NASH, se observó un aumento de BMP8A circulante en aquellos pacientes con NASH que presentaron fibrosis avanzada (F3-F4). De hecho, se ha desarrollado un algoritmo basado en los niveles de BMP8A en suero, denominado BFS (del inglés *BMP8A fibrosis score*), que permite predecir de manera eficiente la fibrosis avanzada en pacientes con NASH. Por último, se observó que la exposición al medio condicionado de células estrelladas hepáticas activadas, incrementó la expresión y secreción de BMP8A en células Huh7.

Por otro lado, en un modelo experimental de NAFLD, se observó en los ratones sometidos a dieta alta en grasa un incremento de la expresión hepática de BMP2. Del mismo modo, en una cohorte de pacientes con diagnóstico de NAFLD se observó un incremento en la expresión hepática y circulante de BMP2 en comparación con individuos con hígado normal. Combinando la concentración de BMP2 circulante con variables clínicamente relevantes en NAFLD, se desarrolló el algoritmo denominado SAN (del inglés *Screening Algorithm for NASH*) con una alta eficacia para discriminar NASH. Asimismo, se observó que la estimulación con ácido palmítico incrementa la expresión y secreción de BMP2 en las células Huh7.

En conclusión, estos resultados muestran, por un lado, la implicación de la señalización de las proteínas BMP en el daño hepático inducido por APAP, sugiriendo que la modulación de esta vía de señalización podría ser un nuevo enfoque terapéutico en esta patología. Por otro

lado, se muestra el potencial papel de las proteínas BMP como biomarcadores para el diagnóstico y/o pronóstico de diferentes patologías hepáticas tanto agudas como crónicas, y su aportación al desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico no invasivo.

ABSTRACT

Bone morphogenetic proteins (BMP) are growth factors belonging to the transforming growth factor β (TGF β) family, that have shown their implication in the regulation of different cellular processes and their role in the homeostasis of different organs and systems. Regarding their involvement in hepatic physiology, it is known that these proteins play a key role in different stages of the hepatic development and they are also implicated in the liver homeostasis in adults. Even though, the number of studies focused on this topic is increasing, it has not yet been established the role that these proteins might play in different liver diseases. Thus, different experimental models of liver damage and cohorts of patients with liver disease have been studied in order to dilucidate the implication of BMP proteins in the liver pathophysiology.

Currently, acetaminophen (APAP)-induced toxicity is one of the major causes of acute liver failure (ALF), especially in western countries. This injury is characterised by a fulminant progression; hence an early diagnosis and accurate prognosis is of utmost importance in order to stablish the best therapeutic approach. In this regard, great efforts have been made in order to find new biomarkers for the prognosis of this disease, as well as new pharmacological targets to develop new therapies. Taking this into account, the role of BMP signalling, more specifically, that mediated by the type I BMP receptors: ALK2 and ALK3, was studied in animal models of APAP induced hepatotoxicity. The modulated expression of these receptors in the hepatoma derived cells Huh7 influenced in the response towards the APAP-induced effects. ALK3 inhibition, either by gene silencing or by the pharmacological inhibitor DHM2, showed protective effects against APAP-induced damage: decreased cell death both by necrosis and apoptosis and reduced oxidative stress. These findings were replicated *in vivo*, where DMH2 post-treatment in mice submitted to APAP overdose prevented the hepatic damage induced by this drug. In addition, in the APAP-induced ALF animal model, an increased hepatic expression of BMP6 was observed in parallel to a higher circulating concentration of this protein. Indeed, circulating BMP6 levels showed a significant positive correlation with the transaminase ALT in patients with an overdose of APAP. These results were also observed in cellular models of APAP-induced toxicity, where murine hepatocytes (WTiib) and Huh7 cells expressed and released BMP6 in the presence of APAP. Moreover, BMP6 showed to play a key role in the communication between hepatocytes and macrophages, promoting the expression of M2 markers in the latter, in an attempt to counteract the inflammatory response.

The main feature in chronic liver diseases (CLD) is the hepatic fibrosis, which is triggered as a response against a chronic damage in the liver. The stage of hepatic fibrosis is the main risk factor to stablish the prognosis of the disease. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the main cause of CLD worldwide, being nonalcoholic steatohepatitis (NASH), the most clinically relevant stage of the disease given its progressive profile. Currently, liver biopsy is still the gold standard to differentiate NASH and to accurately stablish the fibrosis stage. However, it is

Abstract

considered an invasive method given its associated risks and complications. Thus, the search of new biomarkers for the diagnosis/prognosis of CLD is becoming more relevant in the latest years. Given that BMP proteins have already been proposed as biomarkers associated to different pathologies, this study aimed to establish their possible role in the progression of CLD. For this purpose, different experimental models of fibrosis were established, and an increased hepatic expression of BMP8A was observed parallel to the fibrosis stage. Similarly, in a cohort of biopsy-proven NASH patients, an increased concentration of BMP8A in serum was observed in those NASH patients who presented advanced fibrosis (F3-F4). In fact, an algorithm based on BMP8A serum levels, named *BMP8A fibrosis score* (BFS), was developed. BFS allowed to predict efficiently advanced fibrosis in patients with NASH. Lastly, exposure to the culture media of activated hepatic stellate cells increased expression and secretion of BMP8A in Huh7 cells.

On the other hand, an experimental model of NAFLD, showed an increased hepatic expression of BMP2 in mice fed with high fat diet. Similarly, in a cohort of biopsy-proven NAFLD patients, an increased hepatic expression and serum concentration of BMP2 was observed when comparing to individuals with normal liver. Combining BMP2 circulating concentration with variables clinically relevant for NAFLD, an algorithm named *Screening Algorithm for NASH* (SAN) was developed, which showed high efficacy to discriminate NASH. Moreover, stimulation with palmitic acid increased expression and secretion of BMP2 in Huh7 cells.

In conclusion, these results indicate on one hand the implication of BMP signalling in APAP-induced liver injury, positioning the modulation of this signalling pathway as a new pharmacological target for ALF. On the other hand, these findings demonstrate the potential role of BMP proteins as biomarkers for the diagnosis and/or prognosis of different acute and chronic liver diseases, and their contribution to the development of new noninvasive diagnostic tools.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico	E	Especificidad
ADNc	ADN complementario	ECM	<i>Extracellular matrix</i> , matriz extracelular
ALF	<i>Acute liver failure</i> , fallo hepático agudo	ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> , ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
APAP	<i>Acetaminophen</i> , paracetamol	ET	Elastografía transitoria
APRI	<i>Aminotransferase to platelet ratio index</i>	FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , suero fetal bovino
ARN	Ácido ribonucleico	FFA	<i>Free fatty acids</i> , ácidos grasos libres
ARNm	ARN mensajero	FIB4	<i>Fibrosis 4 score</i>
AUROC	<i>Area under ROC curve</i> , área bajo la curva ROC	GDF	<i>Growth differentiation factor</i> , factor de diferenciación de crecimiento
BDL	<i>Bile duct ligation</i> , ligación del ducto biliar	GGT	Gamma-glutamil transferasa
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> , proteína morfogenética ósea	GLDH	Glutamato deshidrogenasa
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina de suero bovino	GOT	Glutámico oxalacético transaminasa
CAP	<i>Controlled attenuation parameter</i> , parámetro de atenuación controlada	GPT	Glutámico pirúvico-transaminasa
CCl₄	Tetracloruro de carbono	GSH	Glutation
CHD	<i>Standard chow diet</i> , dieta estándar	HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i> , carcinoma hepatocelular
CLD	<i>Chronic liver disease</i> , enfermedad hepática crónica	HFD	<i>High fat diet</i> , dieta alta en grasa
COL1A1	<i>Collagen type 1</i> , colágeno tipo 1	HJV	Hemojuvelina
COX	Ciclooxigenasa	HSC	<i>Hepatic stellate cell</i> , célula estrellada hepática
Co-Smad	<i>Common mediator Smad</i> , Smad mediadora común	HOMA	<i>Homeostatic model assessment for insulin resistance</i> , modelo de evaluación de la homeostasis
CYP2E1	Citocromo P450 2E1	HOMA-IR	Índice de resistencia a la insulina HOMA
DAMP	<i>Damage-associated molecular patterns</i> , patrones moleculares asociados al daño	HO1	Hemoxigenasa 1
DILI	<i>Drug induced liver injury</i> , daño hepático inducido por fármacos	H&E	Hematoxilina y Eosina
DMSO	Dimetilsulfóxido	IC	Intervalo de confianza

Abreviaturas

IHQ	Inmunohistoquímica	PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i> , fosfatidilinositol 3 quinasa
IL	Interleuquina	RV	Razón de verosimilitud
IMC	Índice de masa corporal	RGM	<i>Repulsive guidance molecule</i>
INR	<i>International normalised ratio</i> , índice internacional normalizado	ROC	<i>Receiver operating characteristics</i>
i.p.	Intraperitoneal	ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , especies reactivas de oxígeno
JNK	Proteína quinasa c-Jun N- terminal	RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
LPS	Lipopolisacárido bacteriano	R-Smad	<i>Receptor regulated Smad</i> , Smad reguladas por el receptor
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos	S	Sensibilidad
MELD	<i>Model for end-stage liver disease</i>	SD	<i>Standard deviation</i> , desviación estándar
MPT	Transición de la permeabilidad mitocondrial	SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , dodecil sulfato sódico
NAC	N-acetilcisteína	SDS-PAGE	<i>SDS - polyacrylamide gel electrophoresis</i> , electrophoresis en gel de poliacrilamida con SDS
NAFL	<i>Nonalcoholic fatty liver</i> , esteatosis no alcohólica	SEM	<i>Standard error of the mean</i> , error estándar de la media
NAFLD	<i>Nonalcoholic fatty liver disease</i> , enfermedad de hígado graso no alcohólico	Smad	<i>Suppresson of mothers against decapentaplegic</i>
NAPQI	N-acetil p-benzoquinona imina	TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i> , factor de crecimiento transformante β
NAS	<i>NAFLD activity score</i>	TLR	<i>Toll like receptor</i> , receptor tipo Toll
NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i> , esteatohepatitis no alcohólica	TUNEL	Marcador de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa
OP	<i>Osteogenic protein</i> , proteína osteogénica	VPN	Valor predictivo negativo
OR	<i>Odds ratio</i> , relación de probabilidades	VPP	Valor predictivo positivo
PAI1	<i>Plaminogen activator inhibitor type 1</i> , inhibidor del activador del plasminógeno 1	αSMA	<i>α smooth muscle actin</i> , actina del músculo liso α
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa		
PFA	Paraformaldehído		

INTRODUCCIÓN

1. PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS

1.1. Definición y clasificación

Las proteínas morfogenéticas óseas (en inglés *bone morphogenetic proteins*, BMP) son factores de crecimiento pertenecientes a la familia del factor de crecimiento transformante β (en inglés *transforming growth factor beta*, TGF β). Fueron descritas en 1965 por el Dr. Marshall Urist como inductores de osteogénesis (Urist, 1965), y posteriores estudios remarcaron su posible función como reguladores de la formación de la estructura ósea durante la embriogénesis, así como de la reparación de fracturas en la edad adulta (Wozney, 1998). A pesar de recibir su nombre de su capacidad para inducir la formación y remodelación ósea, actualmente se conoce su implicación en el desarrollo y funcionamiento de diferentes órganos y sistemas, favoreciendo la proliferación y diferenciación celular. Asimismo, están implicadas en procesos de organogénesis y embriogénesis, apoptosis, quimiotaxis y reparación de una gran variedad de tejidos, así como en la homeostasis de la glucosa y el hierro (Carreira et al., 2014; Ducky & Karsenty, 2000; Xiao et al., 2007).

En la actualidad, hay descritas 20 proteínas BMP con una secuencia de alrededor de 120 aminoácidos. A excepción de BMP1, las proteínas BMP presentan homología entre ellas y con otros miembros de la familia del TGF β en la secuencia aminoacídica, incluyendo la presencia de siete residuos de cisteína involucrados en la formación de puentes disulfuro intramoleculares (Rengachary, 2002; Wozney, 1998). Estas proteínas se clasifican en subfamilias basándose en su estructura y función: 1) BMP2 y BMP4; 2) el grupo de BMP7 o de la proteína osteogénica (en inglés *osteogenic protein*) 1 (OP1) que engloba las proteínas BMP5, BMP6, BMP7 (OP1), BMP8A (OP2) y BMP8B (OP3); 3) BMP9, también denominado factor de diferenciación de crecimiento (en inglés *growth differentiation factor*) 2 (GDF2) y BMP10; 4) BMP12 (GDF7), BMP13 (GDF6), BMP14 (GDF5), BMP15 (GDF9) y BMP16; 5) BMP3 y BMP3B (GDF10) (Figura 1) (Wozney, 1998). Por su parte, BMP1 fue caracterizada de manera errónea, ya que no pertenece a la familia de las proteínas BMP, sino que se trata de una proteinasa del procolágeno C involucrada en el plegamiento de las fibras de colágeno en la matriz extracelular (Carreira et al., 2014; Miyazono et al., 2010; Nakashima & Reddi, 2003).

1.2. Señalización de las proteínas BMP

1.2.1. Síntesis de proteínas BMP

Las proteínas BMP se sintetizan como grandes pro-precursores inactivos de la proteína, que contienen un péptido señal en el extremo N-terminal, cuya función es dirigir la proteína hacia la vía de secreción; un pro-dominio, que media el correcto plegamiento de la proteína y un péptido maduro en el extremo C-terminal (Carreira et al., 2014). Tras la escisión del péptido señal, la proteína precursora se glicosila y se dimeriza en el citoplasma. En el proceso de dimerización interviene el séptimo residuo de cisteína altamente conservado en estas proteínas. Estos dímeros pueden ser homo o hetero-dímeros y, de hecho, se ha observado que algunos heterodímeros muestran mayor actividad, como es el caso de BMP2/5, BMP2/6, BMP2/7 y BMP4/7 (Bragdon et al., 2011; Katagiri & Watabe, 2016). Finalmente se produce la pérdida del pro-dominio mediante la acción de proteasas como la furina en el caso de BMP4, para generar el ligando BMP maduro que se secreta al espacio extracelular (Bragdon et al., 2011; Gomez-Puerto et al., 2019; Xiao et al., 2007).

1.2.2. Receptores de la ruta de señalización BMP

Una vez secretado, el ligando BMP dimerizado se une al receptor para iniciar la cascada de señalización. Los receptores de esta ruta se componen de tres partes: un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad serin-treonin quinasa (Rahman et al., 2015). Existen dos tipos de receptores, los receptores tipo I: receptores BMP tipo I (BMPRIA/ALK3 y BMPRIB/ALK6), receptor de activina tipo I (ACTRIA/ALK2) y ALK1 (Xiao et al., 2007); y los receptores tipo II entre los que se encuentran: receptor BMP tipo II (BMPRII) que es específico de BMP y los receptores de activina tipo II (ACTRIIA y ACTRIIB) que comparten afinidad con ligandos BMP, activinas y miostatina (Figura 1). Estos últimos se encuentran activos de manera constitutiva y son capaces de reclutar y fosforilar a los receptores tipo I tras la unión del ligando (Katagiri & Watabe, 2016). A diferencia de TGF β y las activinas, los ligandos BMP se pueden unir directamente al receptor tipo I o tipo II sin que estos estén unidos (Gomez-Puerto et al., 2019); sin embargo, para la transducción de la señal, estos receptores deben formar heterotetrámeros constituidos por dos subunidades de receptores tipo I y dos subunidades de receptores tipo II.

1.2.3. Transducción de la señal: proteínas Smad

Tras la unión del ligando al complejo de receptores, la señal inducida por el ligando BMP llega al núcleo gracias a la acción de las proteínas Smad. Estas proteínas se clasifican en tres grupos: las Smad reguladas por el receptor (en inglés *receptor-regulated Smads*, R-Smad) entre las que se incluyen las Smad 1, 2, 3, 5 y 8 (Smad 8 recientemente renombrada como Smad 9) (Katagiri & Watabe, 2016). Las proteínas Smad 2 y 3 son mediadores específicos de TGFβ y activina mientras que las Smad 1, 5 y 8 son fosforiladas tras la unión de BMP al receptor (Figura 1). La proteína Smad 4 es la Smad mediadora común (en inglés *common mediator smad*, Co-Smad) que forma dímeros con las R-Smad. Por último, Smad 6 y 7 son las Smad inhibitoras (en inglés *inhibitory smad*, I-Smad), encargadas de la regulación de la señalización BMP (Xiao et al., 2007; Zou et al., 2021).

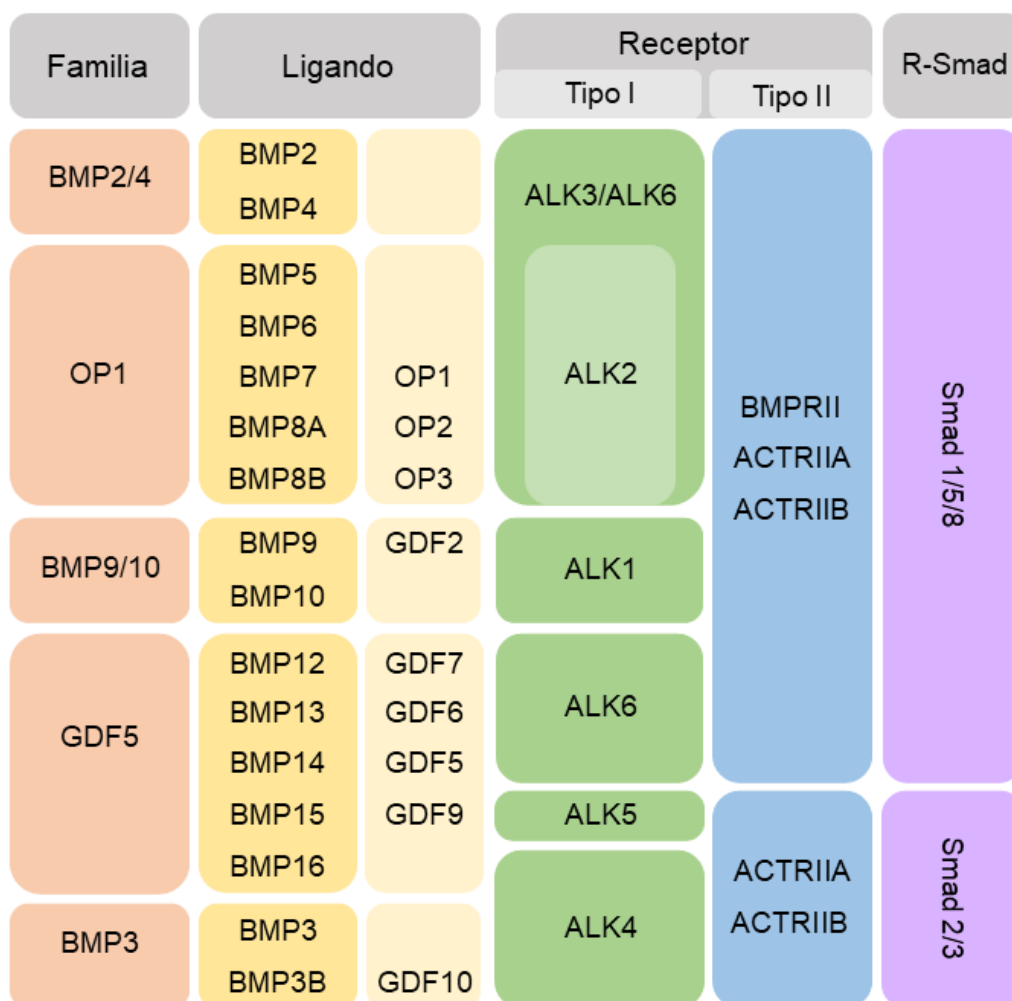


Figura 1. Esquema de clasificación de las proteínas BMP, receptores y proteínas Smad.

1.2.4. Rutas de señalización BMP

Se han descrito dos rutas de señalización para las proteínas BMP. La ruta clásica o canónica, es la mediada por las proteínas Smad. El ligando BMP se une al receptor, esta unión puede ser previa a la formación del complejo de receptores ya que, como se ha descrito anteriormente, el ligando se puede unir al receptor tipo I o tipo II por separado en función de su afinidad. Sin embargo, la unión receptor-ligando alcanza su grado más óptimo cuando ambos receptores están presentes, ya que la unión del ligando a uno solo de los receptores es más débil que la unión al tetrámero formado (Ducy & Karsenty, 2000; Gomez-Puerto et al., 2019). Tras la formación del complejo receptor-ligando, el receptor tipo II que es activo de manera constitutiva fosforila al receptor tipo I en la región GS (dominio rico en glicina y serina) (Gomez-Puerto et al., 2019). Una vez activado, el receptor tipo I es capaz de fosforilar a las proteínas R-Smad, principalmente Smad1/5/8. La proteína Smad fosforilada se libera entonces del receptor, se une a la Co-Smad (Smad4) y este complejo se transloca al núcleo lo cual resulta en la transcripción de diferentes genes diana (Rengachary, 2002; Xiao et al., 2007). Además de la ruta clásica, existen rutas no canónicas que son independientes de las proteínas Smad, como la ruta de las MAP quinasas (en inglés *mitogen activated kinases*, MAPK): c-Jun N-terminal quinasa (JNK), P38 y quinasas reguladas por señales extracelulares (en inglés *extracelular signal regulated kinases*, ERK); la ruta de NFkB, de la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) /AKT (Carreira et al., 2014; Katagiri & Watabe, 2016) y algunas GTPasas (guanósina trifosfatasa) como Rho (Saremba et al., 2008) (Figura 2).

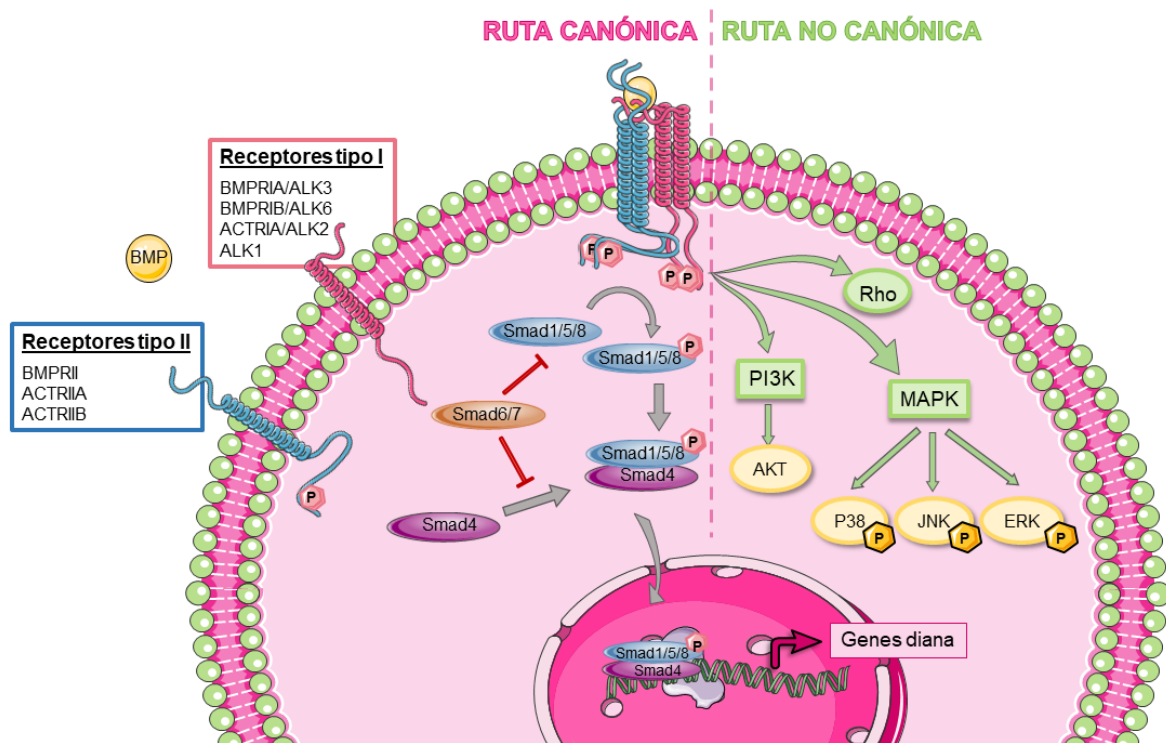


Figura 2. Rutas de señalización de las proteínas BMP.

1.2.5. Afinidad del ligando por el receptor

Dado el gran número de ligandos BMP existentes frente a la poca variabilidad de receptores, se ha observado diferente grado de afinidad de cada ligando por los diferentes tipos de receptor (Mueller & Nickel, 2012). Generalmente esta afinidad es compartida entre los miembros de una misma subfamilia de proteínas BMP, ya que depende de elementos estructurales y residuos expuestos en la zona de unión tanto del receptor como del ligando, en ocasiones esto está modulado por modificaciones postraduccionales (Bragdon et al., 2011; Saremba et al., 2008). Como ya se ha mencionado anteriormente, los ligandos se pueden unir tanto al complejo de receptores ya formado, como a los receptores tipo I o tipo II por separado (Gomez-Puerto et al., 2019). De este modo, BMP2 y BMP4 se unen preferentemente a los receptores tipo I teniendo mayor afinidad por ALK3 y ALK6, y, posteriormente, se produce el reclutamiento del receptor tipo II. Por el contrario, BMP5, BMP6 y BMP7 se unen primeramente al receptor tipo II y a continuación se produce la unión con el receptor tipo I siendo su afinidad mayor por el receptor ALK2 (Rahman et al., 2015), aunque BMP6 también puede señalizar (de forma más débil) vía ALK3 y ALK6. Por su parte, BMP9 y BMP10 muestran afinidad principalmente por el receptor ALK1 (Katagiri & Watabe, 2016; Sanchez-Duffhues et al., 2020) (Figura 1).

1.2.6. Correceptores y antagonistas

Se han identificado correceptores de BMP que son clave en el control de la intensidad, duración y especificidad de la unión receptor ligando (Nickel et al., 2018). La familia de proteínas RGM (en inglés *repulsive guidance molecule*), entre los que se encuentra la hemojuvelina (HJV), actúa facilitando el reclutamiento de receptores tipo II permitiendo la señalización cuando el receptor de preferencia por el ligando no está presente (Corradini et al., 2009). Otro correceptor involucrado en el control de la señalización de BMP es la endoglina, capaz de capturar los ligandos BMP9 y BMP10 y facilitar la unión al receptor ALK1 (Kim et al., 2019).

Por otro lado, la gran disponibilidad de ligandos BMP secretados en su forma madura, se ve restringida por la presencia de un gran número de antagonistas endógenos que presentan alta afinidad por estas proteínas, siendo los más conocidos Gremlina (Ren et al., 2019), Nogina (Bragdon et al., 2011) y BAMBI. Estos antagonistas actúan enmascarando zonas de unión del ligando al receptor (Todd et al., 2020) o compitiendo con el ligando por el sitio de unión (Bragdon et al., 2011).

2. PROTEÍNAS BMP EN LA FISIOPATOLOGÍA HEPÁTICA

Como se ha mencionado previamente, la capacidad osteogénica de las proteínas BMP ha sido siempre su principal característica; sin embargo, en la actualidad es ampliamente conocido que estos factores de crecimiento ejercen efectos pleiotrópicos en distintos tejidos a través de diferentes procesos fisiológicos. Puesto que estas proteínas juegan un papel crítico en el correcto desarrollo y homeostasis de diferentes órganos y sistemas durante la embriogénesis y en estadios posnatales, un gran número de patologías se han asociado con defectos en la ruta de señalización de las BMP. Además de trastornos óseos como la fibrodisplasia osificante progresiva o trastornos articulares (artritis reumatoide y osteoartritis) (Salazar et al., 2016), las proteínas BMP también se han asociado a otras enfermedades no relacionadas con el sistema óseo, como la esclerosis múltiple (Voumvourakis et al., 2011), así como enfermedades respiratorias (Rosendahl et al., 2002) y vasculares (Morrell et al., 2016; Yang et al., 2020). Del mismo modo, algunos componentes de la familia BMP se han relacionado con ciertos tipos de cáncer (Kobayashi et al., 2021; Martínez et al., 2017; Singh & Morris, 2010). Además, el papel de las proteínas BMP en la progresión de la fibrosis renal ha sido ampliamente estudiado (Muñoz-Félix et al., 2015), y recientemente, se ha descrito que algunas BMP están involucradas en el funcionamiento del tejido adiposo mediante la regulación de la adipogénesis y termogénesis (Blázquez-Medela et al., 2019; Modica & Wolfrum, 2013; Whittle et al., 2012). En cuanto a la relación de estas proteínas con la fisiología hepática, se sabe que juegan un papel crucial en diferentes estadios del desarrollo embrionario del hígado y que están asimismo implicadas en la homeostasis de este órgano en la etapa adulta (Herrera et al., 2012).

2.1. Anatomía y funciones del hígado

El hígado se localiza en la parte superior de la cavidad abdominal, protegido por la caja torácica, y es uno de los órganos más grandes del cuerpo (Abdel-Misih & Bloomston, 2010). Este órgano está compuesto por diferentes tipos celulares: hepatocitos, colangiocitos (células del epitelio biliar), células estrelladas o células de Ito (en inglés *hepatic stellate cells*, HSC), células de Kupffer y células del revestimiento sinusoidal (en inglés *liver sinusoidal endothelial cell*, LSEC); las cuales realizan funciones específicas que permiten una correcta función del hígado (Trefts et al., 2017). Los hepatocitos son el tipo celular más representativo del hígado, se encargan de realizar la mayoría de funciones hepáticas. Por su parte, los colangiocitos recubren los conductos biliares y participan en la formación de la bilis, mientras que las células

del revestimiento sinusoidal son células endoteliales especializadas que se encargan de la eliminación de macromoléculas de la sangre (DeLeve & Maretti-Mira, 2017). Por otro lado, las células de Kupffer son macrófagos específicos del hígado mediadores tanto en situaciones de daño como de reparación hepática (Dixon et al., 2013). Por último, las células estrelladas o células de Ito, se localizan en el espacio perisinusoidal de Disse; en estado basal actúan como reservorio de vitamina A y desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la fibrosis (Higashi et al., 2017).

El hígado desempeña un elevado número de funciones que son necesarias para una correcta regulación del metabolismo. Una de las principales funciones de este órgano es el metabolismo de glúcidos y lípidos, así como el almacenamiento de estos nutrientes (Alves-Bezerra & Cohen, 2017; Trefts et al., 2017); esta actividad está además regulada en función de los requerimientos energéticos del organismo (Smith et al., 2018). Además, el hígado, sintetiza el colesterol, así como las lipoproteínas encargadas de su transporte y proteínas que circulan en el plasma sanguíneo como la albúmina. Otra de las funciones clave del hígado es la de eliminación de sustancias de deshecho, como la descomposición de hormonas para su eliminación, la transformación de amoníaco en urea y el metabolismo de alcohol y fármacos para una correcta eliminación de los mismos (Chen et al., 2017).

2.2. Fallo hepático agudo

El fallo hepático agudo (en inglés *acute liver failure*, ALF), previamente conocido como fallo hepático fulminante, se define como el desarrollo de una disfunción hepatocelular en pacientes sin enfermedades hepáticas preexistentes en un periodo de entre 7 días y 26 semanas (Whitehouse & Wendon, 2013), siendo el evento clave en el desarrollo de ALF, la muerte masiva de hepatocitos que sobrepasa la capacidad regenerativa del hígado (Cardoso et al., 2017). Se puede manifestar como coagulopatía y trastornos neurológicos (encefalopatía), además de ictericia y reducción de la capacidad metabólica (Arshad et al., 2020; Cardoso et al., 2017).

2.2.1. Etiología del fallo hepático agudo

Las causas de ALF varían ampliamente dependiendo de factores socioeconómicos, exposición a factores de riesgo y predisposición genética. La causa más frecuente de ALF, especialmente en países occidentales, es la toxicidad por paracetamol, seguida de la toxicidad por otros fármacos (en inglés *drug induced liver injury*, DILI), las hepatitis víricas y otras causas

Introducción

de tipo vascular o metabólica (como la enfermedad de Wilson) entre otras (Lee et al., 2008; Whitehouse & Wendon, 2013).

Dado el papel indispensable que ejerce el hígado en el metabolismo de tóxicos, la susceptibilidad de este órgano a reacciones adversas producidas por medicamentos es elevada (Andrade et al., 2019). El DILI se ha clasificado como intrínseco si se debe al medicamento (dosis o uso junto con otros fármacos hepatotóxicos) o idiosincrático si está relacionado con factores propios del paciente como su edad, sexo, consumo de alcohol o comorbilidades (Andrade et al., 2019; Grek & Arasi, 2016). Además del paracetamol, los fármacos que con más frecuencia producen DILI son antimicrobianos como antituberculosos especialmente la isoniazida y penicilinas, antiepilépticos, estatinas, antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y algunos suplementos dietéticos o de hierbas (Rajaram & Subramanian, 2018; Whitehouse & Wendon, 2013). A nivel global, las hepatitis víricas son la segunda causa más común de ALF. Respecto a otras causas de ALF menos comunes, cabe destacar la enfermedad de Wilson, que consiste en la acumulación de cobre en el hígado como consecuencia de un trastorno congénito de su transporte (Pfeiffenberger et al., 2017), el síndrome de Budd-Chiari (trombosis de las venas suprahepáticas), las hepatitis autoinmunes y el hígado graso agudo del embarazo (Bernal & Wendon, 2013; Rajaram & Subramanian, 2018).

2.2.2. Fallo hepático agudo inducido por paracetamol

2.2.2.1. Descubrimiento y mecanismo de acción del paracetamol

El paracetamol, también denominado Acetaminofén en Norte América (en inglés *Acetaminophen*, APAP) es uno de los analgésicos más comercializados a nivel global (Jóźwiak-Bebenista & Nowak, 2014). La actividad antipirética de su precursor, la acetanilida fue descubierta de manera accidental por A. Cahn y P. Hepp en 1886 y, rápidamente, se incorporó a la práctica clínica. En 1893 Bayer sintetizó por primera vez el paracetamol (Brune et al., 2015) y, finalmente, su uso se extendió en la década de los 60 (Nanra, 1980). Actualmente existen alrededor de 100 formulaciones que contienen APAP solo o en combinación con otros principios activos (Jóźwiak-Bebenista & Nowak, 2014).

A pesar de la larga trayectoria de este principio activo, su mecanismo de acción ha sido descrito recientemente. A dosis terapéuticas el paracetamol presenta actividad analgésica y antipirética, lo cual recuerda a los AINE clásicos, sin embargo, a diferencia de este grupo de fármacos, no presenta actividad anti-inflamatoria ni la toxicidad a nivel gastrointestinal típica

de este grupo de principios activos (Graham & Scott, 2005). El APAP actúa inhibiendo la actividad peroxidasa de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Graham & Scott, 2005), a diferencia de los AINE que inhiben la producción de prostaglandinas catalizada por la COX mediante competición con el ligando (ácido araquidónico) por el sitio activo de la enzima (Bertolini et al., 2006; Graham et al., 2013; Józwiak-Bebenista & Nowak, 2014; Smith, 2009).

2.2.2.2. Metabolismo de APAP en el hígado

En general, la metabolización de fármacos en el hígado se produce en dos fases; por un lado, las reacciones de fase I son aquellas en las que los grupos polares sufren oxidación, reducción o hidrólisis principalmente catalizadas por el citocromo P450 y otras hemoproteínas de la familia CYP (Park et al., 1995). Por otro lado, la fase II del metabolismo consiste en la conjugación de metabolitos generados en la fase I con ácido glucurónico por la UDP-glucuroniltransferasa (UGT), con glutatión (GSH) por la glutatión S-transferasa o con sulfatos por sulfotransferasas (SULT); los productos de estas conjugaciones se eliminan por la orina (Almazroo et al., 2017; Grant, 1991). En el caso concreto de la metabolización del APAP, a dosis terapéuticas, un 2% es excretado directamente por la orina sin ser metabolizado, mientras que un 90% se metabolizan por conjugación como se ha descrito anteriormente y los productos inactivos se excretan por bilis y orina. Por último, entre un 5 y un 9% sufre conversión oxidativa por CYP (principalmente esta reacción se lleva a cabo por CYP2E1) dando lugar al metabolito N-acetil p-benzoquinona imina (NAPQI) que es una especie altamente reactiva, capaz de aceptar 2 electrones lo que le convierte en una especie electrófila y oxidante. NAPQI se metaboliza por conjugación con GSH dando lugar a un metabolito no tóxico que se excreta por orina (Yan et al., 2018) (Figura 3).

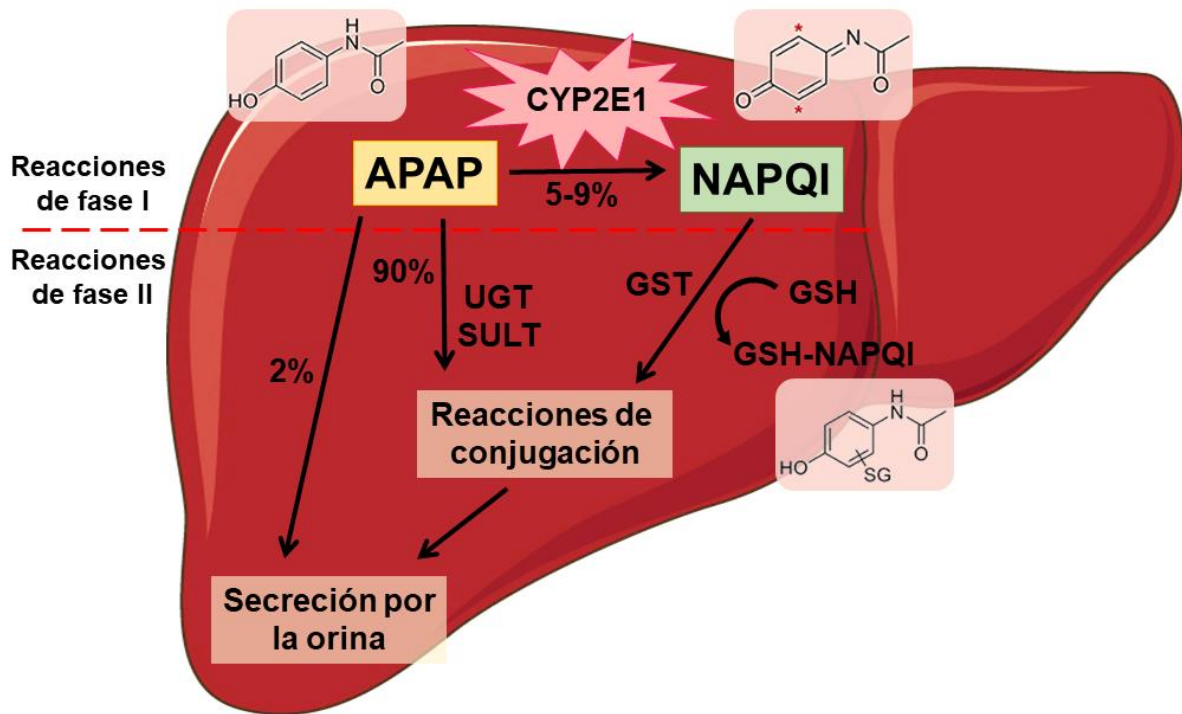


Figura 3. Metabolismo de APAP en el hígado.

Modificado de Geib y col. *Front Chem.* 2019 (Geib et al., 2019)

2.2.2.3. Hepatotoxicidad por APAP

Aunque a dosis terapéuticas (1-4 g/día) el APAP es seguro, como ya se ha mencionado anteriormente, la toxicidad por este fármaco es la primera causa de ALF en países occidentales, especialmente en Norte América y Europa (Lee et al., 2008), incluyendo tanto los casos de sobredosis intencionados (generalmente con fines suicidas) (Pezzia et al., 2017) como aquellos involuntarios, ya sea por ignorancia de las pautas correctas de administración, como por comorbilidades que generan un mayor riesgo de hepatotoxicidad incluso a dosis terapéuticas, como es el caso de individuos que consumen alcohol de manera crónica (Whitehouse & Wendon, 2013). De hecho, entre el 40 y el 70% de los casos de ALF en Europa y Reino Unido se deben a esta causa; mientras que en Estados Unidos corresponde al 46% de los casos de ALF provocando unas 500 muertes al año (Lee, 2017). Una sola dosis de entre 10 y 15 gramos de APAP puede tener efectos fatales en el hígado produciendo una necrosis masiva de hepatocitos; sin embargo, cada vez hay más evidencias de que la ingestión de dosis menores a 10 gramos durante días consecutivos conlleva un alto riesgo de daño hepático en determinados individuos (Larson, 2007). Algunos de los factores que influyen en la hepatotoxicidad del paracetamol y que pueden incluso disminuir el límite inferior

de dosis tóxica son la edad, factores genéticos, enfermedades hepáticas preexistentes, el estado nutricional del individuo y el consumo de alcohol u otros medicamentos (Bunchorntavakul & Reddy, 2018).

La toxicidad por APAP se debe a la alteración del sistema de metabolización por diferentes causas. La más común, la sobredosis por APAP, supone una sobrecarga de los mecanismos de detoxificación. El uso de algunos fármacos o medicamentos a base de plantas pueden inducir la actividad de CYP2E1 aumentando así la síntesis de NAPQI lo cual puede dar lugar a la acumulación de esta especie tóxica. Asimismo, el consumo de alcohol o una situación de malnutrición pueden disminuir los suministros de GSH (Bunchorntavakul & Reddy, 2018). En términos generales, la excesiva producción de NAPQI tiene como resultado una rápida depleción de las reservas de GSH por lo que hay una gran cantidad de NAPQI, que es altamente reactivo, disponible para formar uniones covalentes con grupos cisteína de proteínas del hepatocito. Este es el paso inicial e irreversible de la hepatotoxicidad. Las proteínas mitocondriales son la principal diana de NAPQI, que interfiere de este modo en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, produciéndose especies reactivas de oxígeno (en inglés *reactive oxygen species*, ROS) en la mitocondria (Ramachandran & Jaeschke, 2018). Además, se produce daño del ADN mitocondrial que activa la señalización de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) que eventualmente dará como resultado la apertura de poros de la transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT). Este evento supone el colapso del potencial de membrana de la mitocondria, el cese de la síntesis de ATP y la liberación al citoplasma de proteínas mitocondriales que amplifican la señal de estrés oxidativo, lo que desencadena la fragmentación del ADN nuclear y la muerte celular por necroptosis (Du et al., 2016; Iorga et al., 2017). La muerte masiva de hepatocitos por necrosis conlleva la liberación de patrones moleculares asociados a la lesión (en inglés *damage-associated molecular pattern*, DAMP) entre los que se incluyen el ADN mitocondrial, fragmentos de ADN nuclear y la proteína HMGB1 (Chung et al., 2012). Los DAMP se unen a los receptores de reconocimiento tales como los receptores tipo toll (en inglés *toll-like receptors*, TLR) presentes en células inflamatorias, como macrófagos residentes (células de Kupffer), activando la producción de citoquinas y quimioquinas en estas células (Ramachandran & Jaeschke, 2018). Estos mediadores inflamatorios activan a su vez otras células del sistema inmune tales como neutrófilos o monocitos que son reclutados a la zona dañada para retirar restos celulares y preparar el tejido para la reparación. (Rada et al., 2018). Sin embargo, cuando se produce en exceso, esta respuesta inflamatoria puede contribuir a un daño más severo provocando la disfunción del hígado (Sanz-García et al., 2013). Finalmente, como resultado de la liberación de citoquinas a la circulación, se produce el daño extrahepático (Antoniades et al., 2008) (Figura 4).

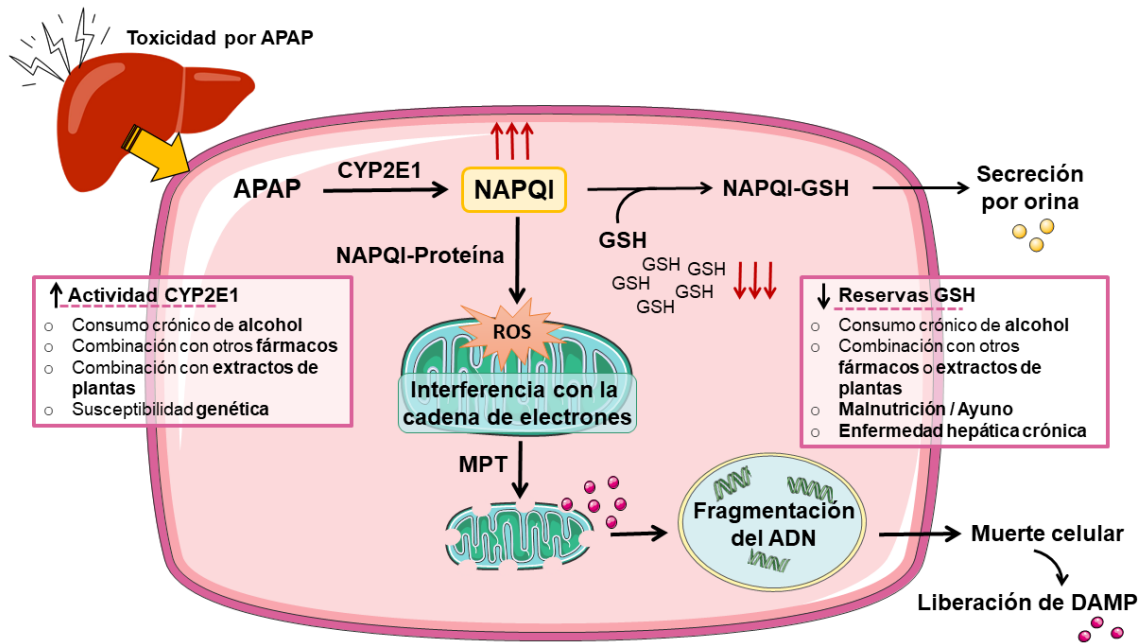


Figura 4. Hepatotoxicidad por APAP.

2.2.3. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento del fallo hepático agudo

La rápida progresión del ALF desde la disfunción hepática aguda a un fallo multiorgánico, hace que sea necesario un diagnóstico y tratamiento temprano a la hora de tomar decisiones tales como la susceptibilidad de cada paciente para ser sometido a hospitalización o trasplante hepático. Se suele sospechar que se está produciendo un episodio de ALF en aquellos pacientes que, sin tener una enfermedad hepática preexistente, presentan daño hepático y coagulopatía manifestado por un INR (del inglés *international normalised ratio*), utilizado para monitorizar la coagulación, superior a 1,5 y transaminasas tres veces por encima del límite superior de los valores normales (Wendon et al., 2017). El primer paso en el diagnóstico es conocer en detalle la historia clínica del paciente, para determinar la etiología, que proporciona una idea del pronóstico y permite que el tratamiento sea más específico, y descartar la presencia de enfermedad hepática crónica. Además, se debe evaluar si existe encefalopatía hepática, insuficiencia orgánica extrahepática, así como la severidad de la hepatitis (Arshad et al., 2020; Rajaram & Subramanian, 2018).

Actualmente existen diferentes herramientas que ayudan a establecer un pronóstico y determinar la necesidad de realizar un trasplante hepático. El criterio establecido por el Kings College (Reino Unido), discrimina entre el ALF causado por intoxicación con APAP y el resto de causas. Además de la etiología, tiene en cuenta el grado de acidemia, coagulopatía e

insuficiencia renal; mientras que, en los casos de daño agudo no inducido por APAP, también tiene en cuenta la edad, la bilirrubina circulante y tiempo durante el cual se presenta la ictericia (Renner, 2007). Por su parte, la escala MELD (del inglés *Model for End-Stage Liver Disease*), también tiene en cuenta la coagulopatía, la insuficiencia renal y los niveles séricos de bilirrubina. Una mayor puntuación en la escala MELD indica mayor probabilidad de fallecimiento del paciente (Saab et al., 2003). Por último, el criterio de Clichy, establecido en una cohorte de pacientes con hepatitis B fulminante, es capaz de seleccionar con precisión aquellos pacientes con ALF que requieren trasplante hepático; este criterio tiene en cuenta la presencia de encefalopatía y el nivel de Factor de coagulación V (como manifestación de una posible coagulopatía) (Renner, 2007).

En los últimos años, el interés por la búsqueda de biomarcadores específicos y no invasivos para el diagnóstico y pronóstico ha crecido notablemente. En el caso de DILI, actualmente no existen biomarcadores específicos y el diagnóstico todavía se basa en la exclusión de causas alternativas del daño hepático, y los niveles en suero de las enzimas glutámico pirúvico-transaminasa (GPT) y glutámico oxalacético transaminasa (GOT), la fosfatasa alcalina y la bilirrubina total siguen siendo los pilares en la detección de DILI (Umbaugh & Jaeschke, 2021). Por esta razón, se han empleado grandes esfuerzos en la búsqueda de nuevos biomarcadores serológicos para el pronóstico de ALF. En este sentido la proteína mitocondrial glutamato deshidrogenasa (GLDH), así como fragmentos de ADN mitocondrial (mtDNA) y nuclear (nDNA) han sido propuestos como biomarcadores para predecir el desenlace de DILI; sin embargo, posteriormente se ha demostrado que, a pesar de ser específicos de enfermedad hepática, presentan una baja sensibilidad para predecir el pronóstico. Por otro lado, el microRNA-122 también se ha propuesto como biomarcador pronóstico de ALF, aunque más específicamente para pacientes con DILI por APAP, sin embargo, presenta considerables variaciones intra e interindividuales (Andrade et al., 2019; McGill & Jaeschke, 2018). Por último, el marcador diagnóstico más prometedor, son los aductos APAP-proteína que se pueden medir en circulación y tienen una vida media más larga que el propio APAP. El único biomarcador que ha sido propuesto para el diagnóstico de DILI hasta el momento es el aducto APAP-cisteína derivado de proteínas (APAP-CYS) (Heard et al., 2011; Vliegenthart et al., 2015). Asimismo, existen sistemas de puntuación aplicados al diagnóstico de DILI. Los más populares incluyen las escalas RUCAM, CDS (en inglés, *Clinical scale for the diagnosis*) y DDW-J (en inglés, *Digestive Disease Week Japan 2004*) (Fu et al., 2019). Además, la biopsia hepática se ha considerado una herramienta diagnóstica complementaria que puede ayudar y reforzar el proceso de diagnóstico. Por último, en casos de sobredosis de APAP, el nomograma Rumack-Matthew, que se emplea de manera rutinaria para determinar si el

Introducción

cuidado estándar, N-acetilcisteína (NAC), es necesario, se publicó inicialmente en 1975 (Rumack & Matthew, 1975) y sigue siendo el método de preferencia para el pronóstico.

Actualmente, no existe un tratamiento general para el ALF y el enfoque terapéutico se basa principalmente en cuidados de apoyo al paciente (Plauth et al., 2019). Además, es importante el manejo de las posibles complicaciones como fallo renal, sepsis, edema cerebral, coagulopatía o encefalopatía a fin de evitar el desarrollo de fallo multi orgánico (Rajaram & Subramanian, 2018). Existen tratamientos específicos para algunas causas de ALF en caso de que esta sea conocida; es el caso de la N-acetilcisteína (NAC) en casos de ALF inducido por APAP o de los análogos de nucleós(t)idos (ANN) en infecciones por virus de la hepatitis B (Oketani et al., 2014).

Aunque la NAC es el tratamiento de elección en intoxicación por APAP ya que presenta una alta seguridad y es altamente efectivo (Smilkstein et al., 1988; "StatPearls," 2022), debe ser administrada en las 8 primeras horas post ingesta de una dosis alta de APAP y presenta una ventana terapéutica muy estrecha, aunque los efectos secundarios, entre los que se incluyen náuseas, vómitos y reacciones anafilácticas en la zona de administración, no suponen un riesgo para la vida (Bebarta et al., 2010; Fisher & Curry, 2019). Este fármaco es un precursor del GSH, por lo que actúa restableciendo las reservas del mismo en el hígado. El aumento de reservas de GSH favorece la metabolización de la especie reactiva NAPQI (Rushworth & Megson, 2014) y contrarrestan la producción de ROS en la mitocondria, además el exceso de NAC circulante puede ser metabolizado dando lugar a intermediarios del ciclo de Krebs y favoreciendo así el equilibrio energético en la célula (Knight et al., 2002; Saito, Zwingmann, et al., 2010).

En pacientes en los que se detecta la intoxicación en las primeras 4 horas, también se recomienda el lavado gástrico con carbón activado, lo cual reduce la absorción de APAP entre un 50 y un 90% (Chiew et al., 2018; Underhill et al., 1990).

Como ya se ha mencionado anteriormente, el pronóstico de la enfermedad es importante para determinar cómo de probable es que el paciente mejore; en ocasiones el deterioro hepático es tan profundo o se establece de manera tan rápida que la recuperación no es posible; en este caso el tratamiento definitivo es el trasplante hepático (Germani et al., 2012; Simpson et al., 2009). También existen sistemas artificiales de apoyo hepático que son de utilidad para optimizar parámetros hemodinámicos, neurológicos y bioquímicos, ya sea previo al trasplante hepático o para facilitar la recuperación (Kandiah & Subramanian, 2019).

2.2.4. Proteínas BMP en el fallo hepático agudo

Hasta el momento, no existen muchos trabajos centrados en el estudio de la implicación de las proteínas BMP y su señalización en la progresión del ALF. Sin embargo, el papel de las proteínas BMP en la homeostasis del hierro hepático ha sido ampliamente estudiado. La hepcidina es una molécula clave en la regulación de la absorción de hierro, ya que, mediante la unión y bloqueo de la ferroportina, transportador de hierro presente en el duodeno y macrófagos, inhibe el paso del hierro a la circulación evitando la toxicidad por presencia de hierro no unido a transferrina y por acumulación del mismo en órganos y tejidos (Muñoz et al., 2011). Se ha demostrado que BMP2 y BMP6 son dos ligandos involucrados en la síntesis de hepcidina (Canali et al., 2017; Koch et al., 2017; Meynard et al., 2009) mediante la señalización a través de los receptores tipo I ALK3 y ALK2, respectivamente, por la ruta de las proteínas Smad (Traeger et al., 2018). Aunque en condiciones basales, BMP2 es el principal ligando regulador de la síntesis de hepcidina, debido a que se encuentra más expresado en el hígado, en situación de sobrecarga de hierro se produce un aumento de la expresión de BMP6 dependiente de los niveles de hierro, de manera que este ligando cobra mayor importancia en la regulación de la hepcidina en este contexto (Canali et al., 2017). Asimismo, el correceptor hemojuvelina también ha demostrado un papel clave favoreciendo la síntesis de esta molécula (Babitt et al., 2006; Silvestri et al., 2019). Algunos estudios han mostrado la asociación de estas proteínas BMP con enfermedades tales como la talasemia o hemocromatosis (Arezes et al., 2018; Delima et al., 2012; Lim et al., 2019). En este sentido, la sobrecarga de hierro puede ser el desencadenante para que se produzca un ALF y, de hecho, dos estudios han establecido una relación entre la concentración sérica de hepcidina y el pronóstico de ALF (Simonse et al., 2013; Spivak et al., 2019). Además, se ha observado que en situaciones de estrés oxidativo o hipoxia se produce una disminución en la síntesis de hepcidina por inhibición de la ruta de señalización BMP (Chaston et al., 2011; Li et al., 2020). De hecho, en un artículo enfocado en el papel de las proteínas BMP en DILI, se observó que los ratones sometidos a una sobredosis de APAP presentaron un aumento en la concentración de hierro hepático. Este estudio sugiere que el estrés oxidativo producido por el exceso de APAP tiene como consecuencia la inhibición de la síntesis de hepcidina y propone que el factor inducible por hipoxia HIF1 α , que estaría regulado por el estrés oxidativo, podría ser el responsable de esta desregulación mediante la inhibición de la ruta de señalización BMP (van Swelm et al., 2012). Por el contrario, en un estudio reciente se observó una inducción de la ruta de señalización de BMP en ratones sometidos a un modelo de sobredosis de APAP (Stavropoulos et al., 2022); por tanto, existen resultados contradictorios en cuanto a la activación o inhibición de la ruta de señalización de las BMP en este contexto así como los efectos derivados de la misma.

Introducción

Asimismo, en dos estudios en los que se relacionan las proteínas BMP con procesos de ALF en modelos murinos, se observó una modulación de la expresión hepática de BMP2 y BMP4 y se puso de manifiesto la importancia de la señalización de estas proteínas en el proceso de reparación de fallo hepático agudo mediante la inducción de la proliferación y desarrollo de células hepáticas (Nakatsuka et al., 2007; Oumi et al., 2012). Por último, en un modelo de daño inducido por CCl₄, se observó en las primeras horas, un incremento de la expresión hepática de BMP7 (Zou et al., 2019).

2.3. Enfermedad hepática crónica

A nivel global, las enfermedades hepáticas crónicas (en inglés *chronic liver disease*, CLD) representan cerca del 3,5% de la mortalidad por cualquier causa y el carcinoma hepatocelular (en inglés *hepatocellular carcinoma*, HCC) es la sexta causa más común de cáncer (Asrani et al., 2019), lo cual pone de manifiesto la urgente necesidad de implementar intervenciones multidisciplinarias para abordar la carga que las CLD representan para los sistemas de salud de todo el mundo.

Las etiologías causantes de las CLD son múltiples e incluyen las hepatitis crónicas víricas, enfermedades colestásicas, enfermedad hepática por alcohol, y la enfermedad de hígado graso no alcohólico (en inglés *nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD), principalmente su forma más progresiva denominada esteatohepatitis no alcohólica que se da en más del 40-50% de pacientes con NAFLD (Cheemerla & Balakrishnan, 2021). Las CLD, independientemente de la etiología, se caracterizan por presentar fibrosis hepática progresiva que, si no se trata, puede derivar en cirrosis o HCC (Parola & Pinzani, 2019; Roehlen et al., 2020). Actualmente, la cirrosis hepática es la undécima causa más común de mortalidad a nivel global y la cuarta causa de muerte más común en adultos en Europa central (Asrani et al., 2019; Marcellin & Kutala, 2018). El sexo masculino y la edad avanzada son los principales factores de riesgo en la progresión de la fibrosis hepática. Asimismo, la obesidad, generalmente asociada a la presencia de esteatosis hepática, el consumo de alcohol o la presencia de otras enfermedades hepáticas concomitantes, se asocian a una mayor progresión de la fibrosis (Friedman, 2003; Pimpin et al., 2018; Smith et al., 2019).

2.3.1. Fibrosis hepática

Como ya se ha comentado, la principal característica de las CLD es el desarrollo de fibrosis hepática, que consiste en un proceso de reparación que se desarrolla como consecuencia de

un daño crónico en el tejido hepático (Friedman, 2003). Inicialmente este daño produce en el hígado una activación de la respuesta inflamatoria, que desencadena un proceso de reparación del daño mediante la producción de fibras que actúan como cicatriz, y cuya función es que el daño no se extienda al resto del tejido hepático, provocando a su vez la pérdida de hepatocitos que puede llevar a una disfunción del hígado y en última estancia fallo hepático (Parola & Pinzani, 2019; Roehlen et al., 2020). Se ha observado que la fibrosis es un proceso reversible si se elimina el insulto que lo provoca (Arthur, 2002; Dixon et al., 2004; Ramachandran & Iredale, 2009); por el contrario, ya se ha comentado que en caso de que la fibrosis progrese, puede llevar al desarrollo de cirrosis, y en los casos más avanzados se puede producir incluso HCC (Roehlen et al., 2020).

En el proceso de desarrollo de la fibrosis intervienen diferentes tipos celulares y mediadores. Sin lugar a dudas, el hecho clave en este proceso es la activación de las HSC. En condiciones basales, las HSC quiescentes actúan como reservorio de vitamina A en el hígado (Puche et al., 2013). Frente a distintos insultos, los hepatocitos, las células del endotelio sinusoidal o las células de Kupffer, que se activan como parte de la respuesta inflamatoria, estimulan de manera paracrina las HSC promoviendo su activación mediante la liberación de mediadores inflamatorios (Koyama & Brenner, 2017). De este modo las HSC sufren transdiferenciación hacia un fenotipo tipo miofibroblasto lo cual incluye alteraciones fenotípicas como la pérdida de vitamina A, inducción de la expresión de la actina del músculo liso α (en inglés *α smooth muscle actin*, α SMA) y una mayor proliferación y contractibilidad (Puche et al., 2013; Zhang et al., 2016). Cuando se activan, las HSC se convierten en la principal fuente de componentes de la matriz extracelular (en inglés *extracellular matrix*, ECM) como fibras de colágeno; esto sucede en paralelo a una disminución en la actividad de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) encargadas de degradar el exceso de proteínas de la ECM (Duarte et al., 2015; Hernandez-Gea & Friedman, 2011). La secreción y acumulación de los componentes de la ECM por las HSC activadas es lo que produce la cicatriz fibrótica con el fin de prevenir la expansión del tejido dañado. Además de componentes de la ECM, las HSC activadas secretan citoquinas y quimioquinas que favorecen la proliferación de células progenitoras hepáticas y hepatocitos (Safadi & Friedman, 2002) (Figura 5).

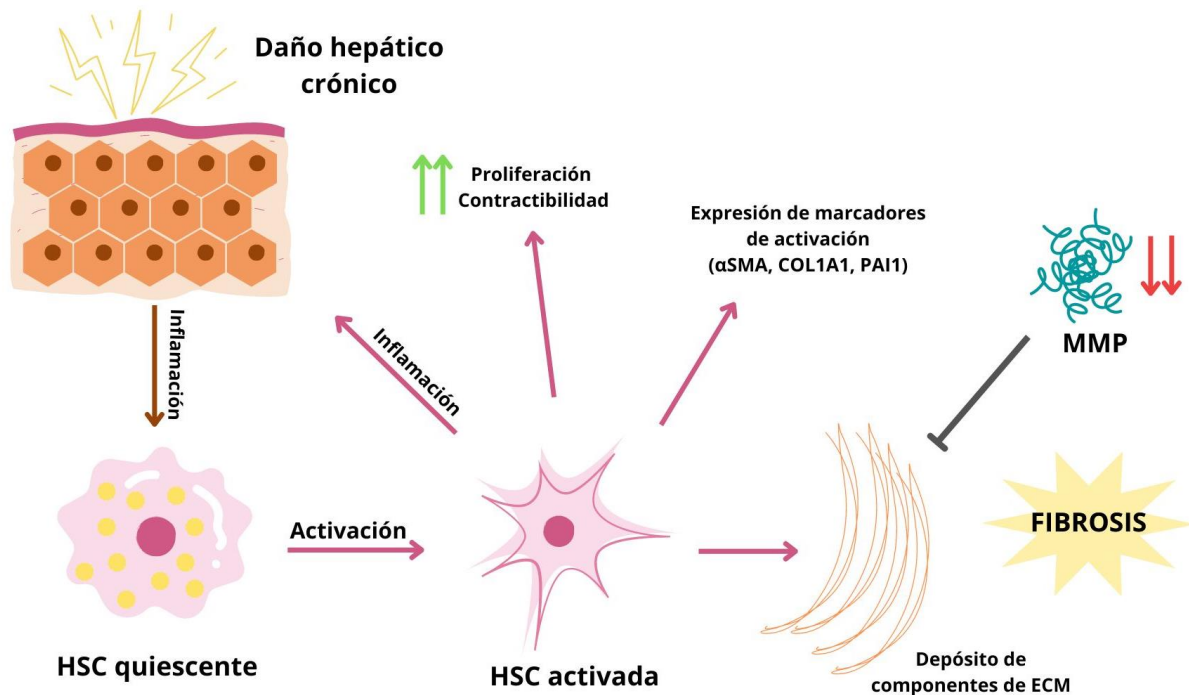


Figura 5. Activación de HSC en respuesta a un daño hepático crónico.

2.3.2. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad hepática crónica

Las CLD se caracterizan por ser asintomáticas en las primeras fases de la enfermedad, lo cual favorece la progresión de la misma y empeora el pronóstico. Como ya se ha comentado, estas patologías cursan con fibrosis hepática progresiva que es sin duda el principal factor pronóstico de la morbilidad y mortalidad de pacientes con CLD; por tanto, establecer de manera precisa el grado de fibrosis es clave para predecir el desenlace de la enfermedad. Esto supone que el desarrollo de técnicas diagnósticas sea esencial para poder establecer un diagnóstico precoz. En este sentido, la biopsia hepática sigue siendo la técnica de referencia en el diagnóstico de CLD, ya que es la única técnica que permite establecer con precisión el grado de fibrosis hepática (Buzzetti et al., 2016; Venkatesh & Torbenson, 2022). Sin embargo, la biopsia hepática se considera un método invasivo, por ello no está recomendado para uso rutinario debido al alto riesgo de sangrado y complicaciones, además, se pueden producir variaciones en el diagnóstico en función del lugar de toma de la muestra y de los patólogos que evalúan la misma, y supone un alto coste económico (Almpanis et al., 2016).

Por esta razón, en los últimos años se han realizado grandes esfuerzos en la búsqueda de herramientas de diagnóstico no invasivo, y de hecho se han desarrollado nuevas técnicas como los test serológicos y las técnicas de imagen. En lo que refiere a los métodos de imagen la elastografía transitoria (ET), como es el caso del FibroScan®, ha supuesto un gran avance

a la hora de determinar la presencia de fibrosis hepática. Esta técnica se basa en la reducción de la elasticidad secundaria a la deposición de tejido fibrótico. Para ello, usa una onda pulsátil vibratoria que penetra en el tejido hepático y una onda de ultrasonido que capta la velocidad a la que se propaga la primera onda para determinar la existencia de fibrosis (Bartres & Lens, 2013). Actualmente, esta técnica tiene una alta disponibilidad; sin embargo, todavía presenta algunas limitaciones, como inexactitudes derivadas de la presencia de obesidad central (Foucher et al., 2006).

En lo referente a los test serológicos, existen algoritmos no invasivos para el diagnóstico que son modelos matemáticos calculados a partir de variables clínicas o analíticas, que son fáciles de obtener en una consulta rutinaria, y que han sido validados para la cuantificación de la probabilidad de existencia de daño histológico avanzado. De hecho, se han desarrollado algoritmos que presentan una alta precisión para detectar fibrosis avanzada, como el *Fibrosis 4 score* (FIB4) (Sterling et al., 2006) y el *Aminotransferase to platelet ratio index* (APRI) (Lin et al., 2011) ambos basados en el recuento de plaquetas y los niveles de las transaminasas GOT y GPT, así como la edad en el caso del FIB4. Para pacientes con NAFLD, se han desarrollado el *NAFLD fibrosis score* (Angulo et al., 2007; Lai & Afdhal, 2019) y el *Hepamet Fibrosis Score* (Ampuero et al., 2020) que tienen en cuenta variables metabólicas como la diabetes o el índice de resistencia a la insulina HOMA. Sin embargo, ninguna de estas técnicas o la combinación de las mismas permite sustituir completamente el examen histológico (Cobbina & Akhlaghi, 2017; Hardy et al., 2016).

En lo que respecta al abordaje terapéutico de las CLD, existen tratamientos específicos en base a la etiología, como es el caso de la hepatitis por infección por VHC, cuyo tratamiento ha evolucionado significativamente en las últimas décadas (Falade-Nwulia et al., 2017), o las enfermedades colestásicas donde el ácido obeticólico se ha indicado para el tratamiento de la colangitis biliar primaria (Kjærgaard et al., 2021). Sin embargo, actualmente no existe ningún tratamiento que permita revertir la fibrosis hepática, y cuando esta progresa, puede llegar a ser necesario el trasplante hepático.

2.3.3. Enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD)

La NAFLD fue descrita por primera vez en 1980 por Ludwig et al. (Ludwig et al., 1980) y actualmente se está convirtiendo en la enfermedad hepática crónica más prevalente a nivel global (Younossi et al., 2018). Se define como la presencia de acumulación de grasa en más del 5% de los hepatocitos no atribuible a consumo de alcohol, medicamentos hepatotóxicos o a la presencia de otras patologías hepáticas como hepatitis víricas (Chalasanani et al., 2012).

Introducción

En la mayoría de pacientes la acumulación hepática grasa está asociada a factores de riesgo metabólico, de hecho, la NAFLD se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico por lo que está estrechamente relacionada con las características más relevantes de este síndrome como obesidad, hipertensión, dislipemia, obesidad central, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Angulo, 2002; Chalasani et al., 2012; Marchesini et al., 2001). Esto explica que la prevalencia de NAFLD en pacientes obesos y diabéticos supere el 50%, mientras que en la población general afecta a un cuarto de la población adulta, siendo su prevalencia mayor en países occidentales, donde el estilo de vida sedentario está provocando un aumento en su incidencia (Younossi et al., 2016). Cabe remarcar que muchos países asiáticos tienen una prevalencia similar a la de Estados Unidos y Europa como es el caso de India, Corea y Japón, donde el aumento en la prevalencia de NAFLD ha ido acompañado de un aumento en la obesidad, hipertensión y diabetes tipo 2 (Kanwar & Kowdley, 2016). En general, mientras que la prevalencia de otras enfermedades hepáticas se ha mantenido estable o ha disminuido, como es el caso de las hepatitis víricas gracias a los nuevos tratamientos y la vacunación; la prevalencia de la NAFLD es la única que se ha visto incrementada en las últimas décadas de forma paralela al incremento en la prevalencia de la obesidad y la diabetes tipo 2 (Younossi et al., 2020).

2.3.3.1. Historia natural y progresión de la NAFLD

La NAFLD abarca un espectro de entidades claramente establecidas y diferenciadas entre las que se encuentran la esteatosis simple y la esteatohepatitis que pueden progresar a fibrosis, cirrosis y en algunos casos a HCC (Chalasani et al., 2012). La forma más benigna de NAFLD es la esteatosis simple (en inglés *nonalcoholic fatty liver*, NAFL) que se define como la presencia de grasa en al menos el 5% de los hepatocitos (Lindenmeyer & McCullough, 2018). Tradicionalmente, la NAFL se ha considerado como una enfermedad benigna y no progresiva; sin embargo, varios estudios recientes han puesto en duda esta afirmación (McPherson et al., 2015). Por su parte la esteatohepatitis no alcohólica (en inglés *nonalcoholic steatohepatitis*, NASH) es una etapa más severa dentro de la NAFLD. Se caracteriza por la presencia en el hígado de esteatosis, inflamación lobulillar y portal y degeneración de los hepatocitos o *ballooning* y se puede presentar con o sin fibrosis (Lindenmeyer & McCullough, 2018). Esta situación puede llevar a estadios de fibrosis avanzada o cirrosis que se caracterizan por una disminución en la presencia de esteatosis e inflamación hepática, es lo que se conoce como “*burned-out NASH*” (Caldwell & Marchesini, 2018; Powell et al., 1990). Por último, se pueden dar complicaciones asociadas a hipertensión portal o incluso HCC (Golabi et al., 2019; Huang et al., 2021) (Figura 6).

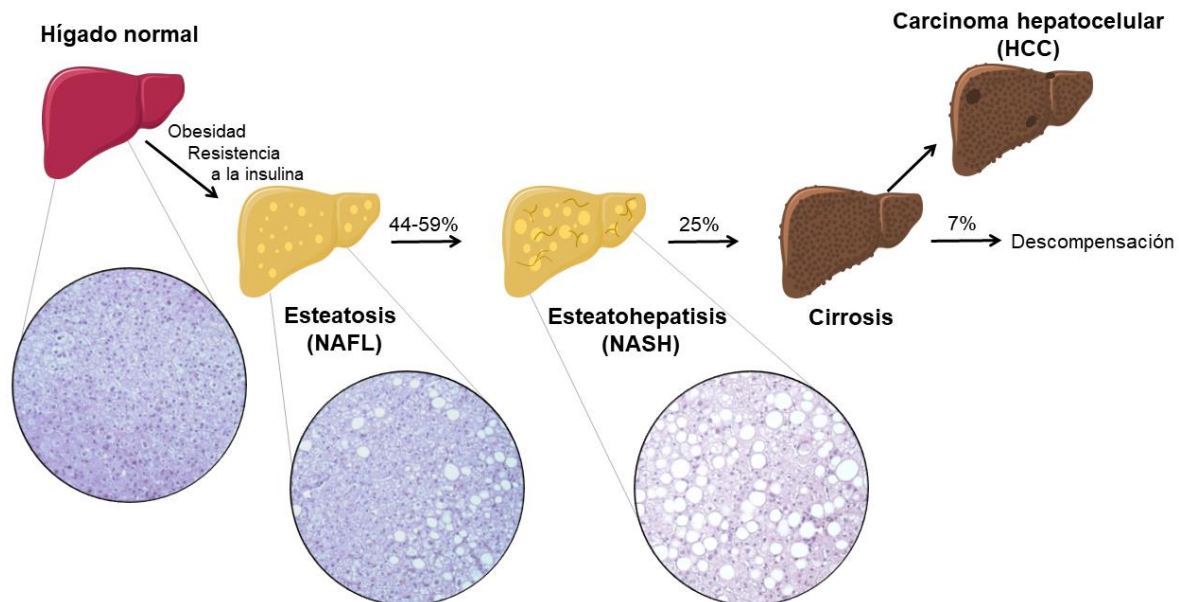


Figura 6. Progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico

Como ya se ha mencionado anteriormente, la prevalencia global de la NAFLD se encuentra alrededor de un 25%, siendo significativamente superior en la población obesa y diabética. En este sentido, mientras que la mayoría de pacientes son generalmente asintomáticos y solo presentan NAFL, se calcula que alrededor de un 59% progresan a NASH con diferentes grados de fibrosis (Younossi et al., 2016). El género masculino, la edad, el peso, el colesterol total, la resistencia a la insulina, la hipertensión y la presencia de síndrome metabólico son factores asociados a la presencia de NASH (Lindenmeyer & McCullough, 2018). Entre los pacientes que presentan NASH, alrededor de un 41% presentan progresión de la fibrosis (Reddy et al., 2020). Algunos factores predictivos de progresión de la fibrosis son la edad, la inflamación observada en la biopsia, la presencia de hipertensión y un bajo ratio de las transaminasas GOT/GPT (Goh & McCullough, 2016). Por último, un 25% de pacientes con NAFLD progresan a cirrosis y un 7% alcanzan la etapa terminal de la enfermedad hepática (Lindenmeyer & McCullough, 2018) (Figura 6). En general, la NAFLD es en la mayoría de casos una enfermedad de progresión lenta, sin embargo, una proporción significativa de los pacientes que la padecen sufrirá complicaciones asociadas al hígado (Angulo et al., 2015). La edad y la diabetes son los predictores clínicos por excelencia de progresión de la enfermedad; de hecho, se ha observado un mayor riesgo de desarrollar complicaciones asociadas al hígado en pacientes de mayor edad y con diabetes (Dulai et al., 2017). Por su parte, la presencia y el grado de fibrosis es la principal característica histológica para predecir la mortalidad y el desarrollo de complicaciones hepáticas (Hardy et al., 2016), y se asocia también con la necesidad de trasplante hepático (Angulo et al., 2015; Ekstedt et al., 2015). La

Introducción

principal causa de mortalidad en pacientes con NAFLD son las complicaciones cardiovasculares, lo cual concuerda con el hecho de que la NAFLD se considere la manifestación hepática del síndrome metabólico que es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares (Lindenmeyer & McCullough, 2018). Asimismo, la progresión de la fibrosis conlleva una serie de riesgos y complicaciones asociadas a la hipertensión portal, siendo las complicaciones hepáticas la tercera causa más común de mortalidad en NAFLD (Angulo et al., 2015; Ekstedt et al., 2015).

2.3.3.2. Patogénesis de la NAFLD

En presencia de obesidad y resistencia a la insulina se produce una alteración del metabolismo de glúcidos y lípidos (Donnelly et al., 2005; Lindenmeyer & McCullough, 2018; Nassir et al., 2015; Yang & Mottillo, 2020) que tiene como consecuencia un aumento del flujo de ácidos grasos libres (en inglés *free fatty acids*, FFA) en el hígado (Nassir et al., 2015; Rada et al., 2020; Zhang et al., 2014). La acumulación de FFA en los hepatocitos tiene un efecto lipotóxico que supone la producción de ROS, estrés del retículo endoplásmico (en inglés *endoplasmatic reticulum*, ER) (Pfaffenbach et al., 2010; Rada et al., 2020) y disfunción celular (Golabi et al., 2019; Hardy et al., 2016). Todo ello termina desencadenando la respuesta del sistema inmune y la muerte celular por necrosis y apoptosis, así como otros procesos como la activación de las HSC que favorece el desarrollo de fibrosis (Hardy et al., 2016). De este modo, tiene lugar la progresión de la enfermedad.

Inicialmente se planteó la hipótesis del doble impacto para explicar el desarrollo de estos procesos. La acumulación de lípidos en el hígado supone el primer impacto, que sensibiliza al hígado frente a futuros impactos (Letteron et al., 1996); sin embargo, muchos pacientes con esteatosis no progresan a esteatohepatitis. Esto sugiere la necesidad de un segundo impacto, una fuente de radicales libres que induzcan el estrés oxidativo (Day & James, 1998). Actualmente, se habla de la hipótesis del múltiple impacto, que recoge la complejidad de la NAFLD donde múltiples y simultáneos factores están implicados en la progresión de la enfermedad (Buzzetti et al., 2016; Cobbina & Akhlaghi, 2017).

2.3.3.3. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la NAFLD

Un diagnóstico y tratamiento precoz de la esteatosis hepática son importantes para prevenir la progresión de la misma, de hecho, se ha observado que los pacientes con NAFLD sin esteatohepatitis no progresan o presentan una progresión muy lenta (Vernon et al., 2011). Puesto que la NAFLD es normalmente asintomática en el momento del diagnóstico, la

determinación del contenido lipídico en el hígado puede ser un reto importante en términos de identificación, tratamiento y control de la progresión de la enfermedad (Lindenmeyer & McCullough, 2018).

En referencia a los métodos diagnósticos disponibles, la biopsia hepática sigue siendo la técnica de referencia en el diagnóstico de la NAFLD ya que es la única capaz de diferenciar entre NAFL y NASH; además de determinar con precisión el grado de fibrosis (Brunt, 2004; Chalasani et al., 2012; Kleiner et al., 2005). En este sentido, para la evaluación de la biopsia hepática, el *NAFLD activity score* (NAS) es un sistema de puntuación histológico que cuantifica el grado de esteatosis, inflamación lobulillar, *ballooning* de los hepatocitos y grado de fibrosis (Kleiner et al., 2005). Sin embargo, como ya se ha comentado, los riesgos asociados a esta y su alto coste (Almpanis et al., 2016), han hecho necesaria la búsqueda de nuevas herramientas de diagnóstico no invasivo.

En este sentido, la técnica de ultrasonido ha sido ampliamente aceptada ya que es una técnica no invasiva, libre de radiación, fácilmente disponible y de bajo coste. Estas técnicas presentan una buena sensibilidad y especificidad en comparación con la histología a la hora de identificar esteatosis moderada y severa. La ecografía abdominal es la más accesible y con menor coste; de hecho, en muchas ocasiones la esteatosis hepática se detecta al realizar esta técnica por otros motivos (Palmentieri et al., 2006; Roldan-Valadez et al., 2008). Con el fin de mejorar la capacidad diagnóstica, se desarrolló el parámetro de atenuación controlada (en inglés *Controlled Attenuation Parameter*, CAP) que usa el ultrasonido en conjunto con elastografía de vibración controlada para medir el grado de atenuación del ultrasonido debido a la presencia de grasa hepática (Sasso et al., 2010).

En lo referente a los test serológicos, además de los comentados anteriormente para el diagnóstico de fibrosis hepática derivada de la NAFLD, existen algoritmos no invasivos para la predicción de esteatosis, es el caso del *Fatty Liver Index* (FLI) (Bedogni et al., 2006) y el *Hepatic Steatosis Index* (HSI) (Lee et al., 2010). En cuanto al diagnóstico de NASH, no existe todavía un algoritmo capaz de diferenciar la presencia de esta entidad, si bien es cierto que se ha desarrollado una técnica de metabolómica realizada a partir del suero de pacientes para el diagnóstico de NASH (Barr et al., 2012; Mayo et al., 2018).

Dado que actualmente no existen tratamientos efectivos para NAFLD, el enfoque terapéutico para esta enfermedad hepática debe ser multidisciplinar, incluyendo acciones para la prevención y regresión del daño hepático y de la fibrosis. Actualmente se basa en cambios en el estilo de vida, la dieta y el ejercicio, así como en tratamientos específicos para la disfunción hepática y sus factores de riesgo como la obesidad, hiperlipidemia y la diabetes (Rinella & Sanyal, 2016).

2.3.4. Proteínas BMP en la enfermedad hepática crónica

Como ya se ha mencionado previamente, uno de los eventos claves en el desarrollo de la fibrosis es la activación de HSC. Estas células activas son la principal fuente de producción de componentes ECM, además de contribuir al inicio del proceso inflamatorio, mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias (Koyama & Brenner, 2017). Se sabe que la activación de las HSC puede ser inducida por diferentes citoquinas, así como por las proteínas BMP o TGF β que, mediante la activación de la ruta de las Smad, inducen la expresión de genes profibrogénicos como el del colágeno (Shen et al., 2003; Zhang et al., 2016).

Varios artículos han descrito la implicación de las proteínas BMP en el desarrollo de la fibrosis. En este sentido, BMP2 y BMP4 fueron inicialmente descritos como inductores de la expresión de α SMA y, por tanto, como desencadenantes de la transdiferenciación de las HSC (Shen et al., 2003). Posteriores modelos experimentales de fibrosis hepática confirmaron el efecto de BMP4, pero no de BMP2, en la activación de las HSC (Fan et al., 2006); de hecho, un estudio posterior describió el papel antifibrogénico que BMP2 podría desempeñar mediante la regulación de la señalización de TGF β (Chung et al., 2018). Asimismo, en un modelo de NASH se observó como la depleción de BMP6 producía un aumento en la fibrosis hepática; por ello, se ha propuesto el efecto antifibrogénico de la señalización de BMP6, ya que es capaz de inhibir la activación de HSC, así como la expresión de genes proinflamatorios y profibrogénicos (Arndt et al., 2015). En relación a BMP7, se han publicado resultados contradictorios respecto al papel que podría desempeñar en el desarrollo de la fibrosis. Se ha observado que la expresión hepática de esta proteína se encuentra inducida en ratas sometidas a un modelo de colestasis (Zhang et al., 2012); asimismo, se ha observado que los niveles circulantes de esta proteína se encuentran elevados en el suero de pacientes con enfermedades hepáticas crónicas en paralelo al grado de fibrosis/cirrosis (Aktug Demir et al., 2014; Chayanupatkul et al., 2009; Tacke et al., 2007; Zoheiry et al., 2015). En este sentido, se ha descrito el efecto profibrogénico de BMP7 sobre HSC activadas, por su capacidad para inducir la síntesis de proteína profibrogénicas tales como el colágeno tipo I y la fibronectina (Tacke et al., 2007). Por el contrario, algunos artículos han mostrado que BMP7 suprime el desarrollo de fibrosis hepática (Hao et al., 2012; Wang et al., 2014). Se ha observado en modelos experimentales que BMP7 atenúa la activación de HSC, ya que actúa como antagonista del efecto de TGF β y reduce la expresión de α SMA en HSC, interrumpiendo la síntesis de componentes de la ECM y la proliferación de hepatocitos inducida por este factor (Kinoshita et al., 2007; Yang et al., 2012; Zhong et al., 2013). Por último, se ha descrito que BMP9 se encuentra inducido en modelos experimentales de fibrosis hepática (Breitkopf-Heinlein et al., 2017). En este sentido, BMP9 juega un papel profibrótico ya que induce la expresión de componentes de la ECM en HSC (Muñoz-Félix et al., 2016) y se ha observado

que la inhibición de su señalización disminuye significativamente la producción de fibras de colágeno y los niveles de α SMA en el hígado (Addante et al., 2018; Breitkopf-Heinlein et al., 2017).

En referencia a la NAFLD, el número de estudios centrados en el papel de las proteínas BMP en esta enfermedad tan prevalente, no es elevado. En este sentido, se ha observado que la expresión de algunas BMP, específicamente BMP6 y BMP8B, se encuentra aumentada en hígados tanto de ratones como de pacientes con NAFLD (Arndt et al., 2015; Vacca et al., 2020). Estos estudios sugieren que las proteínas BMP podrían tener un papel en la fisiopatología de la NAFLD. De hecho, la depleción de BMP6 produjo un aumento de la fibrosis observada en el hígado de ratones sometidos a un modelo de NASH (Arndt et al., 2015). Por otro lado, la depleción de BMP8B redujo la esteatosis inducida por ácidos grasos, mientras que la administración de BMP8B exógeno indujo la acumulación de lípidos en hepatocitos (Mahli et al., 2019). La sobreexpresión de BMP8B en modelos de NAFLD ha sido observada en un segundo estudio, en este caso, de manera dependiente a la gravedad de la enfermedad. En este estudio se propone que la inhibición de esta proteína podría prevenir la progresión de la esteatohepatitis en la NAFLD, ya que se muestra la implicación de BMP8B en la activación de HSC por lo que estaría involucrado en el desarrollo de fibrosis y de respuesta proinflamatoria en la esteatohepatitis (Vacca et al., 2020). En un estudio reciente se desarrolló un modelo murino de NAFLD donde se demostró que la expresión hepática de BMP4 estaba aumentada y que la administración de BMP4 exógeno inhibió la esteatosis hepática y la progresión de la NAFLD (Peng et al., 2019). Además, se ha demostrado que la inhibición farmacológica de la señalización de BMP mediada por ALK3 reduce la esteatosis en ratones obesos (Thayer et al., 2020). Por su parte, la sobreexpresión de BMP9 mostró un efecto beneficioso en la esteatosis hepática en ratones alimentados con dieta alta en grasa mediante la inhibición de la lipogénesis *de novo* en hepatocitos, de manera que se reduce el contenido de triglicéridos hepáticos (Wang et al., 2020; Yang et al., 2019). Por último, la deficiencia de BMP3B, también conocido como GDF10, produjo acumulación hepática de lípidos indicando que esta BMP es un modulador esencial de la homeostasis de lípidos hepática (Platko et al., 2019).

En cuanto al HCC, se ha observado un incremento en los niveles de expresión de BMP4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13 y 15 en tejido hepático tumoral en comparación con tejido normal (Li et al., 2013; Maegdefrau & Bosserhoff, 2012). Además, la inhibición general de la ruta de señalización de estas proteínas mostró una disminución en el comportamiento migratorio e invasivo de las células tumorales (Maegdefrau & Bosserhoff, 2012). En este sentido, BMP9 ha sido propuesto como factor pro-tumoral, ya que es regulador del crecimiento de células tumorales hepáticas, promoviendo su proliferación y supervivencia, así como la transición

epitelio mesénquima y por tanto la capacidad invasiva de estas células tumorales (Herrera et al., 2013).

2.4. Proteínas BMP como biomarcadores

La búsqueda de biomarcadores que permitan un diagnóstico y pronóstico temprano y no invasivo de las enfermedades hepáticas está siendo clave en el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas, ya que, como se ha comentado, la biopsia hepática, sigue siendo la técnica de referencia. En el caso de procesos agudos, establecer un pronóstico correcto es crítico a la hora de tomar decisiones como la necesidad o adecuación de un trasplante hepático (McGill & Jaeschke, 2018). Por otro lado, las CLD suelen ser asintomáticas en sus estadios iniciales y en muchos casos el diagnóstico se realiza en fases avanzadas de las mismas, por lo que, un diagnóstico temprano es de gran importancia para prevenir la progresión de la enfermedad a estadios más avanzados (Lindenmeyer & McCullough, 2018).

Los biomarcadores, moléculas (péptidos, proteínas, fragmentos de material genético) presentes en diferentes fluidos corporales (sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, lágrimas o saliva) derivados de la afectación tisular, pueden ser de utilidad para establecer la gravedad y la evolución de las lesiones en diferentes órganos y patologías. Sin embargo, su uso en la determinación del daño hepático es relativamente reciente, y todavía no hay constancia de su uso para establecer el estadio de la lesión hepática.

Dado que los niveles séricos de algunas proteínas BMP parecen estar regulados en ciertas condiciones patológicas, han sido propuestas como posibles marcadores para el diagnóstico no invasivo. En concordancia con esta hipótesis, se han asociado niveles elevados de algunas de estas proteínas con diferentes enfermedades metabólicas. Por ejemplo, BMP2 se ha asociado a la enfermedad de las arterias coronarias en pacientes con diabetes tipo 2 (Zhang et al., 2015). Además, se ha relacionado BMP4 con aterosclerosis en la carótida de estos pacientes (Son et al., 2011). Por el contrario, varios estudios han asociado BMP9 con el metabolismo de glúcidos y lípidos ya que se ha observado una disminución en la concentración sérica de esta proteína en pacientes con características típicas de síndrome metabólico como resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 o hipertensión arterial (Huang et al., 2018; Luo et al., 2017; Xu et al., 2017). BMP9 también se ha asociado con otras enfermedades como la hipertensión portopulmonar; en este caso, niveles bajos de esta proteína se considera un potencial factor de riesgo (Nikolic et al., 2019).

En cuanto a las enfermedades hepáticas, ya se ha descrito previamente como la expresión en el hígado de varias de estas proteínas se ven moduladas en diferentes patologías

hepáticas. Asimismo, su concentración en suero también se ha visto modulada en algunas de estas patologías; por ejemplo, se ha observado que una disminución de los niveles circulantes de BMP9 y BMP10 se asocia a mayor severidad de la enfermedad en pacientes con cirrosis (Owen et al., 2020). Sin embargo, sólo se ha propuesto a BMP7 como biomarcador de enfermedad hepática. Por un lado, diferentes autores han descrito que los niveles de BMP7 circulante se encuentran aumentados en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas de etiología vírica (Aktug Demir et al., 2014; Zoheiry et al., 2015) o en pacientes con cirrosis (Tacke et al., 2007). Por otro lado, los niveles séricos de esta proteína se encontraron disminuidos en pacientes con cáncer hepático (Wang et al., 2018).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) son factores de crecimiento solubles que ejercen efectos pleiotrópicos en varios tejidos regulando diferentes procesos fisiológicos de la homeostasis celular. Además, defectos en su expresión y señalización se han asociado con ciertas patologías y algunas de estas proteínas han sido propuestas como potenciales biomarcadores de diferentes enfermedades.

Teniendo en cuenta que actualmente las herramientas diagnósticas y pronósticas, así como los enfoques terapéuticos de las patologías hepáticas, que cursen de manera aguda o crónica, son limitados, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido dilucidar la implicación de las proteínas BMP en la fisiopatología hepática. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar los efectos derivados de la inhibición de la señalización de las proteínas BMP en la progresión del fallo hepático agudo inducido por paracetamol.
2. Analizar el perfil de expresión tanto hepática como circulante de la proteína BMP6 en un modelo experimental de fallo hepático agudo inducido por paracetamol y en pacientes con sobredosis de APAP, y estudiar su contribución en los procesos moleculares involucrados en este tipo de daño.
3. Caracterizar el perfil de expresión tanto hepática como circulante de diferentes proteínas BMP (BMP2 y BMP8A) en modelos experimentales de enfermedades hepáticas crónicas y en cohortes de pacientes con dichas patologías.
4. Evaluar el potencial de BMP2 y BMP8A como biomarcadores séricos de enfermedades hepáticas crónicas y desarrollar nuevos algoritmos para el diagnóstico no invasivo de dichas patologías.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTUDIO CLÍNICO

1.1. Colección de muestras de pacientes con NAFLD

Para la realización de esta Tesis Doctoral se realizó un estudio observacional de corte transversal donde se utilizaron muestras biológicas (biopsia hepática y suero) pertenecientes a la colección de muestras (número de referencia C.0002717) cedidas amablemente por su responsable, el Dr. Carmelo García Monzón del Hospital Universitario Santa Cristina (Madrid, España); asimismo se utilizaron muestras biológicas procedentes de pacientes reclutados en el Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, España). Este estudio se llevó a cabo de acuerdo a la Declaración de Helsinki, y a las leyes locales y nacionales. Las muestras se obtuvieron tras la firma de un consentimiento informado específico aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica institucional del Hospital Universitario Santa Cristina (referencia, PI-688A) y del Hospital Universitario Virgen del Rocío (referencia, C.I. 0359-N-15). Estas cohortes de pacientes con NAFLD han sido validadas y acreditadas (Ampuero et al., 2020; García-Monzón et al., 2015). Asimismo, se incluyeron sujetos con hígado histológicamente normal (HN), que acudieron al Hospital Universitario Santa Cristina para la realización de una colecistectomía laparoscópica programada y accedieron, mediante la firma de un consentimiento informado por escrito, a que se les practicara una biopsia hepática percutánea durante la intervención quirúrgica.

Criterios de inclusión:

- Edad entre 18 y 75 años.
- Ausencia de un consumo significativo de alcohol (hombres < 20 gramos al día y mujeres < 10 gramos al día), según la evaluación de un detallado interrogatorio a los pacientes y familiares.
- Ausencia de tratamiento con fármacos potencialmente hepatotóxicos.
- Sin evidencia analítica de sobrecarga de hierro.
- Seronegativo para autoanticuerpos y para Hepatitis B y C y VIH.
- Signos histológicos de esteatosis simple o esteatohepatitis según criterios internacionalmente aceptados (Kleiner et al., 2005). Se incluyeron también pacientes con una biopsia hepática histológicamente normal, los cuales se consideraron como grupo control.
- Firma previa de un consentimiento informado por escrito aprobado por el comité ético de investigación clínica institucional.

Materiales y Métodos

De todos ellos se registraron diferentes variables demográficas (edad, sexo y raza) y antropométricas (talla, peso, índice de masa corporal, y perímetro de cintura y cadera); así como variables bioquímicas (glucosa, creatinina, insulina, colesterol (LDL, HDL y VLDL), triglicéridos y enzimas hepáticas).

Además, se calcularon índices predictivos de diagnóstico no invasivo tales como APRI, a partir de las transaminasas GPT y GOT y el recuento de plaquetas; y FIB4, que tienen en cuenta, además de estas variables, la edad, como se ha descrito previamente (Lin et al., 2011; McPherson et al., 2010; Sterling et al., 2006).

En el momento de la biopsia se recogieron muestras de sangre y el suero fue alicuotado y correctamente almacenado en congeladores a -80°C . Los sueros de los pacientes junto con las correspondientes biopsias hepáticas se utilizaron para determinar la concentración hepática y circulante de diferentes proteínas BMP.

1.2. Colección de muestras de pacientes con sobredosis de APAP

Se utilizaron muestras de suero humano amablemente cedidas por el Profesor James Dear perteneciente al Queen's Medical Research Institute (Universidad de Edimburgo, UK). En esta cohorte se incluyeron 20 pacientes con sobredosis de APAP, de los cuales 10 desarrollaron DILI con valores de GPT en suero superiores a 100 U/L (GPT 4787 ± 2989) y 10 pacientes que no desarrollaron DILI, reflejado en valores normales de GPT en suero (GPT $18,70 \pm 10,58$).

Los sueros de estos pacientes se utilizaron para cuantificar la concentración circulante de BMP6.

2. MODELOS ANIMALES

La experimentación animal de esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo siguiendo la legislación española y europea. Se utilizaron ratones machos C57BL/6J establecidos en las instalaciones del animalario de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) o de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Los ratones se mantuvieron a temperatura ambiente (22°C) y humedad controlada, con ciclos de luz y oscuridad (12h luz/12h oscuridad). Fueron alimentados con dieta normal (en inglés *standard chow diet*, CHD) *ad libitum* y tenían libre acceso a agua.

En todos los modelos descritos a continuación, se utilizaron entre 6 y 7 ratones por cada condición experimental. Una vez obtenidas las muestras de los diferentes modelos, una parte del hígado se fijó con paraformaldehído al 4% (PFA 4%) para la realización de análisis histológicos y el resto se congeló a -80°C para posteriores análisis. La sangre se recogió en un tubo eppendorf con EDTA a 0,5 M pH8 para evitar la coagulación. Posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 10.000 rpm, se transfirió el suero a un nuevo tubo eppendorf y se congeló a -80°C .

2.1. Modelo experimental de fallo hepático agudo inducido por paracetamol

Como se ha explicado en la introducción, una de las principales causas de ALF es el DILI, siendo el APAP uno de los fármacos que más comúnmente producen este tipo de daño. La finalidad de este ensayo *in vivo* es realizar un modelo murino de ALF mediante la administración de una dosis de APAP superior a la terapéutica.

Para la realización de este modelo, ratones machos de dos meses de edad sometidos a un ayuno de 12h se pesaron para ajustar en cada caso la dosis de APAP que se debe administrar, siendo esta de entre 300 y 500 mg/kg. Para la dosis de 300 mg/kg se llevó a cabo el protocolo previamente descrito (Rada et al., 2018), el APAP (A7085 Merck Life Science, Darmstadt, Alemania) se administró disuelto en suero fisiológico estéril por vía intraperitoneal (i.p.), mientras que al grupo control se le administró únicamente suero fisiológico. Para facilitar la disolución, se calentó a 55°C y se agitó vigorosamente con vortex. En el caso de la dosis de 500 mg/kg se llevó a cabo el protocolo previamente descrito (Ye et al., 2022), puesto que se trata de una dosis alta que dificulta la disolución del fármaco en suero fisiológico, el APAP se disolvió primero en dimetilsulfóxido (DMSO) (D2650, Merck Life Science) y a continuación se añadió suero fisiológico para obtener una concentración final de 75 mg/ml con $<1\%$ de DMSO. Para facilitar la disolución, se calentó a 45°C durante 1 hora en agitación. Una vez disuelto se administró por vía i.p. A los animales control se les administró una dosis equivalente de DMSO. En ambos casos, se realizó un control visual periódico de los animales desde la administración del APAP hasta la finalización del ensayo, así como un control de la temperatura corporal para determinar la aparición de hipotermia. Tras 2, 6 y 24 horas de la administración, los ratones fueron sacrificados junto a sus respectivos controles y se recogieron la sangre y los hígados para futuros análisis.

2.1.1. Administración del compuesto DMH2 en ratones sometidos a un modelo experimental de ALF inducido por APAP

El compuesto DMH2 (5580, Tocris Bioscience, Minneapolis, USA), un inhibidor específico de receptores de BMP tipo I que presenta mayor afinidad por el receptor ALK3 ($K_i=5,4$ nM) (Tsugawa et al., 2014), se administró a los ratones por vía i.p. a una concentración de 3 mg/kg una hora después de la administración del APAP. El compuesto se disolvió en DMSO a una concentración de 20 mM (9,1 mg/ml) y a continuación se diluyó en PBS a una concentración de 0,3 mg/ml (DMSO 3,3%). Los animales control recibieron una dosis equivalente de DMSO.

2.2. Modelo experimental de fibrosis hepática

Como se comenta en la introducción, la fibrosis hepática avanzada es el principal factor de riesgo asociada a la mortalidad y morbilidad en pacientes con CLD, por tanto, una correcta evaluación del grado de fibrosis en estos pacientes es esencial para establecer un correcto pronóstico de la enfermedad. Para poder estudiar los mecanismos moleculares implicados en el establecimiento y la progresión de la fibrosis, se analizaron las muestras (hígado y suero) procedentes de modelos experimentales que reproducen la fibrosis hepática *in vivo*, realizados previamente en el laboratorio.

2.2.1. Modelo experimental de fibrosis hepática por toxicidad con CCl₄

El modelo de fibrosis hepática derivada de la toxicidad por CCl₄ es uno de los modelos experimentales más utilizados para estudiar este proceso patológico (Ravichandra & Schwabe, 2021). Para llevarlo a cabo, se administró a los ratones CCl₄ (T-4009, Merck Life Science) disuelto en aceite de oliva (1:4, 1,6 mg/kg) por vía i.p. 2 veces por semana durante 6 semanas. A los animales control se les administró una cantidad equivalente del vehículo. Después de 6 semanas de tratamiento, los animales se sacrificaron junto a sus respectivos controles y se recogieron la sangre y los hígados para futuros análisis.

2.2.2. Modelo experimental de fibrosis hepática derivada de enfermedad colestásica

En el hígado, la obstrucción experimental del sistema biliar (ligadura del ducto biliar, en inglés *bile duct ligation*, BDL) inicia una compleja cascada de eventos fisiopatológicos que conduce a la colestasis e inflamación y que terminará con el desarrollo de fibrosis hepática que puede detectarse a los 28 días de la operación.

Para ello, los ratones anestesiados se sometieron a BDL que consiste en el aislamiento del ducto biliar, la doble ligación del mismo con seda trenzada 4/0 y la sección del ducto entre ambas ligaduras, como se ha descrito previamente (Villar-Lorenzo et al., 2019). Por último, se realiza la sutura de la capa muscular y cutánea y se mantiene al animal a 37°C con el objetivo de que se mantenga la temperatura corporal. Los animales control (Sham) se sometieron igualmente a la operación donde el ducto biliar fue expuesto, pero no ligado. Los animales se sacrificaron 28 días después de la operación junto a sus respectivos controles y se recogieron la sangre y los hígados para futuros análisis.

2.3. Modelo experimental de NAFLD

La NAFLD es la principal causa de CLD a nivel global, como se describe en la introducción de esta Tesis Doctoral. Para intentar reproducir esta enfermedad *in vivo* se llevó a cabo un modelo murino de NAFLD inducida por dieta.

Para ello, se alimentó a ratones machos de dos meses de edad, con una dieta con alto contenido en grasa (en inglés *high fat diet*, HFD) con un 45 o 60% de grasa (D12451 y D12492, respectivamente, Research Diets, Inc. New Brunswick, NJ, Estados Unidos) *ad libitum* durante 16 semanas. Los animales control fueron alimentados con la dieta estándar (en inglés *chow diet*, CHD). Durante este periodo de tiempo los ratones se pesaron dos veces por semana para calcular la variación de peso de los mismos. Tras 16 semanas de dieta, los ratones fueron sacrificados y se recogieron la sangre y los hígados para futuros análisis.

3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL TEJIDO HEPÁTICO

Las muestras de tejido se fijaron en PFA 4% durante 24 horas. Posteriormente se colocaron en casetes de histología correctamente identificados y se procesaron en un procesador de tejidos que deshidrata el tejido y favorece la infiltración de parafina, de este modo el tejido se

Materiales y Métodos

endurece lo cual facilita el corte del mismo. A continuación, los tejidos procesados se incluyeron en bloques de parafina y se cortaron con un microtomo de rotación en secciones uniformes de aproximadamente 5 μm . Los cortes realizados se sometieron a un proceso de desparafinación y rehidratación, previo a cualquier protocolo de tinción con medios acuosos para permitir la correcta tinción del tejido. Para ello, los cortes se lavaron con xileno para eliminar los restos de parafina y a continuación se hidrataron mediante la exposición a un gradiente de alcoholes de mayor a menor concentración que permite una hidratación progresiva de la muestra evitando así la rotura del tejido por osmolaridad.

3.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E)

La tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E) permite diferenciar las zonas ácidas y básicas de la célula tiñéndolas de distinto color. Para la realización de esta tinción, el tejido se puso en contacto en primer lugar con la hematoxilina que es un colorante básico (catiónico) capaz de teñir estructuras ácidas en azul. A continuación, el tejido se lavó con agua y fue transferido a alcohol al 80% ya que la eosina tiene base alcohólica. Este segundo colorante tiene la capacidad de teñir componentes básicos en rosa gracias a su naturaleza ácida (aniónico). Las tinciones con H&E se realizaron en el servicio de anatomía patológica del Hospital Universitario Santa Cristina con hematoxilina de Harris y eosina alcohólica.

3.2. Tinción con Rojo Sirio

El rojo sirio es un colorante que tiñe las fibras de colágeno I y III en rojo, mientras que el resto de componentes se tiñen de un color amarillo débil gracias al ácido pícrico. Pese a no ser una tinción específica de fibrosis, permite detectar las fibras de colágeno depositadas como consecuencia del proceso fibrogénico. Los cortes de tejido se tiñeron con Hematoxilina Weigert (se prepara con una solución de Hematoxilina (H3136, Merck Life Science) en etanol 100% y una solución de cloruro férrico (157740, Merck Life Science) en agua bidestilada y HCl 10%). A continuación, se lavaron con agua corriente durante 10 minutos y se realizó la tinción con Rojo Sirio con el reactivo Direct Red 80 (365548, Merck Life Science) diluido en una solución acuosa de ácido pícrico 1,3% (p6744-1GA, Merck Life Science) durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, el tejido se lavó con agua acidificada (agua destilada con ácido acético al 5%).

3.3. Ensayo de apoptosis TUNEL

Para detectar la muerte celular en el tejido hepático, se utilizó el ensayo TUNEL que tiñe en tono marrón las células con fragmentación del ADN. Para ello, se utilizó el kit de detección ApopTag Peroxidase *In Situ* Apoptosis (S7100, Merck Millipore, Inc., Massachusetts, Estados Unidos) siguiendo las indicaciones del manual de instrucciones.

Una vez realizada cualquiera de las técnicas descritas anteriormente, los cortes histológicos fueron sometidos a un proceso de deshidratación del tejido mediante la exposición a un gradiente de alcoholes, en este caso de menor a mayor concentración, y posteriormente se sumergieron en xileno. Finalmente se procedió al montaje de las muestras utilizando el medio de montaje DPX (Eukitt Quick-hardening mounting médium, 03989 Merck Life Science).

3.4. Evaluación histológica de las muestras hepáticas

Los cortes histológicos sometidos a las tinciones H&E y Rojo Sirio fueron examinados en ciego por un patólogo experto (Dr. Carmelo García-Monzón del Hospital Universitario Santa Cristina, Madrid). En el caso de los animales sometidos al modelo murino de NAFLD, se determinó el *NAFLD activity score* (NAS score) de las muestras teñidas con H&E en función del grado de esteatosis, la inflamación lobular/lobulillar y la presencia o ausencia de degeneración hepatocitaria o *ballooning* (Kleiner et al., 2005). El grado de fibrosis se determinó a partir de las muestras teñidas con Rojo Sirio según la presencia o ausencia de fibrosis perisinusoidal, portal o periportal clasificándola en cuatro fases siendo la fase 0 (F0) ausencia de fibrosis y la fase 4 (F4) cirrosis (Brunt et al., 1999).

Asimismo, se tomaron imágenes de los cortes hepáticos con un microscopio óptico Nikon modelo Eclipse E400 equipado con objetivos plan acromáticos 10X, 20X y 40X (Nikon). Se cuantificó el grado de fibrosis en los modelos animales de fibrosis hepática utilizando la tinción Rojo Sirio y en los modelos de daño hepático inducido por APAP se determinó el área de necrosis y la fragmentación de ADN en las tinciones H&E y TUNEL, respectivamente. Para ello, se utilizó el software ImageJ (NIH) y se obtuvo el valor medio mediante la cuantificación de seis áreas lobulares diferentes. Los datos se presentan como unidades arbitrarias (u.a.).

4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS TRANSAMINASAS GPT Y GOT

Las enzimas GPT y GOT se encuentran principalmente en hígado y suero, y en situaciones de daño hepatocelular su nivel de concentración se eleva, por lo que se suelen utilizar como marcadores de daño hepático.

Para la realización de este ensayo se utilizaron los kits ALT Activity Assay y AST Activity Assay (MAK052 y MAK055, Merck Life Science) que se basan en la determinación de la actividad de GPT y GOT respectivamente, mediante una reacción colorimétrica. El ensayo se realizó siguiendo el protocolo del kit. Las diluciones empleadas para medir la actividad de estas enzimas en suero de ratón fueron: 1:4 en un volumen final de 20 μ l para el ensayo de GPT y 1:5 en un volumen final de 50 μ l para el ensayo de GOT.

5. CULTIVOS CELULARES

5.1. Mantenimiento de las líneas celulares

Para la realización de esta Tesis Doctoral se utilizaron las siguientes líneas celulares: la línea de hepatocitos humanos derivada de hepatocarcinoma Huh7 (ATCC), la línea de hepatocitos neonatales inmortalizados de ratón WTiib (Pardo et al., 2015), la línea de HSC humanas LX2 que fue generosamente proporcionada por el laboratorio de la Dra. Paloma Martínez-Sanz (IIBm, CSIC) y la línea de macrófagos humanos derivada de monocitos de leucemia THP1 que fue generosamente proporcionada por el laboratorio de la Dra. Elena Fernández-Ruiz.

Las líneas celulares Huh7 y Wtiib se mantuvieron en medio de cultivo Dulbecco's High Glucose Modified Eagles Medium (DMEM) con alto contenido en glucosa (SH30022.01, Cytiva HyClone, Estados Unidos) enriquecido con Hepes 0,02M (BE17-737E, Lonza), antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) 100 μ g/ml (A2213, Merck Millipore) y suero fetal bovino (FBS) (SV30106.03 Cytiva HyClone) inactivado por calor al 10%. La línea celular LX2 se mantuvo en medio de cultivo preparado con un 50% de DMEM con alto contenido en glucosa y un 50% de DMEM sin glutamina (10938-025, Gibco), suplementado con Hepes 0,02M, antibiótico 100 μ g/ml y FBS al 2%. Por último, la línea THP1 se mantuvo en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640, RPMI 1640, Gibco) suplementado con antibiótico 100 μ g/ml y FBS al 10%.

Estos cultivos celulares se mantuvieron a 37°C, 5% CO₂ y humedad relativa del 95%. Una vez alcanzada la confluencia adecuada de células, se realizó la división en diferentes placas en ratios 1:3 a 1:6 mediante tripsinización, aplicando tripsina-EDTA 0,05% (25300-062, Gibco) a las placas previamente lavadas con PBS y recogiendo las células en DMEM suplementado con FBS al 10%; con excepción de la línea THP1 que se mantuvo en suspensión.

Para la realización de ensayos *in vitro* las células se sembraron en placas multi pocillo (Corning Incorporated, Kennebunk, Estados Unidos) de diferentes tamaños. Se realizó el recuento de células en una Cámara de Neubauer y se sembró el número adecuado de células en función del tamaño de pocillo.

5.2. Procedimientos experimentales con las líneas celulares

5.2.1. Silenciamiento génico de ALK2 y ALK3 en la línea celular Huh7 mediante infección lentiviral

Se generaron líneas estables en las que se silenció la expresión de los genes *ALK2* o *ALK3* a partir de la línea celular Huh7. Para ello, se utilizaron vectores lentivirales shRNA (shALK2 o shALK3) dirigidos frente a 5 secuencias diana diferentes de cada gen (SHALK3-NM_004329.2, SHALK2-NM_001105.2 MISSION® shRNA Plasmid DNA, Merck Life Science), obteniendo 10 líneas celulares entre las que se podía asegurar el mayor grado de silenciamiento de *ALK2* o *ALK3*. Además, los vectores lentivirales portaron el gen de resistencia a la puromicina necesario para seleccionar las células infectadas. Para las células control (shControl) se empleó el vector lentiviral (MISSION® pLKO.1-puro Empty Vector Control Plasmid DNA, Merck Life Science) que de igual manera portaba el gen de resistencia a puromicina.

Para la generación de las partículas lentivirales, se transfectó la línea celular HEK-293T sembradas al 50% de confluencia en una placa de 6 pocillos. La transfección se realizó con 0,9 µg de cada vector lentiviral y 0,57 µg de cada uno de los vectores de empaquetamiento: pCMV8.9 y pMD2.G, junto con el agente de transfección XtremeGene (06366236001, Roche Diagnostics Inc. Mannheim, Alemania) a una proporción de 3 volúmenes de XtremeGene por µg de ADN y se completó con DMEM sin suero hasta un volumen final de 1,5 ml. Tras 16 horas, se recogió el sobrenadante de las células HEK-293T que contenía las partículas lentivirales, filtrándolo dos veces con filtros de 0,45 µm y se transfirió en una dilución 1:10 en DMEM suplementado al 10% de FBS y 6 µg/ml de polibreno (Polybrene®, sc-134220 Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Alemania) sobre las células Huh7 sembradas en placa de 60 mm de diámetro a una confluencia del 60%. El polibreno facilita la infección de las

células Huh7 por las partículas lentivirales, ya que actúa neutralizando la repulsión de carga entre los viriones y la superficie celular. Este procedimiento se repitió durante 3 días consecutivos. Tras la última infección, las células Huh7 infectadas se seleccionaron con puromicina (Santa Cruz Biotechnology Inc.) utilizando para ello dosis de 2-10 µg/ml. Finalmente, cuando no se observó muerte celular y se alcanzó la confluencia, las células infectadas se amplificaron a placas de mayor tamaño y se procedió a su utilización en diferentes ensayos o bien a su almacenamiento mediante crioconservación. Para conocer la eficiencia del silenciamiento se realizó un análisis de los niveles de ARNm de *ALK2* y *ALK3* mediante RT-qPCR.

5.2.2. Sobreexpresión de ALK2 en la línea celular Huh7 mediante infección lentiviral

A partir de la línea celular Huh7, se generó una línea estable que sobreexpresa el gen *ALK2*. Para ello se siguió el protocolo de infección con lentivirus descrito anteriormente utilizando el vector lentiviral ALK2 (LV ALK2) (112920610395 ACVR1 (ALK2) Lentiviral Vector Human CMV, Applied Biological Materials Inc. Richmond, BC, Canada) y su correspondiente control (LV Control) (LV590 pLenti-CMV-GFP-2A-Puro-Blank Vector, Applied Biological Materials Inc.). Para la transfección se utilizaron 0,33 µg del vector lentiviral ALK2 o Control junto con los vectores de empaquetamiento: PLP1 (0,13 µg), PLP2 (0,09 µg) y GVSG (0,11 µg). Se siguió el protocolo de infección descrito anteriormente. La eficacia de la infección se cuantificó midiendo los niveles de ARNm de *ALK2* mediante RT-qPCR.

5.2.3. Silenciamiento transitorio de BMP6 en la línea celular Huh7

La línea celular Huh7 se transfectó con un ARN de interferencia (siRNA) para el gen *BMP6* (siBMP6) o su control (siControl) (siGENOME SMARTpool Human BMP6 M021475-03-0005, siGENOME™ Control Pool Non-Targeting #1 D-001206-13-20, Dharmacon™ Inc. Colorado, USA). Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos a una confluencia del 60% en el momento de la transfección. Los siRNA se utilizaron a una concentración final de 10 nM junto con el agente de transfección DharmaFECT 1 (T-2001-03 Dharmacon™ Inc.) a una dilución 1:1000. La mezcla de siRNA y DharmaFECT 1 se preparó en medio sin suero ni antibiótico, posteriormente la transfección se realizó en medio suplementado al 10% de FBS sin antibiótico durante 36 horas. La eficacia de la transfección se cuantificó midiendo el nivel de ARNm de *BMP6*.

5.2.4. Protocolo de muerte celular con APAP

Las células WTiib y Huh7, así como las líneas generadas a partir de ella se estimularon con APAP (A7085 Merck Life Science) a concentraciones de 1 mM y 5 mM o 10 mM y 20 mM, respectivamente, a diferentes tiempos. El APAP se resuspendió en etanol para obtener un stock 1 M, a partir del cual se hicieron las diluciones convenientes en medio DMEM sin suero para obtener las concentraciones finales indicadas. Las células control se indujeron con etanol diluido en DMEM sin suero. Finalmente, se retiró el medio, las placas se lavaron con PBS 1X y se realizaron análisis posteriores descritos más adelante.

5.2.5. Tratamiento con inhibidores farmacológicos de los receptores de BMP tipo I

Para la realización de determinados ensayos *in vitro* el protocolo de muerte celular con APAP se llevó a cabo en presencia de inhibidores farmacológicos de los receptores de BMP tipo I ALK2 y ALK3. Se utilizaron los inhibidores farmacológicos LDN-193189, DMH2 y ML347 (SML-0559, Merck Life Science; 5580 y 4945, Tocris Bioscience, respectivamente). La afinidad de cada inhibidor por los receptores, la concentración de trabajo, así como el vehículo utilizado en cada caso están recogidos en la Tabla 1 (Tsugawa et al., 2014). Para la realización del ensayo, se realizó un pre o post tratamiento de 1 hora y la estimulación con APAP, como se ha indicado anteriormente, en DMEM sin suero.

Tabla 1. Inhibidores farmacológicos de los receptores de BMP tipo I ALK2 y ALK3.

	Ki ALK2 (nM)	Ki ALK3 (nM)	Concentración	Vehículo
LDN-193189	5	30	500 nM	-
DMH2	43	5.4	10 µM	DMSO
ML347	32	>200 veces	150 nM	DMSO

5.2.6. Activación de macrófagos y tratamiento con la proteína recombinante BMP6

Para el tratamiento con BMP6, la línea THP1 se sometió a una privación de suero de 3 horas antes de la estimulación con 10 o 100 ng/ml de la proteína recombinante humana de

Materiales y Métodos

BMP6 (507-BP/CF, R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA) durante 24 horas. Asimismo, como control positivo esta línea se trató con LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ en las mismas condiciones.

5.2.7. Activación de células estrelladas hepáticas y tratamiento de células Huh7 con TGF β

Por otro lado, para conseguir la activación de las HSC, se retiró el suero de la línea LX2 durante 2 horas y posteriormente se estimuló con TGF β a 10 ng/ml durante 24 horas. Asimismo, la línea Huh7 se estimuló con TGF β a 10 ng/ml durante 24 horas.

5.2.8. Protocolo esteatogénico con ácidos grasos

Para inducir la acumulación de grasa en los hepatocitos, la línea celular Huh7 se estimuló con ácido palmítico a 750 μM (AP750) durante 24 horas. El ácido palmítico se diluyó en DMEM sin suero y suplementado al 1% de BSA (albúmina sérica bovina) libre de ácidos grasos (10735086001 Roche Diagnostics), que actúa como transportador de los ácidos grasos, hasta obtener la concentración adecuada. Las células utilizadas como control se trataron con isopropanol, el vehículo en el que se disuelve el AP (concentración stock 80 mM), en DMEM sin suero al 1% de BSA.

5.3. Análisis de hepatotoxicidad

5.3.1. Tinción con DAPI

El marcador fluorescente 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) es un agente que se une al ADN bicatenario permitiendo la tinción de núcleos celulares. Mediante esta técnica es posible la determinación de la presencia de núcleos apoptóticos.

Los hepatocitos se sembraron en cubreobjetos de 12 mm y se trataron con APAP como se ha descrito anteriormente. Tras el tratamiento, se retiró el medio de cultivo, se realizaron lavados con PBS y las células se permeabilizaron y fijaron con metanol durante 10 minutos. Se utilizó la sonda DAPI (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Estados Unidos) en proporción 1:1000 durante 5 minutos y finalmente se realizó el montaje sobre un portaobjetos utilizando el medio de montaje Fluoromont G® (BioNova científica, Madrid, España). Se tomaron imágenes representativas utilizando el microscopio óptico Nikon Eclipse E400 (Nikon, Tokio, Japón) equipado con el objetivo plan acromático 40X (Nikon). La presencia de núcleos

apoptóticos, fácilmente identificables por ser más brillantes y de menor tamaño, se determinó utilizando el software ImageJ.

5.3.2. Medida de la viabilidad celular por cristal violeta

Cuando se produce la muerte de células en cultivo, estas pierden la capacidad de adherirse a la placa. La tinción por cristal violeta es una manera indirecta de medir la muerte celular, ya que las células teñidas que se detectan mediante análisis colorimétrico son aquellas que permanecen adheridas a la placa, es decir, las células vivas.

Para ello, se cubrieron los pocillos con cristal violeta 0,2% diluido en etanol al 2% durante 30 minutos. A continuación, se retiró el colorante y se realizaron lavados sucesivos con agua destilada hasta eliminar el exceso de cristal violeta y se dejó secar la placa. Una vez seca, se añadió a la placa sodio dodecilsulfato (SDS) al 1%, que lisa las células liberando el colorante, el cual se resuspendió con una pipeta para eliminar posibles aglomeraciones. En una placa de 96 pocillos de fondo plano se añadieron 50 μ L de lisado celular por duplicado y se diluyeron con agua destilada (dilución 1:4). Por último, se midió la densidad óptica en el espectrofotómetro Spectra MR (29010, Dynex Technologies, Chantilly, VA, EEUU) a 560 nm.

5.3.3. Ensayo de citotoxicidad por liberación de LDH

Para cuantificar la necrosis se midió la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) presente en el medio de cultivo celular. Este ensayo tiene su fundamento en que cuando se produce la muerte celular por necrosis, se libera LDH al medio de cultivo por lo que a mayor muerte celular mayor liberación de LDH. El ensayo se realizó con el kit Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} LDH (0474492600, Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, tras el tratamiento correspondiente, se recogió el sobrenadante celular y se transfirió a una placa de 96 pocillos, a continuación, se añadió la mezcla de reacción y se mantuvo en oscuridad a 37°C durante 20 minutos. Finalmente, se paró la reacción y se midió la absorbancia (A) a 450 nm. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como porcentaje de citotoxicidad (%) = $((A \text{ muestra} - A \text{ Control}) / (A \text{ Control positivo} - A \text{ Control})) \times 100$; siendo el 100% (Control positivo) la actividad de LDH obtenida al lisar completamente las células con Tritón X-100.

5.4. Cuantificación de estrés oxidativo mediante fluorescencia en placa

Para medir el estrés oxidativo producido en las células, se utilizó dihidroetidio (DHE, 2140299, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.) como sonda fluorescente para detectar la producción de superóxido intracelular. Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos negra que presentan fluorescencia de fondo mínima, a una densidad de 2×10^4 células/pocillo. A continuación, se añadió la sonda DHE a $10 \mu\text{M}$ en medio HBSS suplementado con glucosa (4,5 g/L) y glutamina (4 mM). Aproximadamente 30 minutos después de añadir la sonda se añadió a los pocillos APAP a 20 mM o su vehículo y se midió la producción de ROS en un lector de placas de fluorescencia (CLARIOstar^{Plus} BMG Labtech, Alemania) durante 2 horas utilizando los pares de filtros 488/550-580 (excitación/emisión). Para normalizar el número de células se utilizó tinción con DAPI (358/455-465). Cada condición se replicó por triplicado y se utilizó Antimicina A ($10 \mu\text{M}$) como control positivo, un antibiótico que inhibe el complejo III mitocondrial lo cual genera la producción de ROS.

5.5. Detección del contenido lipídico intracelular mediante tinción con Oil Red O (ORO)

Para la detección del contenido lipídico intracelular, las células se sembraron en un cubreobjetos de 12 mm y se trataron con ácido palmítico como se describe anteriormente. A continuación, las células se lavaron con PBS y se tiñeron con Oil Red O (ORO, Merk Millipore) a una concentración del 60% en isopropanol y se contratiñeron con Hematoxilina. Una vez realizada la tinción, se tomaron imágenes utilizando un microscopio óptico Nikon Eclipse E400 (Nikon, Tokio, Japón) con un objetivo plan acromático 20x (Nikon). Finalmente, la presencia de lípidos se cuantificó utilizando el software ImageJ.

6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

6.1. Análisis de la expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica

Una vez realizado el proceso de desparafinar y rehidratar, el tejido se pretrató utilizando el método de desenmascaramiento de antígeno por calor (HIER). Para ello, se sumergieron las muestras en citrato sódico 10 mM pH 6 y se calentó en baño María durante 15 o 20 minutos. El tejido se permeabilizó con Tritón-100 al 1% en tampón fosfato (PBS) durante 5 minutos y se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 15

minutos y posteriormente con suero de cabra al 10% en PBS-T (0,1% Tritón X-100 en PBS) al 5% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se incubó el tejido con el anticuerpo primario anti-BMP6 diluido 1:100 o anti-4HNE 1:50 (ab155963 y ab46545, respectivamente, Abcam plc, Cambridge, UK) en PBS-T al 1% de BSA durante toda la noche en cámara húmeda para evitar su evaporación. Pasado este tiempo, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario: anticuerpo de cabra dirigido contra las inmunoglobulinas de ratón y conjugado con peroxidasa de rábano (PI-1000-1, Vector Laboratories, Inc. Newark, CA, Estados Unidos) diluido 1:200 en PBS durante una hora a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Para amplificar la señal se aplicó el kit ABC durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y posteriormente se incubó con el sistema de detección DAB (EnVision™ Flex Mini Kit, High pH (Link) (Agilent, Santa Clara, CA, USA) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, el tejido se contratiñó con Hematoxilina de Harris, se deshidrató y se montó con un cubreobjetos.

Para el análisis histológico, se tomaron imágenes de los cortes hepáticos con un microscopio óptico Nikon modelo Eclipse E400 equipado con objetivos plan acromáticos 10X, 20X y 40X (Nikon). Se midió la intensidad de la tinción utilizando el software ImageJ (NIH) y se obtuvo el valor medio mediante la cuantificación de seis áreas diferentes. Los datos se presentan como unidades arbitrarias (u.a.).

6.2. Inmunodetección de proteínas mediante ELISA

La detección de proteínas BMP en muestras de suero procedentes de pacientes y animales, así como en el sobrenadante de cultivos celulares se realizó mediante inmunoensayo cuantitativo de tipo ELISA sándwich. Para ello, las muestras de suero o sobrenadante celular convenientemente almacenadas a -80°C se descongelaron en hielo y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. Los kits utilizados para este propósito fueron: mouse BMP6 ELISA kit (CSB-E09279m, Cusabio Technology LLC, Hubei, China) y mouse BMP8A ELISA kit (MBS7205421, MyBioSource Inc., San Diego, CA, USA) para muestras de suero de ratón y human BMP6 ELISA kit (CSB-E09277h), human BMP2 ELISA kit (CSB-E04507h) y human BMP8A ELISA kit (CSB-EL002745HU, Cusabio Technology LLC) para muestras de suero de pacientes y muestras de sobrenadante celular. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se midió la señal colorimétrica a 450nm con corrección a 540nm.

6.3. Inmunodetección de proteínas mediante Western-Blot

6.3.1. Obtención de extractos de proteínas de sobrenadante celular

Una vez realizado el ensayo correspondiente, se recogió el sobrenadante de las células y se centrifugó a 4600 rpm durante 5 minutos para eliminar las células muertas en suspensión. Después, se añadió ácido tricloroacético (TCA; 0,85 g/ml) en proporción 1:2 respecto al volumen de muestra y se incubó a 4°C durante 3-4 horas. Pasado este tiempo se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos y se realizaron 2 lavados del precipitado con acetona fría, centrifugando entre cada lavado. El pellet se secó a 95°C durante 5 minutos para eliminar los posibles restos de acetona y se resuspendió en el tampón de carga (Laemmli Buffer: 100 mM Tris pH 7,6, 10% (v/v) Glicerol, 6% (p/v) SDS, 0,2% (p/v) Azul de bromofenol, 2 mM β mercaptoetanol).

6.3.2. Obtención de extractos de proteínas totales de células

Una vez finalizado el ensayo, se realizaron dos lavados de los pocillos con PBS y con ayuda de un rascador se lisaron con tampón de lisis de células (RIPA: 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 120 mM Pirofosfato sódico, 50 mM NaF, 100 μ M Na_3VO_4 , 1% Tritón X-100, 1 mM PMSF). Este proceso se realizó en hielo para evitar la degradación de las proteínas. El lisado celular se agitó con vortex y se incubó en hielo entre 10-30 minutos. A continuación, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo para la cuantificación del extracto de proteínas.

6.3.3. Cuantificación de proteínas

Para cuantificar los extractos de proteínas se utilizó el método de Bradford que permite, mediante una medida colorimétrica, interpolar la absorbancia a 595 nm de las muestras a una curva patrón de BSA de concentraciones conocidas. Una vez conocidos los μ g de proteína de cada muestra se igualaron de manera que todas las muestras tuvieran la misma cantidad de proteína (entre 20 y 30 μ g) completando con tampón RIPA hasta un volumen final establecido y se añadió el tampón de carga.

6.3.4. Electroforesis, transferencia húmeda e inmunodetección de proteínas

Las muestras se hirvieron a 95°C durante 10 minutos antes de cargarlas en geles de poliacrilamida-SDS al 10 o 15%. Durante la electroforesis, puesto que todas las proteínas

están cargadas negativamente de manera homogénea gracias a la acción del SDS, se produce la separación de las mismas en función de su tamaño únicamente. Las condiciones de la electroforesis fueron voltaje constante de 120 voltios durante 1,5 o 2 horas en presencia de tampón de electroforesis (25 mM Tris pH 8,3, 250 mM Glicina, 0,1% (p/v) SDS). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m en presencia de tampón de transferencia (66 mM pH 8,3, 383 mM Glicina, 20% Metanol, 0,038% SDS) mediante el paso de corriente eléctrica constante de 0,12 amperios durante 2 horas.

Para eliminar las uniones inespecíficas del anticuerpo en la membrana, esta se sometió a un bloqueo en solución de bloqueo: leche en polvo desnatada al 5% o BSA al 3% en TBS-T (10 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,5) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido 1:1000 en TBS-T al 1% de BSA, a 4°C durante 16 horas. Pasado este tiempo las membranas se lavaron con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido 1:5000 en TBS-T; anticuerpo de cabra dirigido contra las inmunoglobulinas de la especie correspondiente: conejo o ratón y conjugado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology Inc.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se realizaron lavados de TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y un lavado final con TBS para eliminar los restos de Tween-20.

La detección de los anticuerpos unidos se realizó mediante quimioluminiscencia aplicando sobre la membrana el reactivo ECL (170-5061 Bio-Rad Laboratories Inc. California, Estados Unidos) y se tomaron imágenes a diferentes tiempos de exposición con el visualizador bioluminiscente ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare Life Sciences). Para el análisis por densitometría de la expresión de proteínas se utilizó el software ImageJ; los anticuerpos contra Tubulina y PI3K (P85 α) se utilizaron como control de carga junto con la tinción con Ponceau.

Tabla 2. Lista de anticuerpos usados para Western blot.

Anticuerpo	Referencia	Casa comercial
p-Smad1/5/8	#9511	Cell Signalling Technology
Caspasa 3 activa	#9661	Cell Signalling Technology
pJNK	#4668	Cell Signalling Technology
pP38	#9211	Cell Signalling Technology
BMP6	ab155963	Abcam
α SMA	A-2547	Merck Life Science
COL1A1	SC-8784	Santa Cruz Biotechnology
BMP8A	ab154373	Abcam
P85 α	06-195	Merck Life Science
Tubulina	sc-166729	Santa Cruz Biotechnology

7. ANÁLISIS DE ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo con el reactivo TRIzol Reagent® (TRI REAGENT™ TR 118, Vitro S.A. Madrid, España), una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que permite el aislamiento de ARN manteniendo su integridad gracias a su alta efectividad inhibiendo la actividad de ARNasas al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y disuelve componentes celulares en el proceso de homogenización de la muestra. El lisado celular o fragmento de tejido (20 mg aproximadamente) se homogenizó en este reactivo y a continuación se añadió cloroformo de manera que se obtuvo una fase orgánica que contiene ADN y proteínas y una fase acuosa que contiene el ARN. Esta fase acuosa se recogió en un nuevo tubo y se añadió isopropanol que permite la precipitación del ARN. A continuación, el pellet de ARN se lavó con etanol y una vez seco se resuspendió en agua libre de ADNasa/ARNasa en el volumen más adecuado en función del tipo de muestra. Posteriormente, se determinó la concentración y pureza del ARN extraído mediante una

lectura espectrofotométrica triple con el Nanodrop (Nanodrop 2000c Thermo Fisher Scientific) a 230 nm, 260 nm y 280 nm.

Seguidamente, se realizó la transcripción reversa seguida de PCR (en inglés *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) de 1 µg de ARN extraído. En este proceso, el ARN se retrotranscribe gracias a la acción de la enzima transcriptasa reversa que sintetiza ADN complementario (ADNc) a partir de ARN y a continuación, el ADNc obtenido se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello se utilizó el kit ImProm-II™ Reverse transcription (M314C), junto con dNTPs (C1145) e inhibidor de ARNasa ARNsin (N261B, Promega Biotech Ibérica S.L. Madrid, España).

Por último, se llevó a cabo el análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Para ello, se utilizó el kit GoTaq® qPCR Master Mix (A6002, Promega Biotech Ibérica S.L.), en el termociclador QuantStudio5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Se utilizaron los oligonucleótidos específicos para cada gen descritos en la Tabla 3. La cuantificación de la expresión se realizó utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ y se normalizaron los valores obtenidos a los del gen endógeno *36B4*, gen que codifica la fosfoproteína ribosomal ácida P0 (RPLP0).

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos para RT-qPCR.

Gen	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')
<i>m-Hmox1</i>	CACAGATGGCGTCACTTCGTC	GTGAGGACCCACTGGAGGAG
<i>m-Bmp6</i>	TCCCCACATCAACGACACCA	TCCCCACCACACAGTCCTTG
<i>m-Bmp2</i>	TGGAAGTGGCCCATTTAGAG	TGACGCTTTTCTCGTTTGTG
<i>m-Col1a1</i>	TAGGCCATTGTGTATGCAGC	ACATGTTTCAGCTTTGTGGACC
<i>m-Acta2</i>	CCCAGACATCAGGGAGTAATGG	TCTATCGGATACTTCAGCGTCA
<i>m-Serpin1</i>	ATGACTGGGTGGAAAGGCATAC	CAGGCGTGTGAGCTCGTCTA
<i>m-Bmp8a</i>	AACCATGCCATCTTGCAGTCT	CAGAGGTGGCACTCAGTTTGG
<i>m-36b4</i>	AGATGCAGCAGATCCGCAT	GTTCTTGCCATCAGCACC

Material es y Métodos

Gen	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')
<i>h-ALK2</i>	ATGGTTCTCAGACCCGACATTAA	TGAGTCTTGCGGATGGATTTT
<i>h-ALK3</i>	CTGGTTTCGAGAAACAGAAATCTAC	CAGTAATCAAATAGAGCTGAGTCCAG
<i>h-HAMP</i>	TGTTTTCCCACAACAGACGGG	CGCAGCAGAAAATGCAGATGG
<i>h-ID1</i>	ACGAGCAGCAGGTAAACGTG	GAAGGTCCTGATGTAGTCGAT
<i>h-HMOX1</i>	TGCTCAACATCCAGCTCTTTGA	GCAGAATCTTGCACTTTGTTGCT
<i>h-BMP6</i>	GGAAGCATGAGCTGTATGTGAGTTT	AGTAATTGGCAGCATAGCATAGCCCTTG
<i>h-IL-4</i>	CCGTAACAGACATCTTTGCTGCC	GAGTGCCTTCTCATGGTGGCT
<i>h-IL-13</i>	ACGGTCATTGCTCTCACTTGCC	CTGTCAGGTTGATGCTCCATACC
<i>h-ARG1</i>	TCATCTGGGTGGATGCTCACAC	GAGAATCCTGGCACATCGGGAA
<i>h-MRC1</i>	AGCCAACACCAGCTCCTCAAGA	CAAAACGCTCGCGCATGTCCA
<i>h-IL-1β</i>	TGAGCACCTTCTTTCCCTTCA	ATCGTGACATAAGCCTCGTT
<i>h-IL-6</i>	CCTGACCCAACCACAAATGC	CCTTAAAGCTGCGCAGAATGA
<i>h-TNFα</i>	TCGAACCCCGAGTGACAAG	TTGGCCAGGAGGGCATT
<i>h-BMP2</i>	CAACACTGTGCGAGCTTC	GAAGAATCTCCGGGTTGTTTTT
<i>h-CD36</i>	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC	TGAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC
<i>h-COL1A1</i>	ACTGGTGAGACCTGCGTGTA	GAATCCATCGGTCATGCTCT
<i>h-ACTA2</i>	CTATGCCTCTGGACGCACAA	CAGATCCAGACGCATGATGG
<i>h-TGFB1</i>	AGGACTGCGGATCTCTGTGT	GGGCAAAGGAATAGTGCAGA
<i>h-BMP8A</i>	CACCCTTCTCATCTGGATCG	CAGGAAGTAGGCACCGAGAG
<i>h-36B4</i>	CAGGCGTCCTCGTGGAAGTGAC	CCAGGTCGCCCTGTCTTCCCT

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó el test Kolmogorov-Smirnov para evaluar el ajuste de las variables a una distribución normal. Las variables cualitativas se presentaron como frecuencias relativas, mientras que las variables cuantitativas se expresaron como media y dispersión: desviación estándar (en inglés *standard deviation*, SD) para datos procedentes de pacientes o error estándar de la media (en inglés *standard error of the mean*, SEM) para datos experimentales. Las diferencias significativas entre grupos se determinaron mediante el test t de Student para variables que seguían una distribución normal y Mann-Whitney U para variables continuas con una distribución no paramétrica. Para el desarrollo de algoritmos predictivos, se realizaron análisis de regresión logística binaria y multinomial con variables significativas en el análisis univariante y variables clínicamente relevantes. En los modelos de regresión multivariante se utilizó el método de regresión paso a paso y los parámetros se seleccionaron mediante la prueba de razón de verosimilitud. Se utilizó el procedimiento Box-Tidwell para evaluar la linealidad del logit y se realizaron las transformaciones de variables apropiadas. La bondad de ajuste del modelo se evaluó utilizando la estadística Hosmer-Lemeshow y el test Chi-cuadrado de Pearson. Con el fin de evaluar la precisión diagnóstica de los diferentes modelos de regresión elaborados, se realizaron curvas ROC (del inglés *receiver operating characteristics*) y área bajo la curva ROC (AUROC). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU) y el software IBM SPSS Statistics 24.0 (SPSS Inc., IBM, Armonk, NY). Se consideró como estadísticamente significativo un p valor <0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES BMP TIPO I ALK2 Y ALK3 EN EL FALLO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO POR PARACETAMOL

Las proteínas BMP se han asociado con la sobrecarga hepática de hierro, ya que modulan la expresión de la hepcidina, un regulador clave de la homeostasis del hierro (Canali et al., 2017; Meynard et al., 2009). En este sentido, se ha observado una disminución de la síntesis de hepcidina debida a la inhibición de la señalización de BMP en situaciones de hipoxia o estrés oxidativo como sucede en el DILI por APAP (Chaston et al., 2011; van Swelm et al., 2012); por el contrario, un estudio reciente ha señalado que la ruta de señalización de BMP se activa tras el daño hepático inducido por APAP (Stavropoulos et al., 2022). Por lo tanto, no queda claro el papel que tiene la señalización de estas proteínas en el ALF inducido por APAP.

El objetivo de este estudio fue determinar la implicación de la señalización de BMP, particularmente de los receptores de BMP tipo I ALK2 y ALK3, en el daño hepático inducido por APAP, mediante el estudio de los efectos derivados de su inhibición y evaluar si podrían ser una diana farmacológica para el tratamiento de ALF causado por APAP.

1. Evaluación de los efectos del silenciamiento génico de los receptores ALK2 y ALK3 frente a la toxicidad inducida por APAP

1.1. Silenciamiento génico de los receptores BMP tipo I ALK2 y ALK3

Para explorar el papel de la señalización de las proteínas BMP en ALF inducido por APAP, se llevó a cabo un silenciamiento génico de los receptores de BMP tipo I ALK2 y ALK3 en las células Huh7. Con este propósito, se realizó una infección estable con partículas lentivirales control (shControl) o con partículas lentivirales shRNA para ALK2 o ALK3 (shALK2 o shALK3, respectivamente). La eficiencia del silenciamiento se evaluó cuantificando la expresión a nivel de ARNm de los genes *ALK2* y *ALK3*, obteniendo una reducción de la expresión del 70% y 50%, respectivamente (Figura 7). Curiosamente, se encontró que la expresión de ALK3 se incrementó como consecuencia del silenciamiento de ALK2, y la expresión de ALK2 también se elevó en las células shALK3 en comparación con las células control shControl.

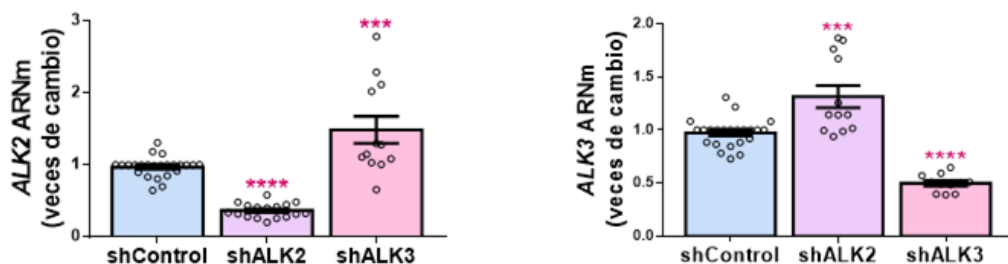


Figura 7. Silenciamiento génico de los receptores BMP tipo I ALK2 y ALK3 en células Huh7. Niveles de ARNm de los genes *ALK2* (panel izqdo.) y *ALK3* (panel dcho.), determinados mediante RT-qPCR y normalizados con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de cambio relativo a la condición control (shControl, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células Huh7 con silenciamiento génico de ALK2 (shALK2) y ALK3 (shALK3) mediante infección lentiviral y su control (shControl). (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). ***p<0,005 y ****p<0,0001, shALK2 o shALK3 vs. shControl.

Asimismo, se observó una menor fosforilación de Smad1/5/8 en las células silenciadas (Figura 8A), en paralelo a una modulación en la expresión de los genes *ID1* y *HAMP* (gen que codifica para hepcidina), ambos ampliamente descritos como genes diana de la señalización de BMP.

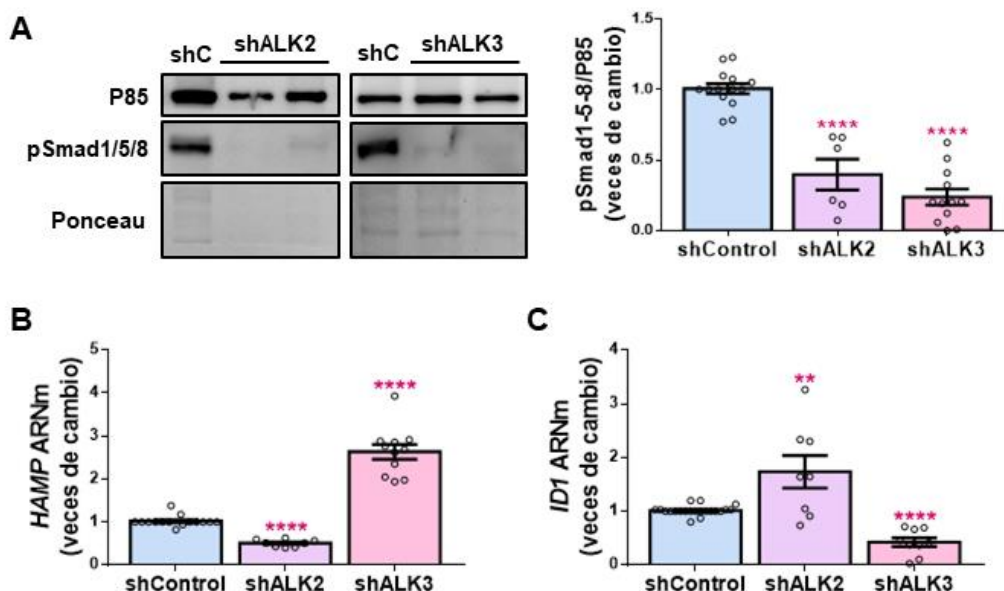


Figura 8. Señalización en las líneas estables silenciadas en ALK2 y ALK3. A. Imágenes representativas de Western blot del lisado celular con el anticuerpo frente a pSmad1/5/8 y P85 y la tinción con Ponceau como control de carga, y su cuantificación. B y C. Niveles de ARNm de los genes *HAMP* e *ID1*, determinados mediante RT-qPCR y normalizados con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de cambio relativo a la condición control (shControl, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células Huh7 con silenciamiento génico de ALK2 (shALK2) y ALK3 (shALK3) mediante infección lentiviral y su control (shControl). (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). **p<0,01 y ****p<0,0001, shALK2 o shALK3 vs. shControl.

Curiosamente, se observó que ALK2 juega un papel crítico en la expresión de hepcidina ya que modulando selectivamente ALK2, pero no ALK3, la expresión génica de la hepcidina se ve igualmente modulada: como se muestra en la Figura 8B, la expresión de *HAMP* está disminuida en las células con silenciamiento de ALK2, mientras que su expresión está aumentada en las células que presentan una leve sobreexpresión de este receptor (shALK3); por el contrario, la expresión de *ID1* se vio reducida tras el silenciamiento de ALK3 y elevada en las células con un ligera sobre expresión de este receptor (shALK2) (Figura 8C). Por tanto, se utilizaron estos dos genes diana para validar en el futuro la activación de estos receptores en este modelo celular (Figura 9).

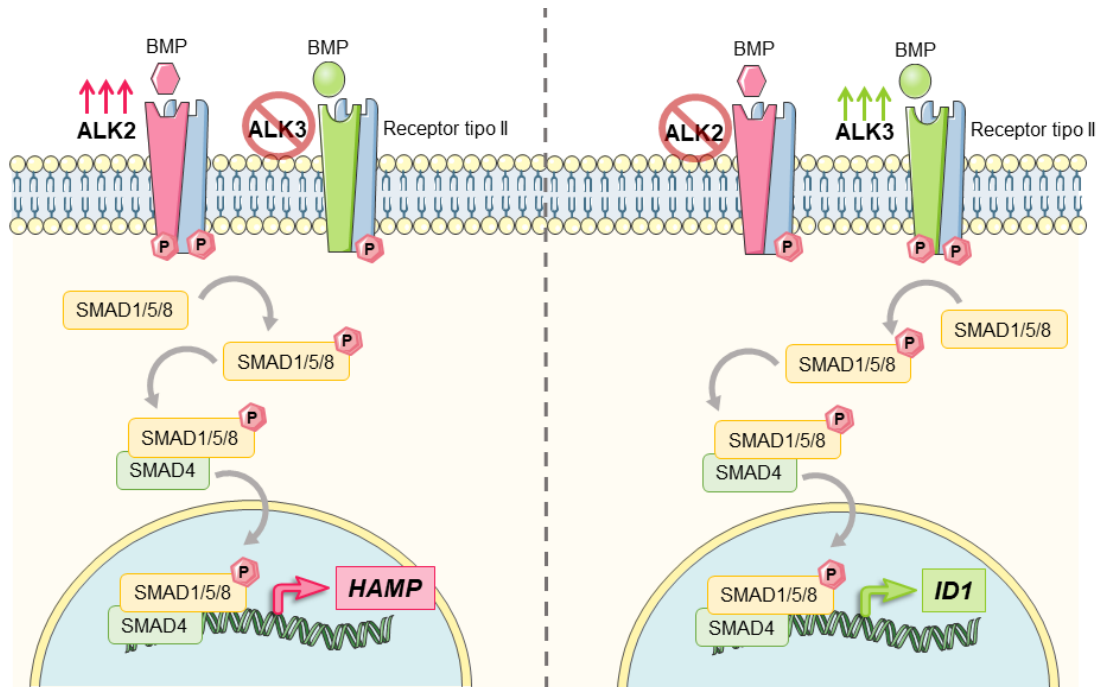


Figura 9. Modulación de la expresión de genes diana de la señalización mediada por ALK2 y ALK3. La expresión de *HAMP* está modulada por ALK2, mientras que ALK3 regula la expresión de *ID1*.

1.2. El silenciamiento del receptor de BMP tipo I ALK3 y no ALK2 protege contra la hepatotoxicidad inducida por APAP

Una vez establecidas las líneas celulares silenciadas, se trataron con APAP a 20 mM durante 16 horas y se evaluó la viabilidad celular. Se observó un incremento en la supervivencia celular en las células shALK3 tras la estimulación con APAP en comparación con las shControl; este efecto no se observó en la línea celular shALK2 (Figura 10).

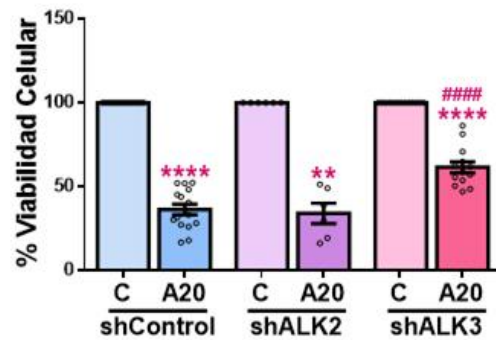


Figura 10. El silenciamiento génico de ALK3 aumenta la supervivencia celular frente al APAP. Viabilidad celular determinada mediante tinción con cristal violeta. Los datos están presentados como porcentaje de viabilidad relativo al grupo control (C, 100%) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Líneas estables shALK2 y shALK3 y su control shControl tratadas con APAP a 20 mM (A20) o etanol como control (C) durante 16 horas. ($n > 3$ experimentos independientes realizados por duplicado). ** $p < 0,01$ y **** $p < 0,0001$, A20 vs. C; #### $p < 0,0001$, shALK3 vs. shControl.

Para ahondar en este hallazgo, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad y apoptosis en la línea shALK3. Por un lado, se evaluó la presencia de necrosis mediante la cuantificación de la liberación de LDH al medio de cultivo. Por otro lado, para evaluar la apoptosis se cuantificó la presencia del fragmento activo de la caspasa 3, un conocido marcador de apoptosis, en los extractos proteicos de las células tratadas con APAP. Se observó una reducción en la toxicidad, que se refleja tanto en una menor liberación de LDH (Figura 11A), como en una disminución en el procesamiento de caspasa 3 (Figura 11B), en las células shALK3 tratadas con APAP en comparación con las células control.

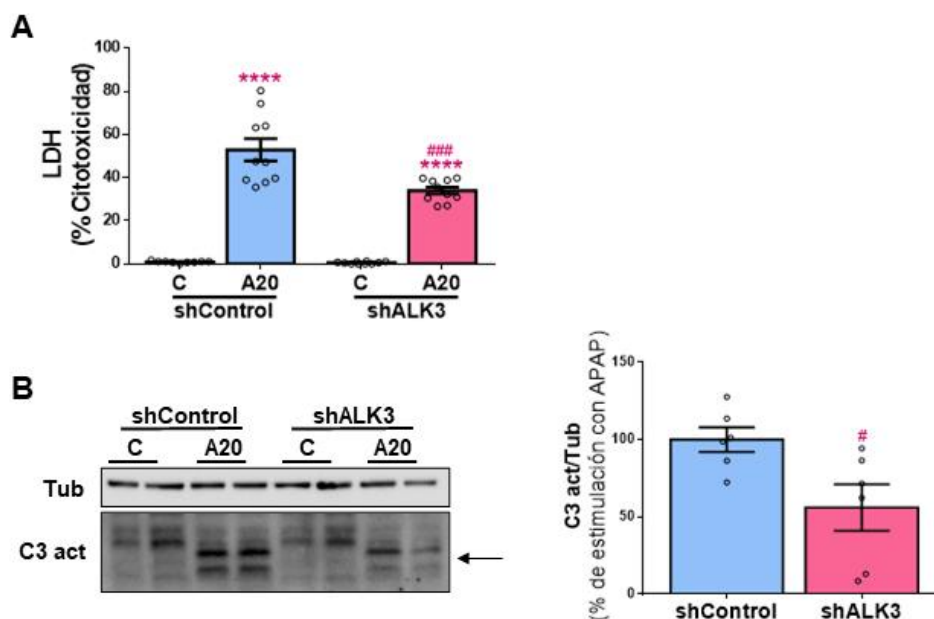


Figura 11. El silenciamiento génico de ALK3 protege frente al daño inducido por APAP. A. Determinación de la citotoxicidad mediante cuantificación de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). Los datos se presentan como porcentaje de citotoxicidad relativo al control positivo (100%). **B.** Imágenes representativas de Western blot con anticuerpo frente al fragmento activo de caspasa 3 (C3 act) y su cuantificación normalizada con anticuerpo frente a tubulina (Tub) como control de carga. Los datos están expresados como porcentaje de estimulación con APAP relativo a la condición control (shControl, 100%) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Línea estable shALK3 y su control shControl tratadas con APAP a 20 mM (A20) o etanol como control (C) durante 16 horas. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). ****p<0,0001, A20 vs. C; #p<0,05 y ###p<0,005, shALK3 vs. shControl.

Como ya se ha comentado, en la hepatotoxicidad inducida por APAP es característica la presencia de ROS. Por ello, se utilizó la sonda DHE para medir la producción de ROS en estas células durante las 2 horas posteriores a la estimulación con APAP y se encontró que en las células silenciadas en ALK3 apenas se produce ROS (Figura 12A). Además, se sabe que para contrarrestar el estrés oxidativo inducido por APAP, se desencadena una respuesta antioxidante, por ello se midieron los niveles de ARNm de *HMOX1* (gen que codifica la hemoxigenasa 1, HO1) ya que se trata de uno de los principales reguladores de esta respuesta antioxidante. Se observó que las células shALK3 presentaron una expresión de *HMOX1* más elevada que las shControl en condiciones basales, sugiriendo que estas células presentan una defensa antioxidante más activa frente a estresores oxidativos tales como el APAP. Estudios previos han demostrado que la HO1 juega un papel protector en diferentes modelos experimentales de daño hepático, incluyendo la intoxicación con APAP, gracias a su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiapoptótica (Chiu et al., 2002; Zheng et al., 2022; Zuckerbraun & Billiar, 2003). Como era de esperar, tras la estimulación con APAP durante 16 horas se observó un marcado incremento en la expresión del gen *HMOX1*; sin embargo, el incremento de este gen antioxidante fue menor en las células shALK3 (Figura 12B). Finalmente, se encontró una menor fosforilación de las quinasas de estrés JNK y P38, mediada por las ROS producidas, en las células silenciadas en ALK3 comparadas con el control tras 6 horas de estimulación con APAP (Figura 12C). Estudios previos han mostrado que la fosforilación de estas MAP quinasas amplifica la señal de daño inducida por el APAP y contribuye a la producción de ROS, por lo que una menor fosforilación de las mismas en las células shALK3 podría ser un indicativo de una menor presencia de ROS inducida por APAP en estas células (Du et al., 2022; Saito, Lemasters, et al., 2010).

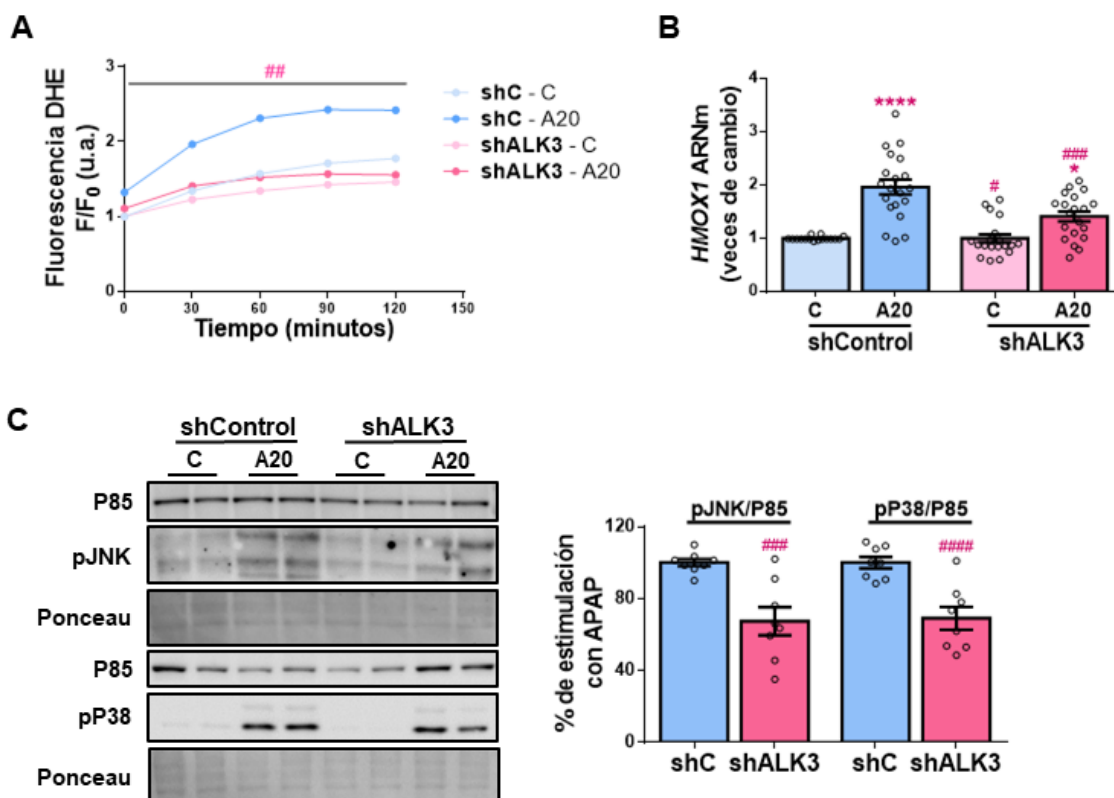


Figura 12. El silenciamiento génico de ALK3 protege frente al estrés oxidativo derivado del APAP. A. Producción de ROS medida con la sonda DHE durante 2 horas de exposición a APAP y representada como fluorescencia de DHE (F): F/F₀ (u.a.). **B.** Nivel de ARNm del gen *HMOX1*, determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de cambio relativo a la condición control (C-shControl, 1). **C.** Imágenes representativas de Western blot del lisado celular con los anticuerpos indicados y P85 y la tinción con Ponceau como control de carga, y su cuantificación. Los datos están expresados como porcentaje de estimulación con APAP relativo a la condición control (shC, 100%) y presentados como media ± SEM. Condiciones experimentales: Línea estable shALK3 y su control shControl tratadas con APAP a 20 mM (A20) o etanol como control (C) durante 2 (**A**), 6 (**C**) o 16 (**B**) horas. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). *p<0,05 y ****p<0,0001, A20 vs. C; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,005 y #### p<0,0001, shALK3 vs. shControl.

2. Evaluación de los efectos de la sobreexpresión del receptor ALK2 frente a la toxicidad inducida por APAP

Como se ha mencionado anteriormente, la expresión a nivel de ARNm de ALK2 está significativamente inducida en la línea celular estable shALK3, posiblemente a raíz de un mecanismo para compensar la ausencia de ALK3. Para explorar si el aumento de expresión de ALK2 en las células con ALK3 silenciado es el responsable de los efectos protectores observados, se realizó una infección de las células Huh7 con partículas lentivirales para

desarrollar una línea celular estable que sobreexpresara ALK2 (LV ALK2) y su respectiva línea celular control (LV Control). La sobreexpresión de ALK2 se evaluó midiendo los niveles de ARNm de este receptor, que mostró un incremento de expresión tres veces superior al control (Figura 13A). Del mismo modo, la expresión de su gen diana *HAMP* se incrementó de manera significativa, mientras que los niveles de ARNm de los genes *ALK3* e *ID1* no se modularon (Figura 13B).

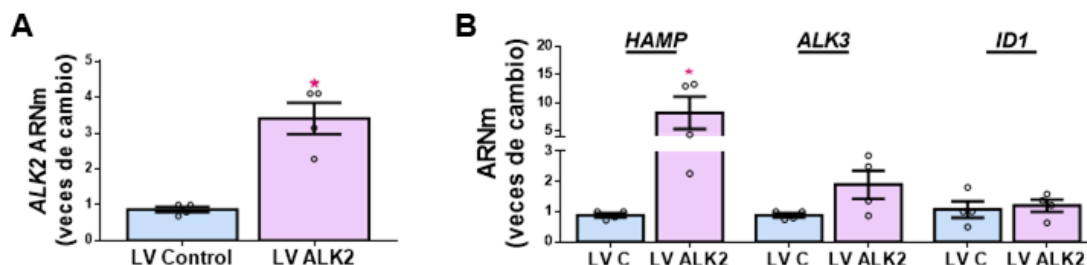


Figura 13. Sobreexpresión del receptor ALK2. A y B. Niveles de ARNm de los genes *ALK2*, *HAMP*, *ALK3* e *ID1*, respectivamente; determinados mediante RT-qPCR y normalizados con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de cambio relativo a la condición control (LV Control o LV C, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células Huh7 con sobreexpresión del receptor ALK2 (LV ALK2) mediante infección lentiviral y su control (LV Control o LV C). (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). *p<0,05 LV ALK2 vs. LV Control o LV C.

Tras la estimulación con APAP durante 16 horas, las células LV ALK2 no mostraron mayor viabilidad celular que sus correspondientes controles (Figura 14A). Sin embargo, se observó una fuerte inhibición del procesamiento de caspasa 3, indicando que la sobreexpresión de ALK2 presenta un potente efecto antiapoptótico (Figura 14B). Por el contrario, la expresión a nivel de ARNm de HO1 fue similar en ambos casos (Figura 14C) y no se encontraron diferencias en la fosforilación de las quinasas JNK y P38 tras el tratamiento con APAP durante 6 horas (Figura 14D).

Estudios previos han puesto de manifiesto un efecto antiapoptótico de la ruta de señalización canónica de BMP mediante la inducción de la expresión de XIAP (del inglés *x-linked inhibitor of apoptosis protein*), un potente inhibidor de la caspasa 3 (Yamaguchi et al., 1999). Esto podría explicar la disminución en el procesamiento de caspasa 3 observado en las células con sobreexpresión de ALK2; sin embargo, este efecto todavía no se ha asociado con la señalización mediada por un receptor específico (Liu et al., 2013; Liu et al., 2009). Por tanto, sería necesaria la realización de ensayos para confirmar la inducción de XIAP en estas células.

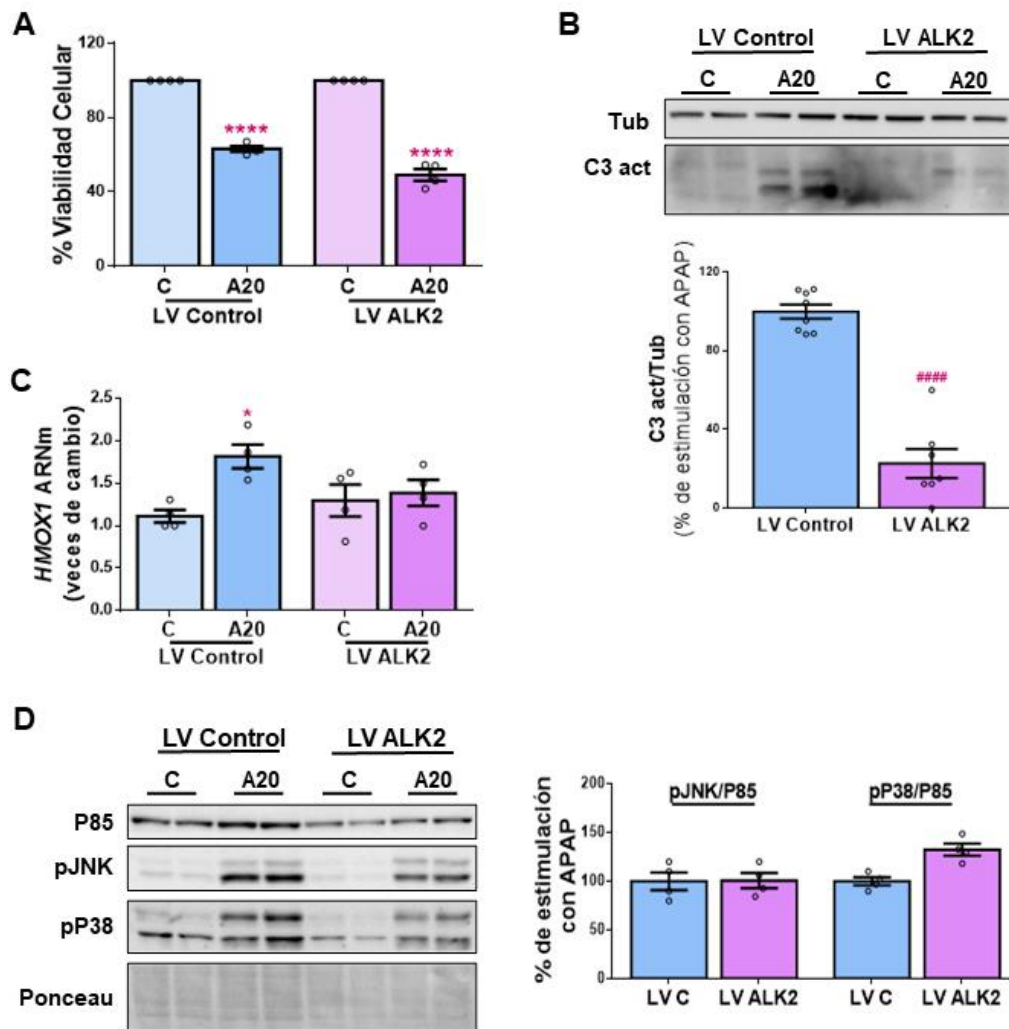


Figura 14. Efectos de la sobreexpresión del receptor ALK2 frente a la toxicidad inducida por APAP. **A.** Viabilidad celular determinada mediante tinción con cristal violeta. Los datos están presentados como porcentaje de viabilidad relativo al grupo control (C, 100%). **B.** Imágenes representativas de Western blot con anticuerpo frente al fragmento activo de caspasa 3 (C3 act) y su cuantificación normalizada con anticuerpo frente a tubulina (Tub) como control de carga. **C.** Nivel de ARNm del gen *HMOX1*, determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36B4*. **D.** Imágenes representativas de Western blot del lisado celular con los anticuerpos indicados y P85 y la tinción con Ponceau como control de carga, y su cuantificación. Los datos están expresados como porcentaje de estimulación con APAP o veces de cambio relativo a la condición control (LV Control, 100% o 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Línea estable LV ALK2 y su control LV Control (LV C) tratadas con APAP a 20 mM (A20) o etanol como control (C) durante 6 (**D**) o 16 (**A-C**) horas. ($n > 3$ experimentos independientes realizados por duplicado). * $p < 0,05$ y **** $p < 0,0001$, A20 vs. C; ### $p < 0,0001$, LV ALK2 vs. LV Control.

3. Evaluación de los efectos de la inhibición farmacológica de los receptores ALK2 y ALK3 frente al daño por APAP

3.1. Inhibición farmacológica de ALK2 y ALK3

Para corroborar los resultados derivados de los modelos celulares manipulados genéticamente, se utilizaron varios inhibidores farmacológicos que presentan diferente selectividad por cada tipo de receptor como se muestra en la Tabla 1, en la sección de “Materiales y métodos”. Las células Huh7 se trataron con DMH2 a 10 μ M para inhibir selectivamente la señalización mediada por ALK3; ML347 a 150 nM para la inhibición de ALK2, y LDN-193189 (LDN) a 500 nM para conseguir la inhibición de ambos receptores. Resaltar que, tras la exposición a estos inhibidores, solo se observó modulación en la expresión de los receptores ALK en las células tratadas con DMH2: una disminución del ARNm de ALK3 y sobreexpresión de ALK2, similar a lo observado en la línea celular estable silenciada en ALK3 como se muestra en la Figura 7 (Figura 15).

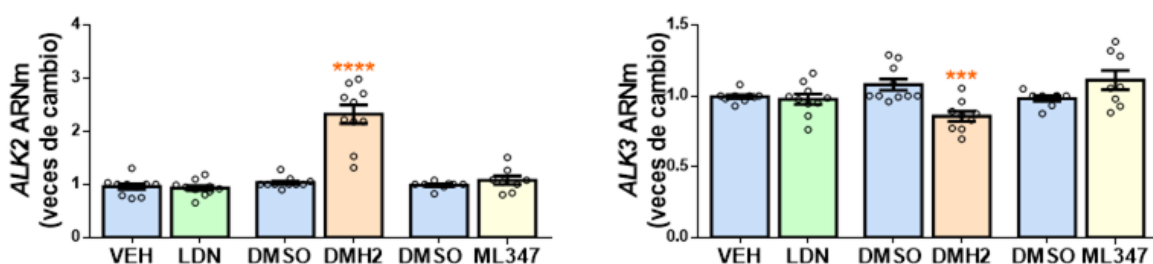


Figura 15. Tratamiento de las células Huh7 con inhibidores farmacológicos de los receptores de BMP tipo I ALK2 y ALK3. Niveles de ARNm de los genes *ALK2* (panel izqdo.) y *ALK3* (panel dcho.) determinados mediante RT-qPCR y normalizados con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de cambio relativo a la condición control (VEH o DMSO, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células Huh7 tratadas con los inhibidores farmacológicos (LDN, DMH2 o ML347) o sus vehículos (VEH, DMSO) durante 16 horas. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). ***p<0,005 y ****p<0,0001, DMH2 vs. DMSO.

Además, se observó menor fosforilación de Smad1/5/8 con todos los inhibidores evidenciando un bloqueo eficiente de la ruta de señalización canónica (Figura 16A). Asimismo, como se muestra en las Figuras 16B y 16C, la expresión del gen *HAMP* se redujo en las células donde ALK2 está inhibido (LDN y ML347), mientras que la expresión de ARNm del gen *ID1* se inhibió casi completamente en las células tratadas con los compuestos que bloquean ALK3 (LDN y DMH2).

Si bien es cierto que la expresión del gen *ID1* también se ve reducida exponiendo las células a ML347 en comparación con su vehículo, dicha reducción es significativamente más evidente cuando se trata con los compuestos LDN y DMH2. Este resultado sugiere que, aunque el

Resultados y Discusión: Capítulo I

compuesto ML347 tiene mayor afinidad por el receptor ALK2, no sea totalmente selectivo para este receptor a esta dosis.

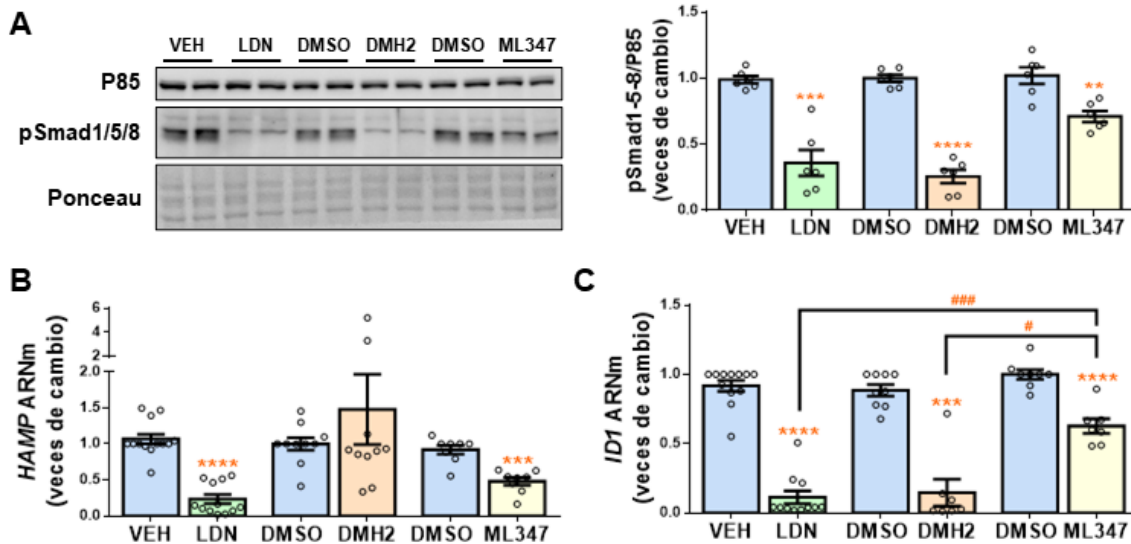


Figura 16. Señalización en las células tratadas con inhibidores farmacológicos de ALK2 y ALK3.

A. Imágenes representativas de Western blot del lisado celular con el anticuerpo frente a pSmad1/5/8 y P85 y la tinción con Ponceau como control de carga, y su cuantificación. **B y C.** Niveles de ARNm de los genes *HAMP* e *ID1*, respectivamente, determinados mediante RT-qPCR y normalizados con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de cambio relativo a la condición control (VEH o DMSO, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células Huh7 tratadas con los inhibidores farmacológicos (LDN, DMH2 o ML347) o sus vehículos (VEH, DMSO) durante 2 horas (**A**) o 16 horas (**B y C**). (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). **p<0,01, ***p<0,005 y ****p<0,0001, LDN, DMH2 o ML347 vs. VEH o DMSO; #p<0,05 y ###p<0,005, ML347 vs. LDN o DMH2.

3.2. La inhibición de la señalización mediada por ALK3 con el compuesto DMH2 confiere efectos protectores frente al daño inducido por APAP

De manera similar a los resultados obtenidos previamente, la inhibición de ALK3 conseguida mediante el tratamiento con DMH2, concede una mayor viabilidad celular tras la exposición a APAP, y esta protección no se consiguió con ninguno de los otros compuestos testados (Figura 17).

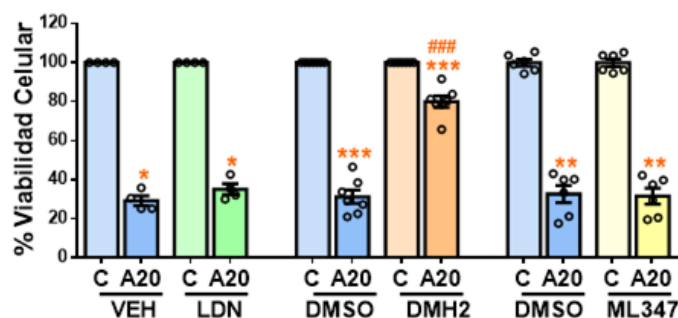


Figura 17. Efecto de los inhibidores farmacológicos de ALK2 y ALK3 sobre la viabilidad celular en presencia de APAP. Viabilidad celular determinada mediante tinción con cristal violeta. Los datos están presentados como porcentaje de viabilidad relativo al grupo control (C, 100%) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células Huh7 tratadas con los inhibidores farmacológicos (LDN, DMH2 o ML347) o sus vehículos (VEH, DMSO) 1 hora antes de la estimulación con APAP a 20 mM (A20) o etanol como control (C) durante 16 horas. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,005, A20 vs. C; ####p<0,005, DMH2 vs. DMSO.

Respecto a la citotoxicidad, el pretratamiento con DMH2 protege visiblemente frente a la muerte de las células Huh7 inducida por APAP (Figura 18A). Cabe destacar, que se observó una liberación de LDH significativamente menor, así como una menor presencia del fragmento activo de caspasa 3 en las células expuestas a APAP pretratadas con DMH2 en comparación con las pretratadas con el vehículo (DMSO) (Figuras 18B y C, respectivamente).

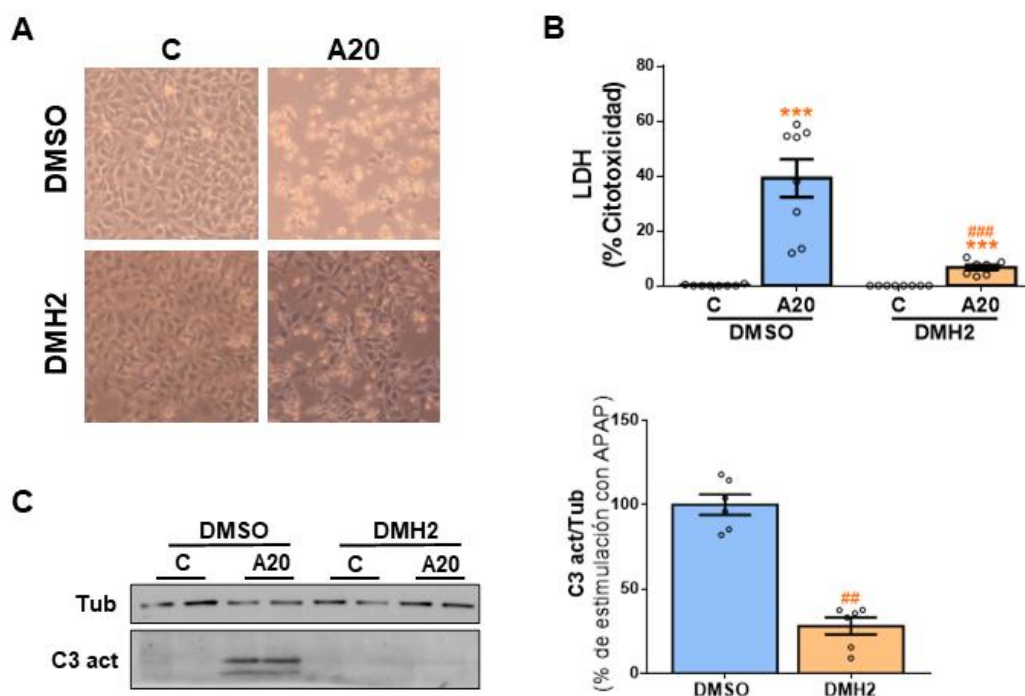


Figura 18. La inhibición de ALK3 con DMH2 protege frente a la toxicidad inducida por APAP. **A.** Imágenes representativas de contraste de fases de células Huh7 con los tratamientos indicados. **B.** Determinación de la citotoxicidad mediante cuantificación de la liberación de LDH. Los datos se presentan como porcentaje de citotoxicidad relativo al control positivo (100%). **C.** Imágenes representativas de Western blot con anticuerpo frente al fragmento activo de caspasa 3 (C3 act) y su cuantificación normalizada con anticuerpo frente a tubulina (Tub) como control de carga. Los datos están expresados como porcentaje de estimulación con APAP relativo a la condición control (DMSO, 100%) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células Huh7 tratadas con DMH2 a 10 μ M o DMSO 1 hora antes de la estimulación con APAP a 20 mM (A20) o su control (C) durante 16 horas. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). ***p<0,005, A20 vs. C; ##p<0,01 y ###p<0,005, DMH2 vs. DMSO.

Resultados y Discusión: Capítulo I

En cuanto a los efectos sobre el estrés oxidativo, se observó una mayor expresión del gen *HMOX1* a nivel basal en las células pretratadas con DMH2 (Figura 19A), aunque el incremento de expresión de este gen tras la inducción con APAP fue menor en comparación con las células no pretratadas (Figura 19B). Una vez más, este resultado es similar al obtenido en la línea silenciada en ALK3 (shALK3), donde parece que a nivel basal la inhibición de ALK3 confiere una mayor defensa antioxidante. Además, las células Huh7 pretratadas con DMH2 mostraron menores niveles de fosforilación de JNK y P38 tras la estimulación con APAP durante 6 horas (Figura 19C).

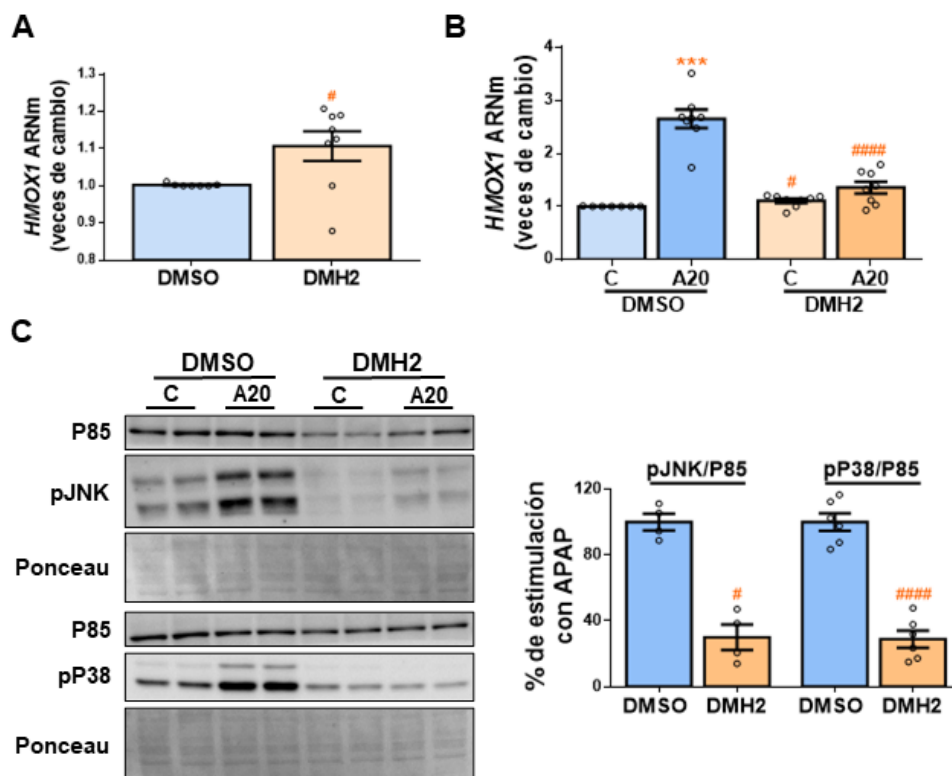


Figura 19. La inhibición de ALK3 con DMH2 protege frente al estrés oxidativo derivado del APAP.

A y B. Nivel de ARNm del gen *HMOX1*, determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de cambio relativo a la condición control (C-DMSO, 1).

C. Imágenes representativas de Western blot del lisado celular con los anticuerpos indicados y P85 y la tinción con Ponceau como control de carga, y su cuantificación. Los datos están expresados como porcentaje de estimulación con APAP relativo a la condición control (DMSO, 100%) y presentados como media ± SEM. Condiciones experimentales: Células Huh7 tratadas con DMH2 a 10 μ M o DMSO 1 hora antes de la estimulación con APAP a 20 mM (A20) o etanol como control (C) durante 6 (C) o 16 (A-B) horas. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). ***p<0,005 y ****p<0,0001, A20 vs. C; #p<0,05 y ####p<0,0001, DMH2 vs. DMSO.

3.3. La inhibición de ambos receptores ALK2 y ALK3 con el compuesto LDN no presenta efectos protectores frente al daño inducido por APAP

Con el fin de comprobar si estos efectos se deben a la inhibición selectiva de ALK3, se exploraron los efectos del pretratamiento con LDN, que inhibe ambos receptores: ALK2 y ALK3, en las células Huh7 tratadas con APAP. Los resultados obtenidos mostraron que la inhibición de ambos receptores no redujo la apoptosis mediada por APAP (Figura 20A) ni mostró efectos sobre el sistema antioxidante (Figura 20B). El hecho de que la inhibición de ambos receptores mediante LDN no tenga los mismos efectos que la inhibición selectiva de ALK3 se puede deber a que la leve sobreexpresión concomitante de ALK2 observada cuando se inhibe ALK3 es necesaria para que se produzca el efecto protector. Como ya se ha comentado, estudios previos han reportado un efecto antiapoptótico derivado de la inducción de XIAP por la señalización de las proteínas BMP (Yamaguchi et al., 1999). En un estudio realizado en células derivadas de cáncer de pulmón se observó que el tratamiento con DMH2 redujo la expresión de XIAP aumentando la muerte celular, lo cual no se observó tras el tratamiento con LDN (Augeri et al., 2016). Estos resultados contradicen los obtenidos en este trabajo donde el tratamiento con DMH2 redujo significativamente el procesamiento de caspasa 3. Sin embargo, en este modelo, DMH2 parece inhibir únicamente la señalización mediada por ALK3 e inducir la mediada por ALK2, que podría ser responsable de este efecto antiapoptótico. Esto explicaría que la inhibición de ambos receptores con LDN no mostrase una reducción en la expresión del fragmento activo de caspasa 3.

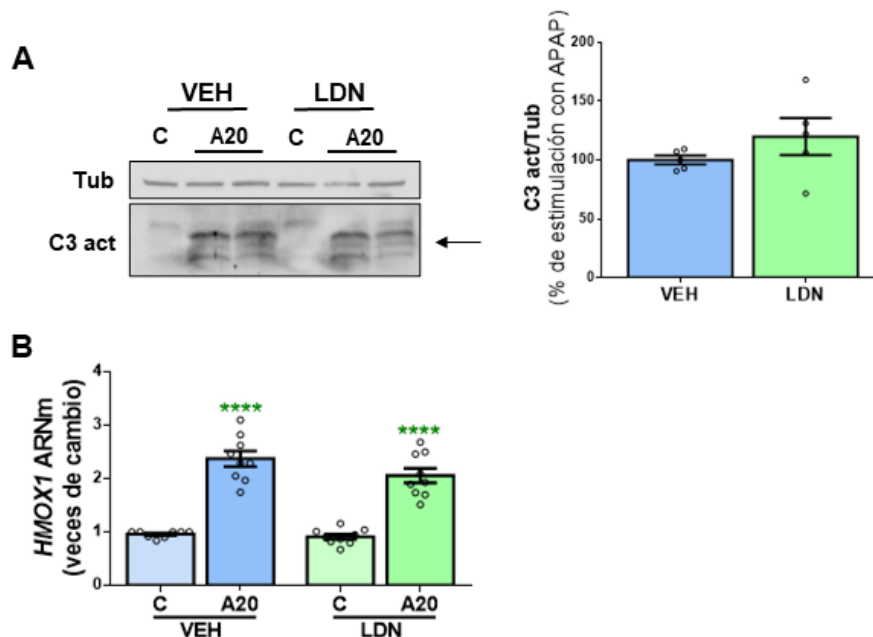


Figura 20. Efectos de la inhibición de ALK2 y ALK3 con LDN frente al daño inducido por APAP.

A. Imágenes representativas de Western blot con anticuerpo frente al fragmento activo de caspasa 3 (C3 act) y su cuantificación normalizada con anticuerpo frente a tubulina (Tub) como control de carga. Los datos están expresados como porcentaje de estimulación con APAP relativo a la condición control (VEH, 100%). **B.** Nivel de ARNm del gen *HMOX1*, determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de cambio relativo a la condición control (C-VEH, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células Huh7 tratadas con LDN a 500 nM o VEH 1 hora antes de la estimulación con APAP a 20 mM (A20) o etanol como control (C) durante 16 horas. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). ****p<0,0001, A20 vs. C.

4. Evaluación de los efectos del inhibidor DMH2 en un modelo experimental de fallo hepático agudo inducido por APAP

En un intento de explorar si los efectos observados tras la inhibición de ALK3 en un modelo celular de toxicidad inducida por APAP se pueden reproducir *in vivo*, y puesto que el antagonismo farmacológico de las proteínas BMP con diferentes inhibidores es posible y tolerable en animales (Augeri et al., 2016; Tsugawa et al., 2014), se llevó a cabo un modelo experimental en ratones de ALF inducido por APAP. Puesto que se quería evaluar los potenciales efectos de la administración de DMH2 sobre el daño hepático posterior a una sobredosis de APAP, se comprobó primero que DMH2 también favorece la viabilidad celular frente al tratamiento con APAP *in vitro* cuando se añade a las células 1 hora después del APAP (Figura 21).

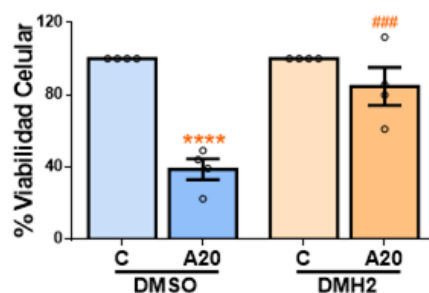


Figura 21. El post tratamiento con DMH2 aumenta la viabilidad celular en presencia de APAP.

Viabilidad celular determinada mediante tinción con cristal violeta. Los datos están presentados como porcentaje de viabilidad relativo al grupo control (C, 100%) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células Huh7 estimuladas con APAP a 20 mM (A20) o etanol como control (C) durante 16 horas y tratadas con DMH2 a 10 μ M o DMSO 1 hora después del APAP. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). ****p<0,0001, A20 vs. C; ###p<0,005, DMH2 vs. DMSO.

Una vez comprobada la efectividad de DMH2 como post tratamiento, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal (i.p.) vehículo (DMSO) o APAP (500 mg/kg) y, 1 hora después, se administró DMH2 o una cantidad equivalente de DMSO en una única dosis de 3 mg/kg (Figura 22).

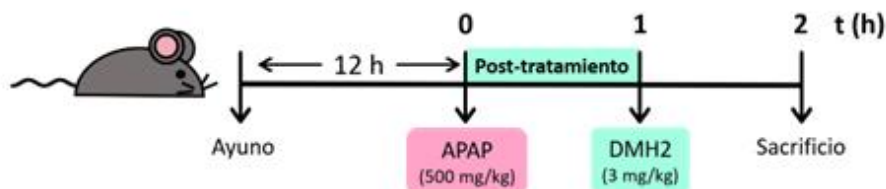


Figura 22. Tratamiento con DMH2 en un modelo experimental de ALF inducido por APAP. Se administró a los ratones APAP (500 mg/kg) o su vehículo (DMSO, C) por vía i.p. y 1 hora después se trataron con DMH2 (3 mg/kg) o una cantidad equivalente de su vehículo (DMSO). Los animales se sacrificaron 2 horas después de la administración del APAP (n=7 animales por grupo).

4.1. El inhibidor DMH2 protege frente a la hepatotoxicidad inducida por APAP *in vivo*

Con el fin de evaluar el efecto de DMH2 sobre el daño hepático inducido por APAP, se cuantificó el área de necrosis en el tejido hepático de los animales sometidos al modelo y se observó una reducción significativa de la necrosis hepatocitaria inducida por APAP en aquellos ratones que habían recibido DMH2 como post tratamiento tras la administración de APAP comparados con los tratados con el vehículo. Del mismo modo, el ensayo de TUNEL mostró menos presencia de fragmentación del ADN en los hígados procedentes de animales tratados con DMH2 (Figura 23A). Además, los niveles séricos de GPT, un conocido marcador de daño hepático, inducidos por la administración de APAP, fueron significativamente menores en los ratones tratados con DMH2 que en aquellos tratados con vehículo (Figura 23B).

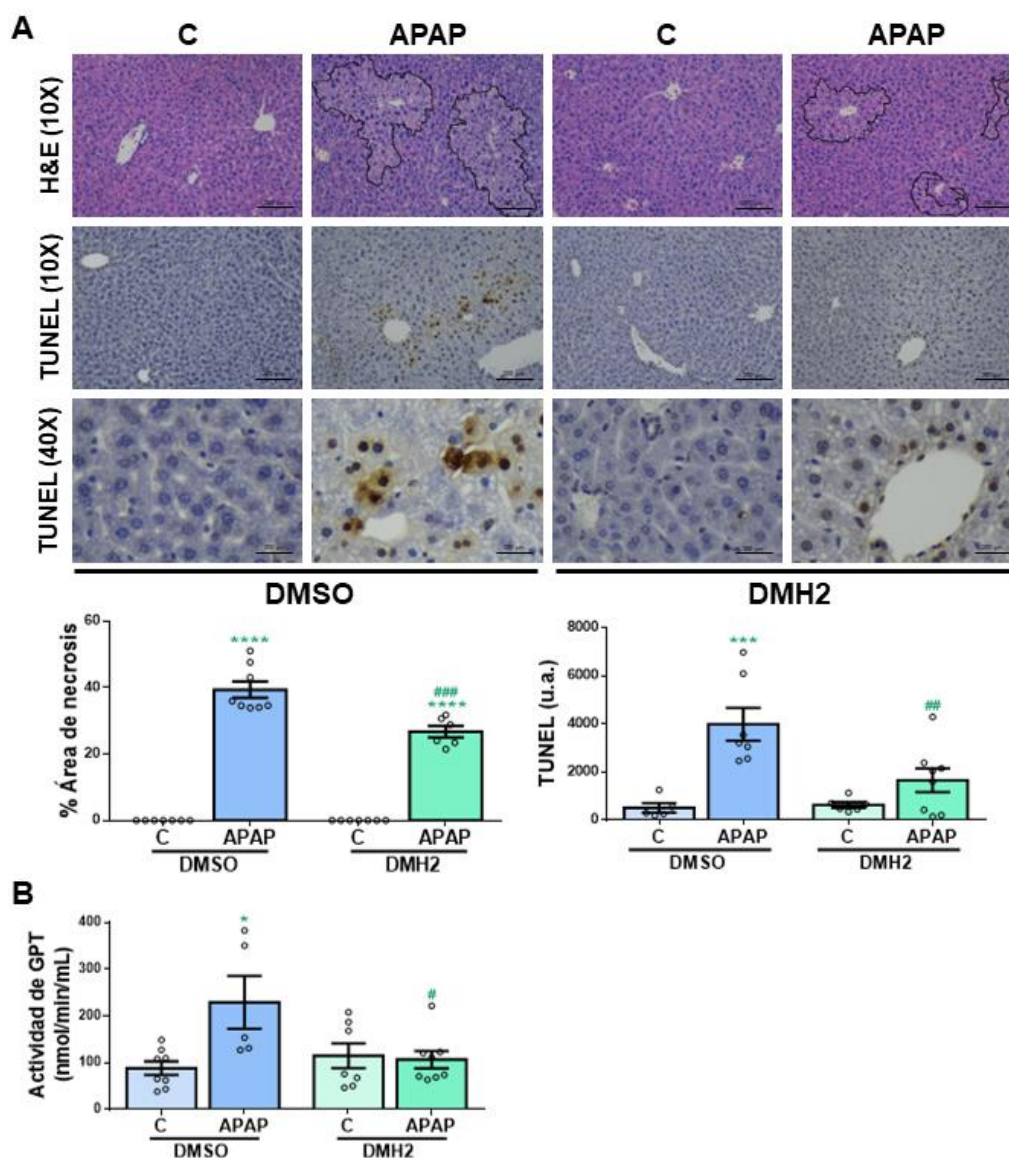


Figura 23. El inhibidor DMH2 protege frente a la hepatotoxicidad inducida por APAP *in vivo*. **A.** Imágenes representativas de Hematoxilina y Eosina (H&E) (10X) y de TUNEL (10X y 40X) y sus cuantificaciones. Los datos están expresados como porcentaje de área de necrosis o unidades arbitrarias (u.a.) **B.** Determinación en suero de la actividad de GPT. Los datos están presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Ratones sometidos a una sobredosis de APAP (500 mg/kg) o DMSO y tratados 1 hora después con DMH2 (3 mg/kg) o DMSO, y sacrificados 2 horas después del APAP. (n=7 animales por grupo). *p<0,05, ***p<0,005 y ****p<0,0001 APAP vs. C; #p<0,05, ##p<0,01 y ###p<0,005 DMH2 vs. DMSO.

Con el fin de evaluar los efectos del tratamiento con DMH2 en la producción de ROS y la activación de mecanismos antioxidantes inducido por APAP, se cuantificó mediante inmunohistoquímica (IHQ) la expresión hepática de 4-HNE, un producto secundario de la peroxidación lipídica que se utiliza ampliamente para detectar estrés oxidativo. Notablemente,

la expresión de 4-HNE fue significativamente menor en los hígados procedentes de animales tratados con DMH2 que en aquellos tratados con el vehículo (Figura 24A). Asimismo, se midió la expresión hepática del regulador antioxidante HO1. Como era de esperar, se observó un evidente incremento en la expresión del gen *Hmox1* en las muestras hepáticas procedentes de ratones expuestos a sobredosis de APAP; sin embargo, este incremento fue más moderado en presencia de DMH2 (Figura 24B).

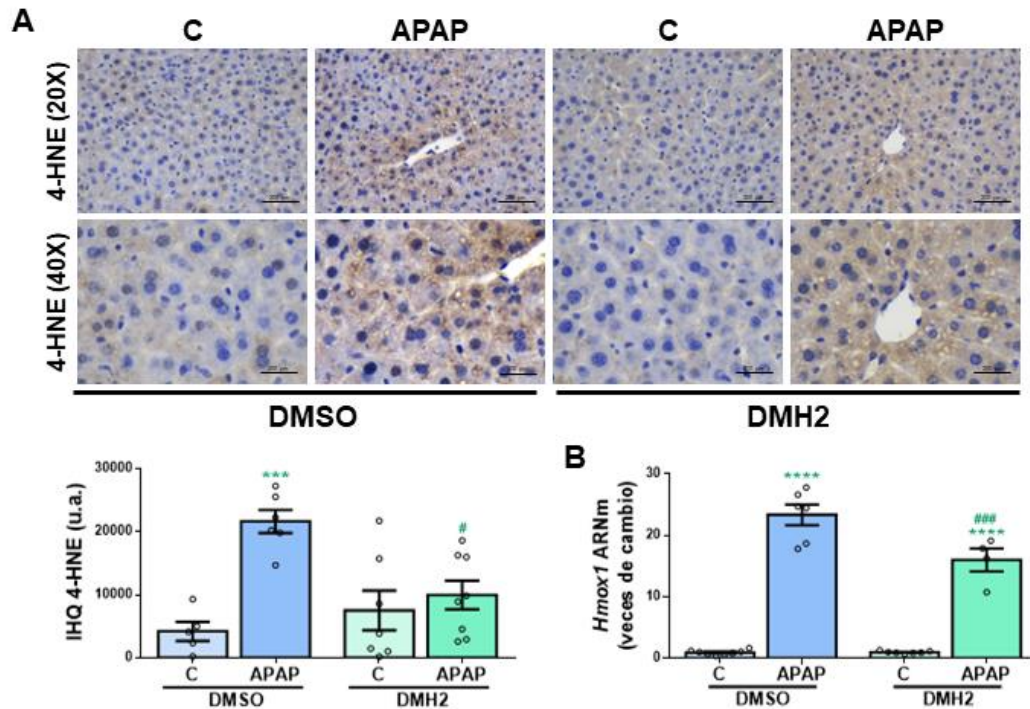


Figura 24. El inhibidor DMH2 protege frente al estrés oxidativo inducido por APAP *in vivo*. **A.** Imágenes representativas de 4-HNE detectado mediante IHQ en el tejido hepático (20X y 40X) y su cuantificación. Los datos están expresados como u.a. **B.** Nivel de ARNm del gen *Hmox1*, determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36b4*. Los datos están expresados como veces de cambio relativo a la condición control (C-DMSO, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Ratones sometidos a una sobredosis de APAP (500 mg/kg) o DMSO y tratados 1 hora después con DMH2 (3 mg/kg) o DMSO, y sacrificados 2 horas después del APAP. (n=7 animales por grupo). *** $p < 0,005$ y **** $p < 0,0001$ APAP vs. C; # $p < 0,05$ y ### $p < 0,005$ DMH2 vs. DMSO.

5. CONCLUSIÓN

Ya se había demostrado la implicación de la vía de señalización de las BMP en la fisiopatología de enfermedades hepáticas crónicas tales como la NAFLD y la fibrosis hepática o el HCC (Liang et al., 2021; Thayer et al., 2020), pero su papel en ALF no queda claro ya que existen evidencias contradictorias en cuanto a la activación o inhibición de esta ruta de señalización en modelos de DILI por APAP (Stavropoulos et al., 2022; van Swelm et al., 2012). Este estudio identifica un novedoso papel de la vía de transducción de señal de las BMP en

Resultados y Discusión: Capítulo I

ALF, particularmente indica que la inhibición de ALK3 protege del daño hepático inducido por sobredosis de APAP.

Los experimentos *in vitro* demostraron que la inhibición de ALK3, y no la de ALK2, protege frente a la hepatotoxicidad inducida por APAP: tanto el silenciamiento génico de ALK3 como su inhibición farmacológica utilizando el compuesto DMH2 reducen la necrosis, evaluada por la liberación de LDH, la apoptosis medida por el procesamiento de caspasa 3, y la producción de ROS. Es más, se detectó un incremento constitutivo del gen antioxidante *HMOX1* tanto en las células silenciadas en ALK3 como en las tratadas con DMH2, lo cual sugiere que estas células presentan una defensa antioxidante más activa frente a estresores oxidativos tales como el APAP (Figura 25). Cabría pensar que los efectos protectores observados se deben a la sobreexpresión concomitante de ALK2 observada en las células cuando se silencia o inhibe el ALK3. Sin embargo, la sobreexpresión de ALK2 en células Huh7 no mejoró la viabilidad celular ni modificó la respuesta al estrés oxidativo inducido por el APAP, aunque las células que sobreexpresan ALK2 mostraron una gran capacidad anti-apoptótica. Futuras investigaciones son necesarias para dilucidar en profundidad los mecanismos moleculares implicados en el nuevo papel de los receptores ALK2 y ALK3 en la defensa antioxidante y en la apoptosis que se han mostrado por primera vez en este estudio.

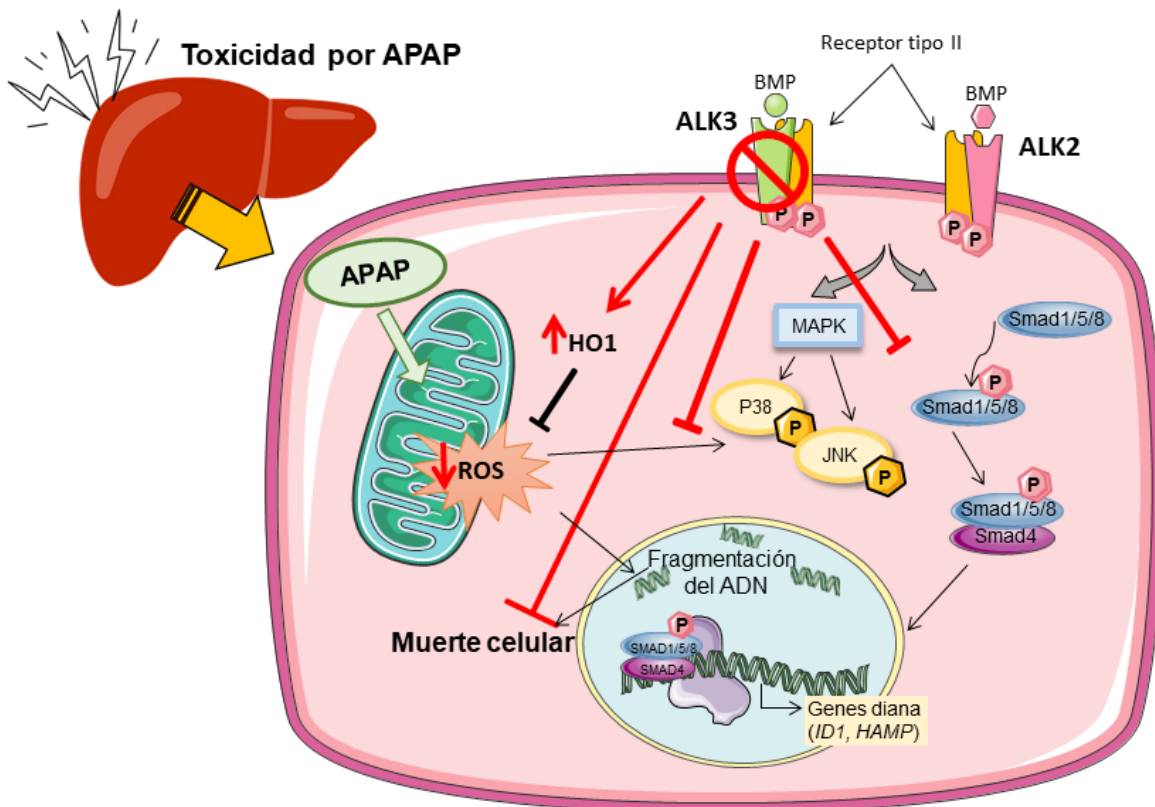


Figura 25. La inhibición de la ruta de señalización mediada por ALK3 protege frente al daño hepático inducido por APAP. La inhibición de la señalización mediada por ALK3 mediante silenciamiento génico de dicho receptor, o con el inhibidor farmacológico DMH2, reduce la muerte celular y el estrés oxidativo inducidos por APAP.

Asimismo, en el presente estudio se aporta evidencia experimental convincente de que la inhibición farmacológica de la señalización de BMP utilizando DMH2 disminuye de forma evidente la necrosis hepatocitaria, reduce los niveles de transaminasas en suero, y previene del estrés oxidativo inducido por la sobredosis de APAP en ratones, sugiriendo por primera vez que ALK3 puede ser una nueva diana terapéutica para ALF.

Estos hallazgos experimentales abren un nuevo enfoque terapéutico para pacientes con ALF por sobredosis de APAP y, por tanto, se requieren futuros estudios para evaluar la seguridad y eficacia de actuar sobre la señalización de BMP en pacientes con esta patología con alto riesgo de mortalidad.

CAPÍTULO II

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA 6 (BMP6) EN MODELOS EXPERIMENTALES DE FALLO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO POR PARACETAMOL.

Como se ha comentado en el capítulo anterior, las proteínas BMP juegan un papel clave en la homeostasis del hierro en el hígado, regulando la expresión de la hepcidina; especialmente BMP6, cuya expresión se ha visto modulada en modelos preclínicos y en pacientes con sobrecarga de hierro (Daher et al., 2016; Kautz et al., 2011; Rausa et al., 2015). Del mismo modo, la expresión y señalización de estas proteínas se ha visto modificada en modelos de ALF, particularmente dos estudios han puesto de manifiesto un incremento en la expresión hepática de BMP2 y BMP4 en modelos animales de ALF (Nakatsuka et al., 2007; Oumi et al., 2012).

Dado que el ALF presenta una progresión fulminante, un diagnóstico y pronóstico precisos son de gran importancia a la hora de tomar decisiones tales como susceptibilidad de cada paciente para ser sometido a hospitalización o trasplante hepático. Por esta razón, se han empleado grandes esfuerzos en la búsqueda de nuevos biomarcadores serológicos para el pronóstico de ALF.

El objetivo de este estudio fue dilucidar si el perfil de expresión de la proteína BMP6, que está involucrada en la regulación de la homeostasis del hierro en el hígado, se encuentra modulado en el ALF inducido por APAP y estudiar el papel de esta proteína en los procesos moleculares involucrados en este tipo de daño.

1. Evaluación de la expresión de BMP6 en un modelo experimental de ALF inducido por APAP

Para evaluar la modulación de la expresión de BMP6 se llevó a cabo un modelo animal de ALF mediante la exposición a una sobredosis de APAP. Para ello, tras 12 horas de ayuno, se administró a los ratones 300 mg/kg de APAP por vía intraperitoneal (i.p.) y se sacrificaron 6 horas o 24 horas después de la administración. Como era de esperar, se observaron áreas necróticas en el tejido hepático de estos animales (Figura 26A), así como un incremento de la actividad de las transaminasas GPT y GOT en las muestras de suero de los ratones tratados con APAP en comparación a los animales control (Figura 26B). El incremento tanto de las áreas de necrosis como de las transaminasas en suero fue más evidente tras 24 horas de la administración de APAP. Asimismo, ya se ha comentado que cuando se produce una

Resultados y Discusión: Capítulo II

sobredosis de APAP se activan mecanismos antioxidantes con el fin de reducir el estrés oxidativo producido como consecuencia de la depleción de glutatión (Reid et al., 2005). En este sentido, se observó que la expresión hepática del gen de hemoxigenasa 1 (*Hmox1*), está incrementada en los ratones sometidos a sobredosis de APAP, especialmente 6 horas después de la administración (Figura 26C).

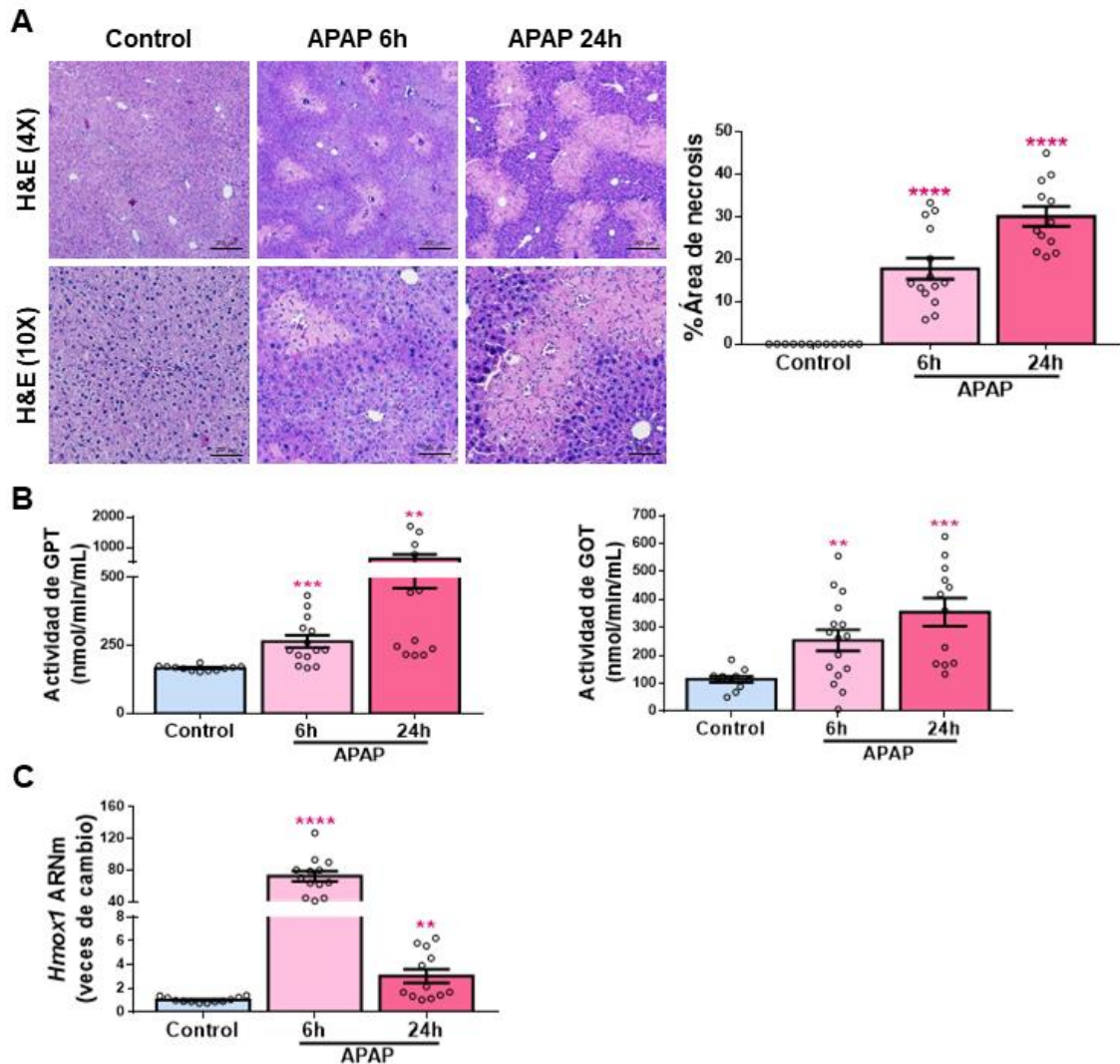


Figura 26. Modelo experimental de ALF inducido por APAP. **A.** Imágenes representativas de las tinciones con Hematoxilina y Eosina (H&E) (4X y 10X) y cuantificación del área de necrosis expresada en porcentaje de área. **B.** Determinación en suero de la actividad de GPT y GOT. **C.** Nivel de ARNm del gen *Hmox1*, determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36b4*. Los datos están expresados como veces de cambio relativo a la condición control (Control, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Ratones sometidos a una sobredosis de APAP (300 mg/kg) y sacrificados 6 y 24 horas después del APAP. (n>12 animales por grupo). **p<0,01, ***p<0,005 y ****p<0,0001, APAP vs. Control.

1.1. La expresión hepática de BMP6 se encuentra aumentada en el hígado de ratones sometidos a un modelo experimental de DILI por APAP

Una vez establecido el modelo, se cuantificó la expresión hepática a nivel de ARNm de BMP6, para ello se realizó la extracción de ARN de las muestras de tejido hepático y se analizó la expresión del gen *Bmp6* mediante RT-qPCR, observando un incremento de expresión hepática de BMP6 6 horas después de la administración de APAP (Figura 27A). De hecho, los niveles de ARNm hepáticos del gen *Bmp6* correlacionan de manera significativa con los niveles hepáticos del gen *Hmox1* (Figura 27B). Hasta el momento, sólo existe un estudio donde se cuantifique la expresión hepática de BMP6 en un modelo de DILI por APAP. En dicho estudio se muestra que el ALF inducido por APAP conduce a una sobrecarga hepática de hierro debida a una disminución de la síntesis de hepcidina. Cabe destacar que los resultados referidos difieren con los presentados en esta Tesis, ya que se encontró una expresión reducida de BMP6 a nivel de ARNm, tras el tratamiento con APAP (van Swelm et al., 2012); sin embargo, la expresión hepática de BMP6 sólo fue cuantificada en aquellos ratones sometidos al modelo con APAP que presentaron más de 1000 U/L de GPT en suero, niveles mucho más elevados que los presentes en los ratones incluidos en este estudio. Además, en dicho estudio los ratones fueron sacrificados 24 horas después de la administración de APAP, mientras que, en este estudio, el incremento de expresión del gen *Bmp6* se detectó 6 horas después del APAP y dicha expresión se redujo tras 24 horas.

A continuación, para comprobar si el aumento detectado a nivel de ARNm se tradujo a nivel de proteína, se realizó un análisis mediante IHQ en el tejido hepático donde se observó una mayor presencia de la proteína BMP6 en las muestras procedentes de los ratones con APAP en comparación a los controles (Figura 27C). En este caso el incremento de expresión de BMP6 se observó tanto a las 6 horas como a las 24 horas posteriores a la administración de APAP, correlacionando positivamente con el porcentaje de área de necrosis (Figura 27D).

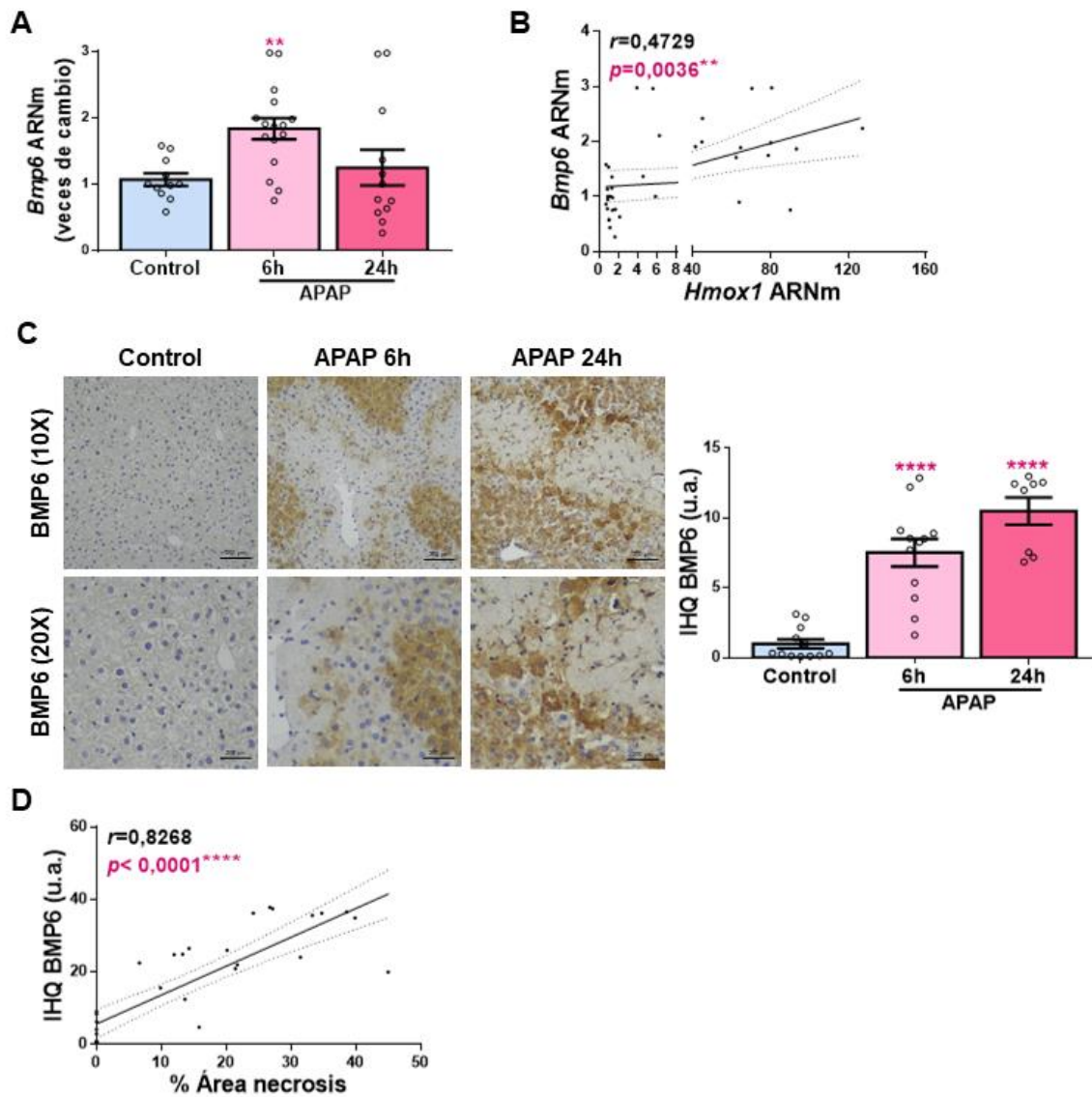


Figura 27. La expresión hepática de BMP6 está aumentada en un modelo experimental de ALF inducido por APAP. A. Expresión hepática de ARNm del gen *Bmp6* determinada mediante RT-qPCR y normalizada con el gen *36b4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (Control, 1). **B.** Análisis de la correlación entre los niveles de ARNm del gen *Bmp6* y el gen *Hmox1*. **C.** Imágenes representativas de BMP6 detectado mediante IHQ en el tejido hepático (10X y 20X) y su cuantificación. Los datos están expresados como unidades arbitrarias (u.a.) y presentados como media \pm SEM. **D.** Análisis de la correlación entre la expresión hepática de BMP6 y el porcentaje de área de lesión. Condiciones experimentales: Ratones sometidos a una sobredosis de APAP (300 mg/kg) y sacrificados 6 y 24 horas después del APAP. ($n > 12$ animales por grupo). $^{**}p < 0,01$ y $^{****}p < 0,0001$, APAP vs. Control.

1.2. La concentración circulante de BMP6 se encuentra aumentada en el suero de ratones sometidos a un modelo de ALF por APAP

Puesto que el objetivo principal del estudio fue evaluar el potencial de BMP6 como biomarcador serológico de ALF, una vez detectado el aumento de expresión hepática de esta proteína BMP en ratones sometidos a sobredosis de APAP, se quiso comprobar si dicho aumento de expresión se reflejaba a nivel circulante. Para ello, se determinó mediante ELISA la concentración de BMP6 en las muestras de suero de los animales sometidos al modelo experimental de DILI por APAP y se observó un incremento de BMP6 en el suero de los ratones tratados con APAP en comparación con los animales control tanto a las 6 horas como 24 horas después de la administración (Figura 28A). Además, se encontró una correlación significativa entre los niveles en suero de BMP6 y los niveles de BMP6 determinados mediante IHQ en el tejido hepático (Figura 28B), así como con la concentración en suero de la transaminasa GPT (Figura 28C). En un estudio previo se mostró que bajos niveles de hepcidina están asociados con una reducción de la supervivencia a corto plazo en adultos con ALF (Spivak et al., 2019); futuros estudios en cohortes de pacientes con ALF son necesarios para determinar el potencial de BMP6 como biomarcador sérico del pronóstico de esta patología.

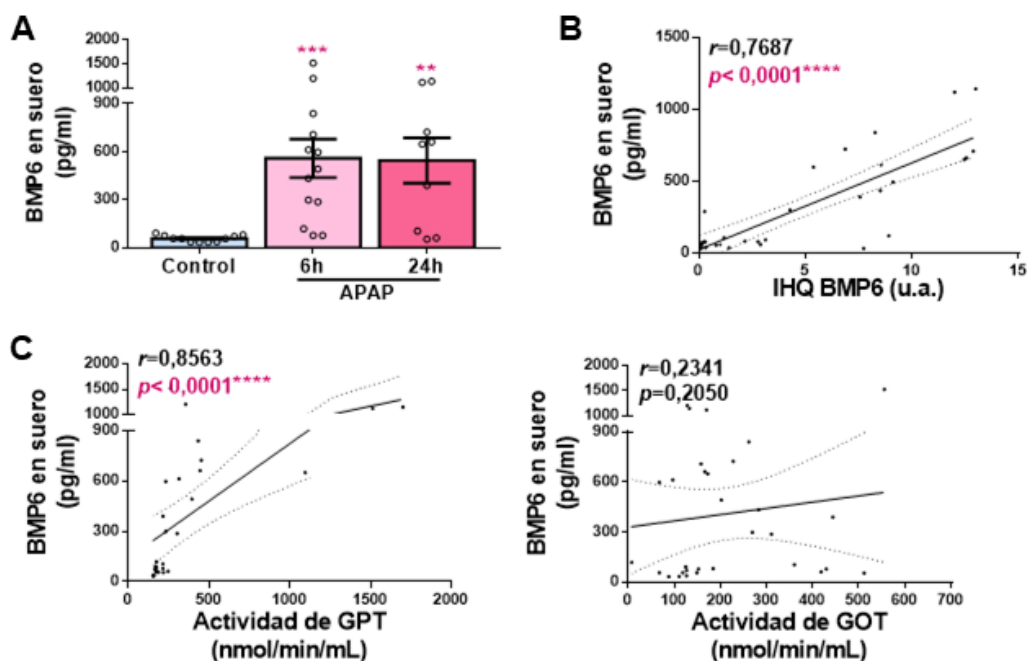


Figura 28. Niveles circulantes de BMP6 en el modelo experimental de ALF inducido por APAP.

A. Niveles circulantes de BMP6 determinados mediante ELISA. Los datos están expresados como pg/ml y presentados como media \pm SEM. **B y C.** Análisis de la correlación entre los niveles circulantes de BMP6 y la expresión hepática a nivel de proteína, y con la actividad de GPT y GOT en suero, respectivamente. Condiciones experimentales: Ratones sometidos a una sobredosis de APAP (300 mg/kg) y sacrificados 6 y 24 horas después del APAP. (n>12 animales por grupo). **p<0,01, ***p<0,005 y ****p<0,0001, APAP vs. Control.

2. Evaluación de la expresión circulante de BMP6 en una cohorte de pacientes con sobredosis de APAP

Tras los resultados obtenidos en el modelo animal de daño por APAP, donde el incremento de la expresión hepática de BMP6 en los ratones sometidos a una sobredosis de APAP se vio reflejado en una mayor concentración en suero de esta proteína, se quiso evaluar el potencial de BMP6 como marcador de daño por APAP en pacientes con sobredosis por este fármaco.

Para ello, se evaluó la concentración circulante de BMP6 en muestras de suero procedentes de una cohorte que incluyó 20 individuos expuestos a una sobredosis de APAP, 10 de los cuales desarrollaron DILI, mostrando valores de la transaminasa GPT superiores a 100 U/L. De hecho, el daño hepático fue muy significativo ya que en la mayoría de ellos el valor de esta transaminasa superó las 1000 U/L (GPT 4787 ± 2989). Los otros 10 individuos no desarrollaron DILI, lo cual se reflejó en valores normales de GPT en suero (GPT $18,70 \pm 10,58$).

La cuantificación de BMP6 circulante mostró un aumento en aquellos pacientes con DILI ($474,7 \pm 407,7$ pg/mL, n=10) en comparación con los que no desarrollaron este daño ($193,8 \pm 163,2$ pg/mL, $p=0,0558$, n=10, Figura 29A). De hecho, se observó una correlación positiva que fue significativa entre la concentración sérica de BMP6 y los niveles de GPT en suero ($r=0,5273$, n=20, $p=0,0245$, Figura 29B).

Actualmente, algunos biomarcadores como la proteína GLDH o el microRNA-122 han sido propuestos como marcadores pronósticos de DILI inducido por APAP, aunque se ha observado que presentan baja sensibilidad o variaciones intra e interindividuales; hasta el momento, el marcador más prometedor es el aducto APAP-CYS. Los resultados mostrados en este estudio posicionan a BMP6 como un posible biomarcador del pronóstico de DILI por APAP; el hecho de que la concentración en suero de esta proteína esté relacionada con los niveles de GPT indican que podría ser un marcador de la gravedad del daño hepático. Sin embargo, es necesario estudiar cohortes más extensas poder establecer la relación de esta proteína BMP con el desarrollo o la gravedad de esta patología.

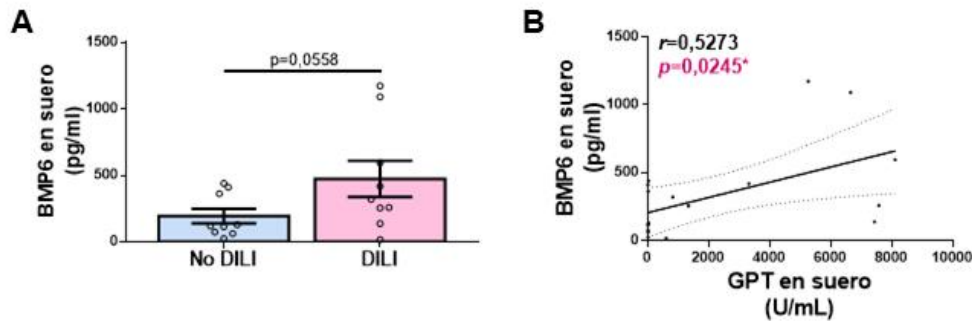


Figura 29. Cuantificación de BMP6 circulante en una cohorte de pacientes con sobredosis de APAP. A. Niveles circulantes de BMP6 determinados mediante ELISA. Los datos están expresados como pg/ml y presentados como media \pm SEM. **B.** Análisis en la población de estudio de la correlación entre los niveles circulantes de BMP6 y GPT. Población de estudio: 20 pacientes con sobredosis de APAP, 10 con DILI, y 10 sin DILI.

3. Caracterización de la expresión y liberación de BMP6 en un modelo *in vitro* de DILI por APAP

En un intento de reproducir el modelo experimental *in vitro* para poder profundizar en los mecanismos moleculares asociados al daño hepático por APAP, se llevó a cabo un protocolo de muerte celular utilizando la línea celular de hepatocitos neonatales inmortalizados murinos (WTiib) y las células Huh7 que fueron tratadas con diferentes dosis de APAP a diferentes tiempos. A continuación, se estudió la liberación y expresión de BMP6 en estas células.

3.1. **Expresión y liberación de BMP6 en hepatocitos murinos en presencia de APAP**

Las células WTiib se trataron con las dosis 1 mM y 5 mM de APAP durante 16 horas, siguiendo el protocolo previamente descrito (Mobasher et al., 2013). Como se observa en las imágenes representativas de tinción con DAPI, el tratamiento con APAP a estas dosis tiene un efecto citotóxico que se refleja en una mayor presencia de núcleos apoptóticos (Figura 30A). Este efecto también se observó en el ensayo de viabilidad celular mediante tinción con cristal violeta, donde se comprobó que la toxicidad es dosis-dependiente (Figura 30B).

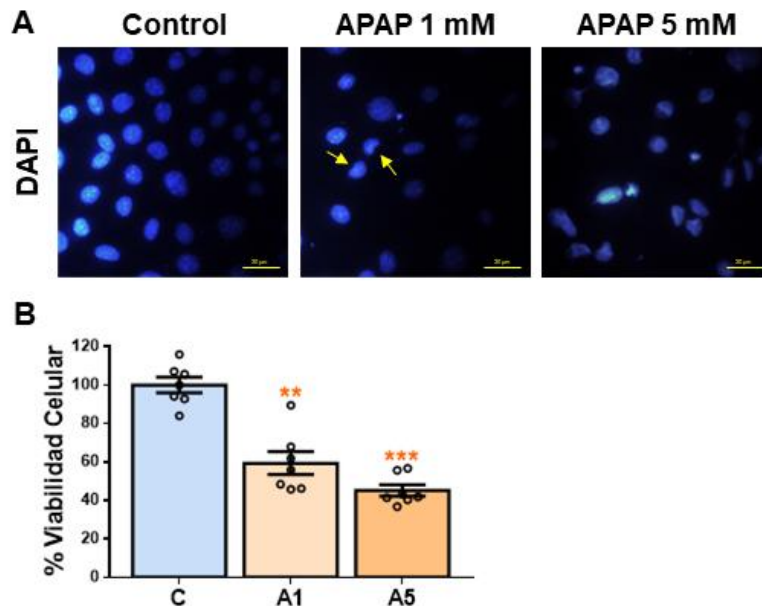


Figura 30. Modelo *in vitro* de muerte celular por APAP en la línea de hepatocitos murinos WTiib.

A. Imágenes representativas de núcleos apoptóticos teñidos con DAPI. **B.** Viabilidad celular determinada mediante tinción con cristal violeta. Los datos están expresados como porcentaje de viabilidad relativo al grupo control (C, 100%) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células WTiib estimuladas con APAP a 1 mM (A1) o a 5 mM (A5) y etanol como control (C) durante 16 horas. ($n > 3$ experimentos independientes realizados por duplicado). ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$, A1 o A5 vs. C.

Una vez establecido el modelo *in vitro* se estudió la expresión del gen *Bmp6* en estas células y se observó un incremento en su expresión en aquellas tratadas con APAP en comparación con los controles (Figura 31A). Puesto que en el modelo animal se observó que el incremento de expresión hepática se reflejó en una mayor concentración de esta proteína en suero, se decidió evaluar la presencia de esta proteína en el medio condicionado (MC) de los hepatocitos. Como se presenta en la Figura 31B, se detectó presencia de BMP6 en el sobrenadante de las células tratadas con APAP, lo cual no se observó en las células control.

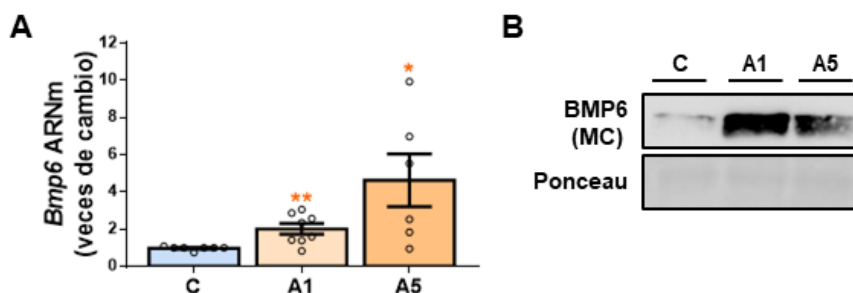


Figura 31. Los hepatocitos murinos expresan y secretan BMP6 en presencia de APAP. **A.** Nivel de ARNm del gen *Bmp6* determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36b4*. Los datos están expresados como veces de cambio relativo a la condición control (C, 1) y presentados como media \pm SEM. **B.** Imágenes representativas de Western blot del medio condicionado (MC) de WTiib con el anticuerpo frente a BMP6 y la tinción con Ponceau como control de carga. Condiciones experimentales: Células WTiib estimuladas con APAP a 1 mM (A1) o a 5 mM (A5) y etanol como control (C) durante 16 horas. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). *p<0,05, A1 o A5 vs. C.

3.2. Expresión y liberación de BMP6 en células Huh7 en presencia de APAP

Tras los resultados obtenidos en la línea de hepatocitos neonatales murinos inmortalizados, se utilizaron las células derivadas de hepatoma Huh7 para comprobar si el efecto del APAP sobre la expresión de BMP6 sucede en otros tipos celulares. Para ello, las células se estimularon con APAP a 10 mM o a 20 mM durante 6, 16 o 24 horas, según el protocolo utilizado previamente (Mobasher et al., 2013). Similar a lo que sucede en las células WTiib, el APAP tienen un efecto hepatotóxico en las células Huh7, reflejado en una mayor presencia de núcleos apoptóticos y restos celulares detectables gracias a la tinción nuclear con DAPI (Figura 32A), así como una disminución de la supervivencia celular de manera dosis y tiempo-dependiente (Figura 32B).

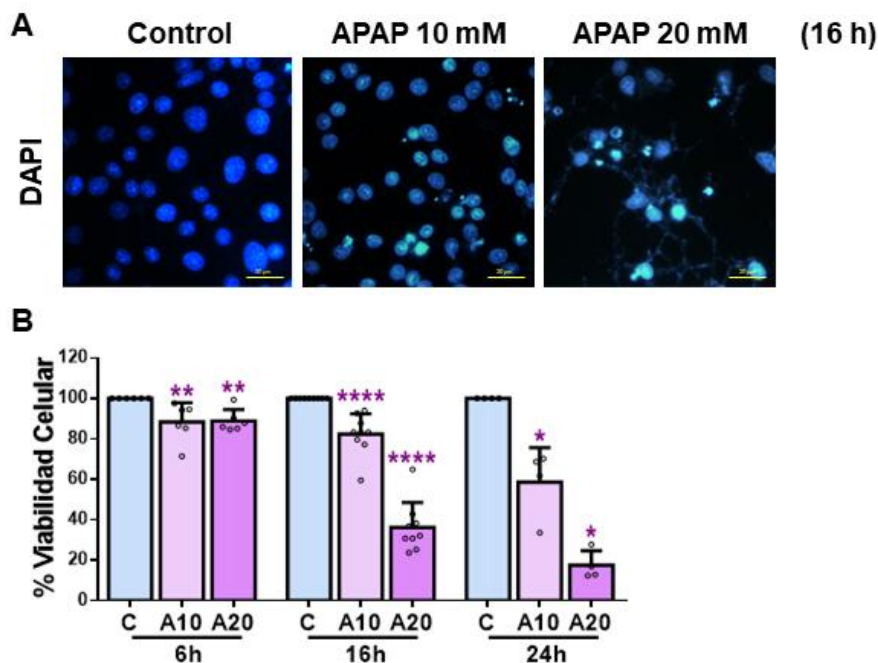


Figura 32. Modelo *in vitro* de muerte celular por APAP en las células Huh7. **A.** Imágenes representativas de núcleos apoptóticos teñidos con DAPI. **B.** Viabilidad celular determinada mediante tinción con cristal violeta. Los datos están expresados como porcentaje de viabilidad relativo al grupo control (C, 100%) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células Huh7 estimuladas con APAP a 10 mM (A10) o a 20 mM (A20) y etanol como control (C) durante 6, 16 o 24 horas. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). *p<0,05, **p<0,01 y ****p<0,0001, A10 o A20 vs. C.

Resultados y Discusión: Capítulo II

Una vez establecidas las condiciones de dosis y tiempo, se cuantificó la expresión a nivel de ARNm del gen *BMP6* y se observó un incremento de expresión de manera dosis-dependiente en las células tratadas con APAP en comparación con los controles (Figura 33A). Asimismo, estas células también parecen liberar la proteína BMP6 en presencia de APAP, ya que se detectó en el MC de las células tratadas con APAP a 20 mM durante 16 horas lo cual no se observó ni en los controles ni en las células tratadas con una dosis menor de APAP (Figura 33B).

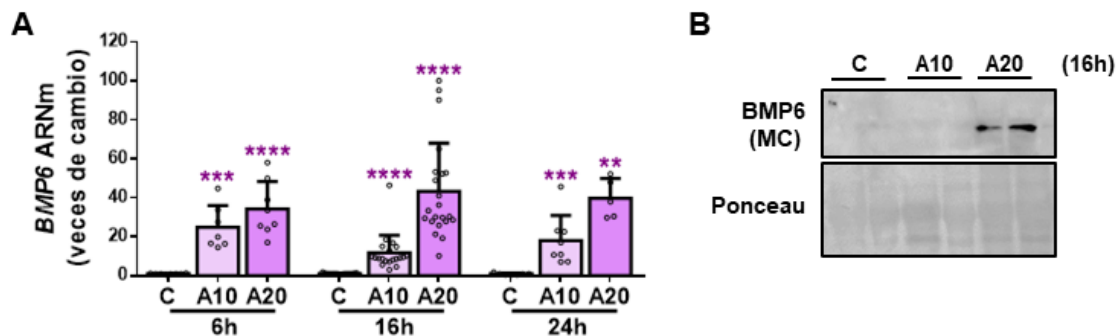


Figura 33. Las células Huh7 expresan y secretan BMP6 en presencia de APAP. A. Nivel de ARNm del gen *BMP6* determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (C, 1) y presentados como media \pm SEM. **B.** Imágenes representativas de Western blot del medio condicionado (MC) de Huh7 con el anticuerpo frente a BMP6 y la tinción con Ponceau como control de carga. Condiciones experimentales: Células Huh7 estimuladas con APAP a 10 mM (A10) o a 20 mM (A20) y etanol como control (C) durante 6, 16 o 24 horas. ($n > 3$ experimentos independientes realizados por duplicado). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$ y **** $p < 0,0001$, A10 o A20 vs. C.

4. Efecto del silenciamiento transitorio de BMP6 en la línea Huh7 en un modelo *in vitro* de DILI por APAP

Dado el significativo incremento de la expresión y liberación de BMP6 observada en las células en presencia de APAP, se quiso explorar si esta proteína ejerce alguna función biológica en estas condiciones. Con este objetivo, se llevó a cabo un silenciamiento transitorio de BMP6 en la línea Huh7 previo al tratamiento con APAP. Se confirmó mediante RT-qPCR que en las células transfectadas con siRNA para BMP6 (siBMP6), la expresión a nivel de ARNm del gen *BMP6* se redujo en condiciones basales (Figura 34A), y que el incremento de expresión inducido por APAP fue menor que en las células no silenciadas (siControl, siC) (Figura 34B).

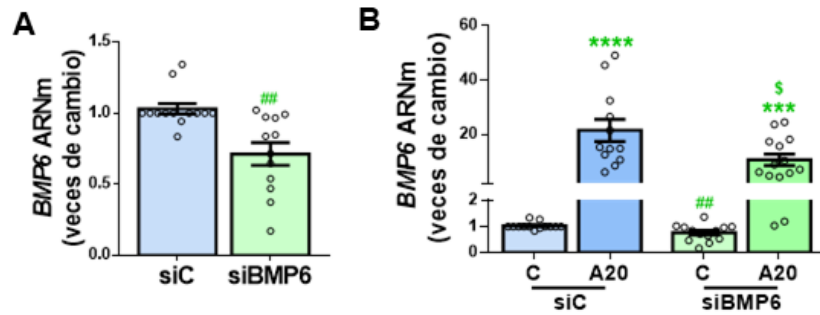
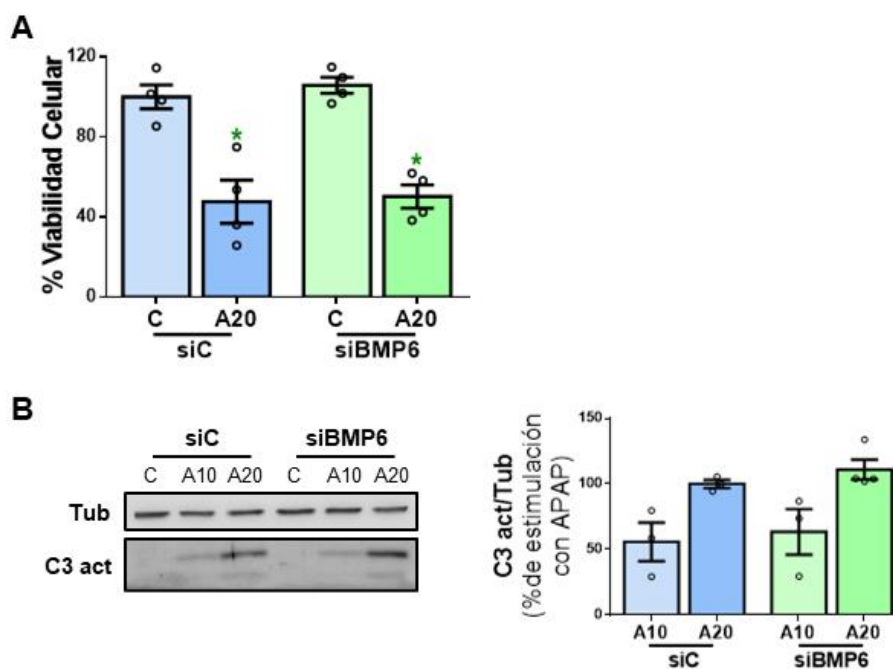


Figura 34. Silenciamiento transitorio de BMP6 en las células Huh7. A y B. Nivel de ARNm del gen *BMP6* determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (siC-C, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células Huh7 con silenciamiento transitorio de BMP6 (siBMP6) mediante transfección con siRNA y su control (siC). (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). *** p <0,005 y **** p <0,0001 A20 vs. C; ## p <0,01, siBMP6-C vs. siC-C; \$ p <0,05, siBMP6-A20 vs. siC-A20.

4.1. El silenciamiento de BMP6 en células Huh7 no muestra efectos contra el daño inducido por APAP

Una vez comprobada la eficacia del silenciamiento, se evaluó la respuesta de estas células a la estimulación con APAP. Se encontró que el silenciamiento de BMP6 no causó cambios en la supervivencia celular frente al APAP (Figura 35A) y no se observaron diferencias en el procesamiento de caspasa 3, entre las células control y las silenciadas en BMP6 (Figura 35B).



Resultados y Discusión: Capítulo II

Figura 35. El silenciamiento de BMP6 en Huh7 no protege de la toxicidad por APAP. **A.** Viabilidad celular determinada mediante tinción con cristal violeta. Los datos están presentados como porcentaje de viabilidad relativo al grupo control (C, 100%). **B.** Imágenes representativas de Western blot con anticuerpo frente al fragmento activo de caspasa 3 (C3 act) y su cuantificación normalizada con anticuerpo frente a tubulina (Tub) como control de carga. Los datos están presentados como porcentaje de estimulación con APAP relativo a la condición control (siC-A20, 100%) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Línea Huh7 con silenciamiento de BMP6 (siBMP6) y su control (siC) tratadas con APAP a 10 mM (A10) o a 20 mM (A20) o etanol como control (C) durante 16 horas. ($n > 3$ experimentos independientes realizados por duplicado). * $p < 0,05$, A20 vs. C.

Dado que BMP6 es liberado al medio de cultivo por los hepatocitos, se valoró el posible efecto paracrino de esta proteína sobre otras células vecinas. Para ello, se recogió el MC de Huh7 silenciadas en BMP6 o control, tratadas con APAP y se utilizó para estimular otras células Huh7 (Figura 36A). En primer lugar, se comprobó que la presencia de BMP6 observada en el medio de cultivo de estas células tras la exposición a APAP a 20 mM no fue detectable en células siBMP6 (Figura 36B). Curiosamente, no se observaron diferencias en la supervivencia celular tras la estimulación con el MC de Huh7 silenciadas o no en BMP6 (Figura 36C).

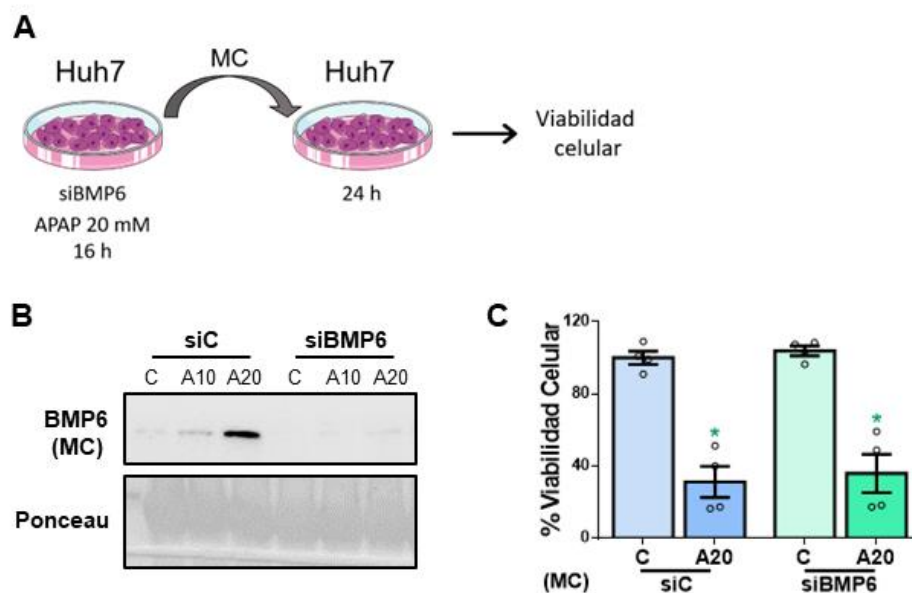


Figura 36. Efecto en células Huh7 del BMP6 secretado por Huh7 en presencia de APAP. **A.** Condiciones experimentales: Células Huh7 expuestas durante 24 horas al medio condicionado (MC) de células Huh7 silenciadas en BMP6 (siBMP6) o no (siC), tratadas con APAP a 20 mM (A20) o etanol como control (C) durante 16 horas. **B.** Imágenes representativas de Western blot del sobrenadante celular de células Huh7 siBMP6 o siC, con el anticuerpo frente a BMP6 y la tinción con Ponceau como control de carga. **C.** Viabilidad celular determinada mediante tinción con cristal violeta. Los datos están expresados como porcentaje de viabilidad relativo al grupo control (C, 100%) y presentados como media \pm SEM. ($n > 3$ experimentos independientes realizados por duplicado). * $p < 0,05$, A20 vs. C.

5. Efecto del silenciamiento transitorio de BMP6 en la línea Huh7 sobre la línea THP1

5.1. El silenciamiento de BMP6 en Huh7 previene la diferenciación de macrófagos hacia el fenotipo antiinflamatorio (M2)

La muerte masiva de hepatocitos característica de ALF (Chung et al., 2012), supone la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMP) al tejido circundante, que conduce a la activación de macrófagos, liberación de citoquinas por estas células y reclutamiento de neutrófilos y monocitos a la zona dañada (Rada et al., 2018; Ramachandran & Jaeschke, 2018).

Puesto que la liberación de BMP6 no mostró efectos sobre otros hepatocitos, se quiso estudiar el posible efecto de esta proteína sobre otros tipos celulares presentes en el tejido hepático; más específicamente, en la activación de macrófagos como parte de la respuesta inflamatoria desencadenada como consecuencia del daño.

Con este objetivo, se expusieron macrófagos humanos THP1 durante 24 horas al MC de células Huh7 con silenciamiento o no de BMP6 y tratadas con APAP a 20 mM durante 16 horas (Figura 37A). Se observó un significativo incremento de marcadores tanto pro como antiinflamatorios tras la exposición al MC de Huh7 tratadas con APAP. Sin embargo, el MC de las células silenciadas en BMP6 produjo un menor incremento de expresión de los marcadores de fenotipo M2 interleuquina (IL) 4, arginasa 1 y receptor de manosa C-tipo 1 (MRC1) asociados a efectos antiinflamatorios (Figura 37B). Por el contrario, el incremento de expresión de la citoquina antiinflamatoria IL13, no se vio afectado por el silenciamiento previo de BMP6 en Huh7, similar a lo observado en las citoquinas proinflamatorias IL1 β , IL6 y TNF α (Figura 37C).

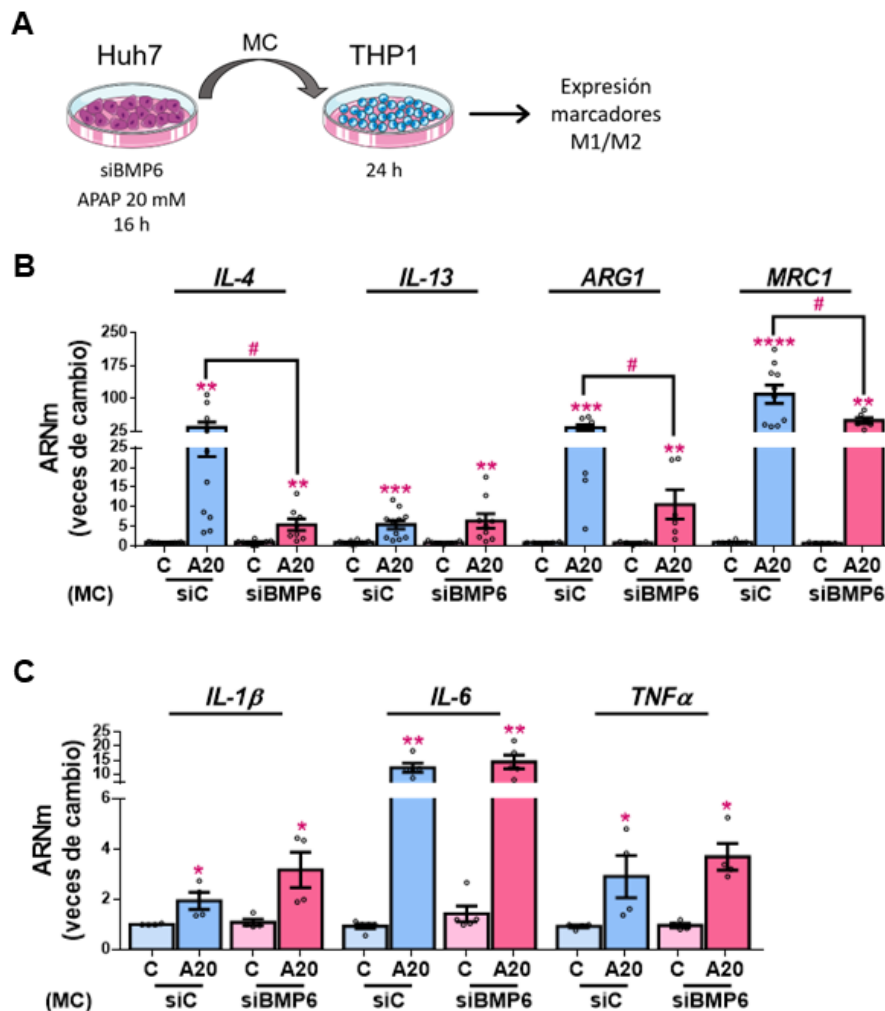


Figura 37. Efecto en macrófagos del BMP6 secretado por células Huh7 en presencia de APAP. A. Condiciones experimentales: Células THP1 expuestas durante 24 horas al medio condicionado (MC) de Huh7 silenciadas en BMP6 (siBMP6) o no (siC), tratadas con APAP a 20 mM (A20) o etanol como control (C) durante 16 horas. **B y C.** Niveles de ARNm de los genes *IL-4*, *IL-13*, *ARG1* y *MRC1* (**B**) e *IL-1β*, *IL-6* y *TNFα* (**C**) determinados mediante RT-qPCR y normalizados con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (siC MC-C, 1) y presentados como media ± SEM. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005 y ****p<0,0001, A20 vs. C; #p<0,05, MC siBMP6 vs. MC siC.

5.2. BMP6 promueve la diferenciación de macrófagos humanos hacia el fenotipo antiinflamatorio (M2)

Con el fin de esclarecer si los efectos observados fueron consecuencia de la presencia o ausencia de BMP6 en el MC, se estimuló la línea THP1 directamente con BMP6 (10 o 100 ng/ml) durante 24 horas. Se observó un incremento en la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL4 y de los marcadores antiinflamatorios arginasa 1 y MRC1 tras la estimulación con BMP6 (Figura 38A), mientras que la expresión de marcadores

proinflamatorios: IL1 β , IL6 y TNF α no se vio modulado (Figura 38B). Cabe destacar que BMP6 no afectó a la expresión de IL13. Estos resultados sugieren que la proteína BMP6 liberada por los hepatocitos puede tener un impacto en los macrófagos hepáticos promoviendo su diferenciación hacia el fenotipo antiinflamatorio (M2).

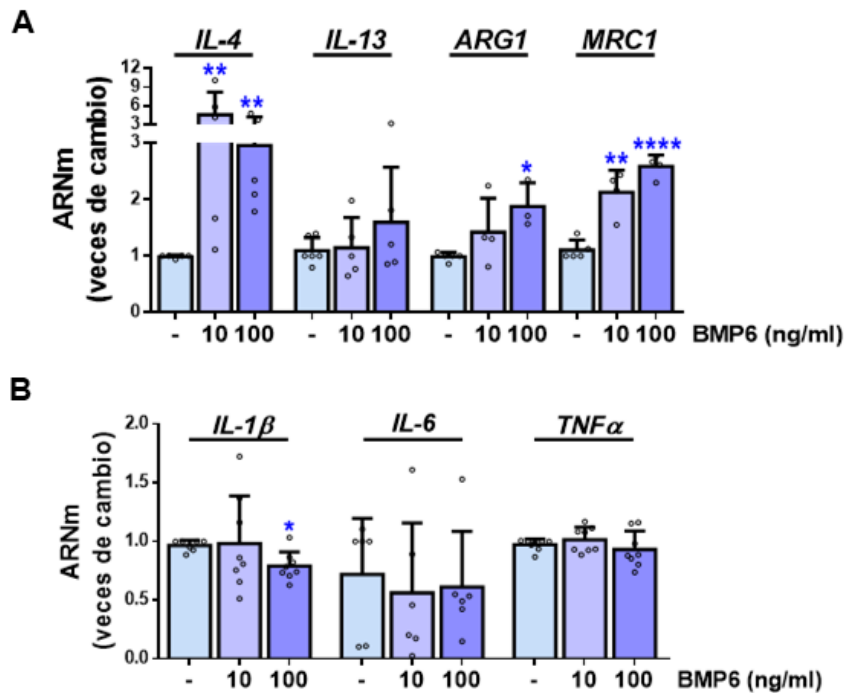


Figura 38. BMP6 promueve la diferenciación de macrófagos humanos hacia el fenotipo antiinflamatorio (M2) A y B. Niveles de ARNm de los genes *IL-4*, *IL-13*, *ARG1* y *MRC1* (A) e *IL-1 β* , *IL-6* y *TNF α* (B) determinados mediante RT-qPCR y normalizados con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (siC MC-C, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células THP1 tratadas con BMP6 a 10 o 100 ng/ml o con vehículo (-) durante 24 horas. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). *p<0,05, **p<0,01 y ****p<0,0001, BMP6 10 o 100 ng/ml vs. -.

En similitud con estos resultados, un estudio reveló que BMP6 también promueve la expresión de IL10, otra citoquina que suprime la inflamación en macrófagos, en células THP1 (Lee et al., 2013). Estos resultados obtenidos utilizando líneas de macrófagos humanos son contrarios a los efectos de BMP6 presentados previamente en macrófagos murinos, donde se observó que BMP6 induce la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL1 β (Kwon et al., 2009; Lee et al., 2011). La diferencia en los resultados obtenidos puede residir en que tratándose de diferentes tipos celulares sean necesarias distintas dosis o tiempos para observar dicho aumento de marcadores antiinflamatorios.

6. CONCLUSIÓN

Como ya se ha comentado, debido a su progresión fulminante es necesario un diagnóstico y pronóstico precoz del ALF para facilitar su correcto manejo. En este sentido, la búsqueda de biomarcadores serológicos es esencial. En los resultados presentados en este estudio se demuestra que tanto los niveles hepáticos de BMP6 como los circulantes están elevados en ratones sometidos a un modelo de ALF inducido por APAP. De hecho, el contenido circulante de BMP6 en pacientes con sobredosis de APAP mostró una correlación positiva y significativa con los niveles en suero de la transaminasa GPT, posicionando esta proteína como un posible nuevo biomarcador para diagnóstico y/o pronóstico de DILI por APAP.

Por otro lado, también se aportan nuevos conocimientos referentes a la contribución de BMP6 en la respuesta inflamatoria, más específicamente, en la comunicación entre hepatocitos y macrófagos tras el tratamiento con APAP. Los resultados en el sistema celular propuesto sugieren que, durante la necrosis de los hepatocitos, BMP6 se libera y promueve la expresión de marcadores M2 en macrófagos, en un intento de contrarrestar la respuesta inflamatoria (Figura 39). De hecho, la ausencia de BMP6 en el MC de hepatocitos tratados con APAP, debilita esta respuesta M2, favoreciendo el ciclo de inflamación en respuesta al APAP; sin embargo, futuras investigaciones son necesarias para terminar de establecer el papel de BMP6 en la inflamación inducida por APAP.

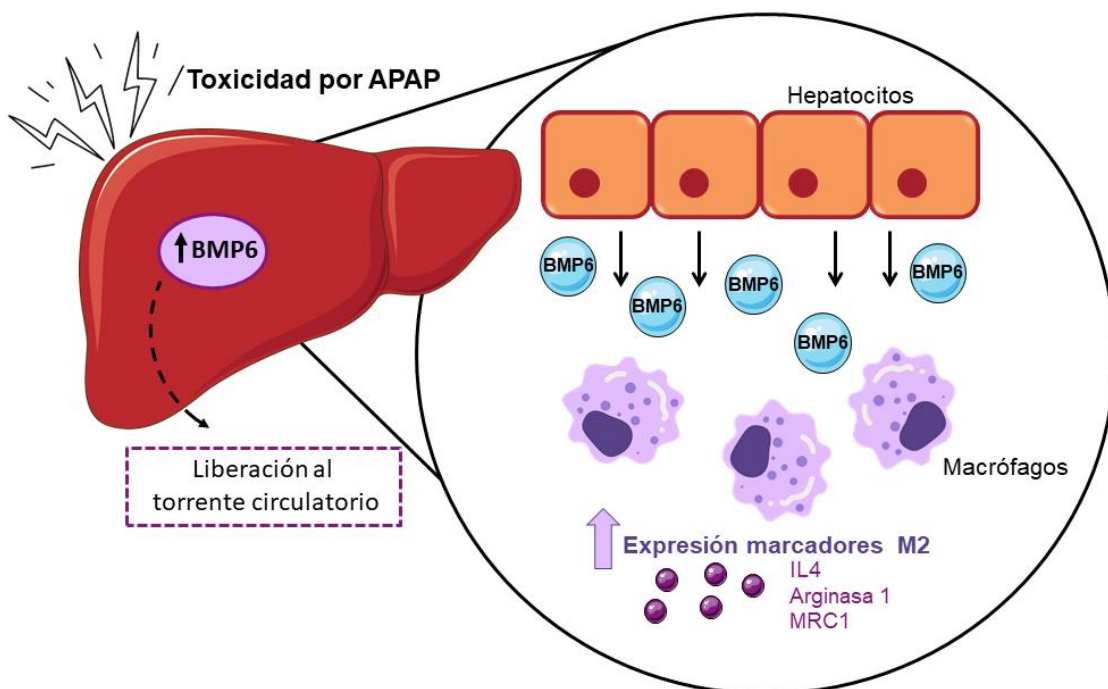


Figura 39. El aumento de expresión hepática de BMP6 inducida por APAP favorece la diferenciación de macrófagos hacia el fenotipo M2.

En resumen, los resultados del presente estudio implican a BMP6 como un nuevo biomarcador y una potencial diana terapéutica para el DILI derivado de sobredosis por APAP, ya que niveles elevados de BMP6 en suero se asociaron con un mayor daño hepático. Asimismo, en el ámbito terapéutico, BMP6 ha resultado ser clave en la comunicación entre hepatocitos y macrófagos a la hora de establecer una respuesta antiinflamatoria durante la hepatotoxicidad por APAP.

CAPÍTULO III

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA 8A (BMP8A) EN MODELOS EXPERIMENTALES DE FIBROSIS HEPÁTICA Y EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON FIBROSIS DERIVADA DE NAFLD.

Como ya se ha comentado, las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) juegan un papel en la fisiopatología hepática. En este sentido, se ha demostrado el papel fisiopatológico de algunas proteínas BMP tales como BMP3B, BMP4, BMP6, BMP8B y BMP9, en modelos animales y pacientes con NAFLD (Arndt et al., 2015; Mahli et al., 2019; Peng et al., 2019; Platko et al., 2019; Yang et al., 2019). Asimismo, un gran número de estudios clínicos traslacionales han mostrado que los niveles séricos de diferentes BMP están modulados en pacientes con CLD, más específicamente BMP2 (Patricia et al., 2022), BMP7 (Aktug Demir et al., 2014; Chayanupatkul et al., 2009; Tacke et al., 2007; Wang et al., 2018; Zoheiry et al., 2015), BMP9 y BMP10 (Owen et al., 2020).

Como miembro de la familia de las BMP, BMP8A se ha descrito como un factor involucrado en la espermatogénesis y en la regulación de la proliferación de células epiteliales del útero en ratones (Chung et al., 2015; Wu et al., 2017). Además, la concentración de BMP8A circulante ya se ha propuesto como nuevo biomarcador para el diagnóstico temprano del cáncer de tiroides en humanos (Liu et al., 2020); sin embargo, todavía no se conoce su potencial implicación en la progresión de las CLD.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este estudio fue determinar el patrón de expresión de BMP8A en el hígado de animales sometidos a diferentes modelos preclínicos de fibrosis hepática, así como evaluar si los niveles séricos de BMP8A pueden servir como indicador del grado de fibrosis hepática en pacientes con NASH, la causa más común de CLD a nivel global.

1. Evaluación de la expresión hepática de BMP8A en diferentes modelos murinos de fibrosis hepática avanzada.

Para abordar este objetivo, primero, se determinó la expresión a nivel de ARNm de BMP8A en muestras de tejido hepático obtenidas de los ratones sometidos a los diferentes modelos experimentales de fibrosis hepática. Para ello, se realizó la extracción de ARN de dichas muestras hepáticas y se analizó la expresión del gen *Bmp8a* mediante RT-qPCR.

Resultados y Discusión: Capítulo III

1.1. La expresión hepática de BMP8A se encuentra aumentada en el hígado de ratones sometidos a un modelo experimental fibrosis por enfermedad colestásica

En primer lugar, se llevó a cabo un modelo murino de enfermedad colestásica por el cual los animales desarrollan fibrosis hepática. Para ello, se sometió a los ratones anestesiados a una cirugía de BDL. Los ratones control (Sham) fueron igualmente anestesiados y sometidos a cirugía, en este caso sin ligación del ducto. Tras 28 días de la operación, los animales fueron sacrificados y se recogieron los hígados y sueros de los mismos. El análisis histológico mediante tinción con Rojo Sirio, mostró acumulación de depósitos de colágeno en el tejido hepático en los ratones sometidos a BDL en comparación con los Sham (Figura 40A). Como era de esperar, se observó un aumento significativo en la expresión de importantes moduladores del proceso fibrogénico en el hígado como el colágeno tipo 1 (en inglés, *collagen type 1*, COL1A1, *Col1a1*) y la actina específica de músculo liso (α SMA, *Acta2*) en los ratones BDL, en paralelo a un aumento en la expresión hepática del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (en inglés, *plasminogen activator inhibitor type 1*, PAI1, *Serpin1*), un marcador de fibrosis ampliamente caracterizado (Figura 40B).

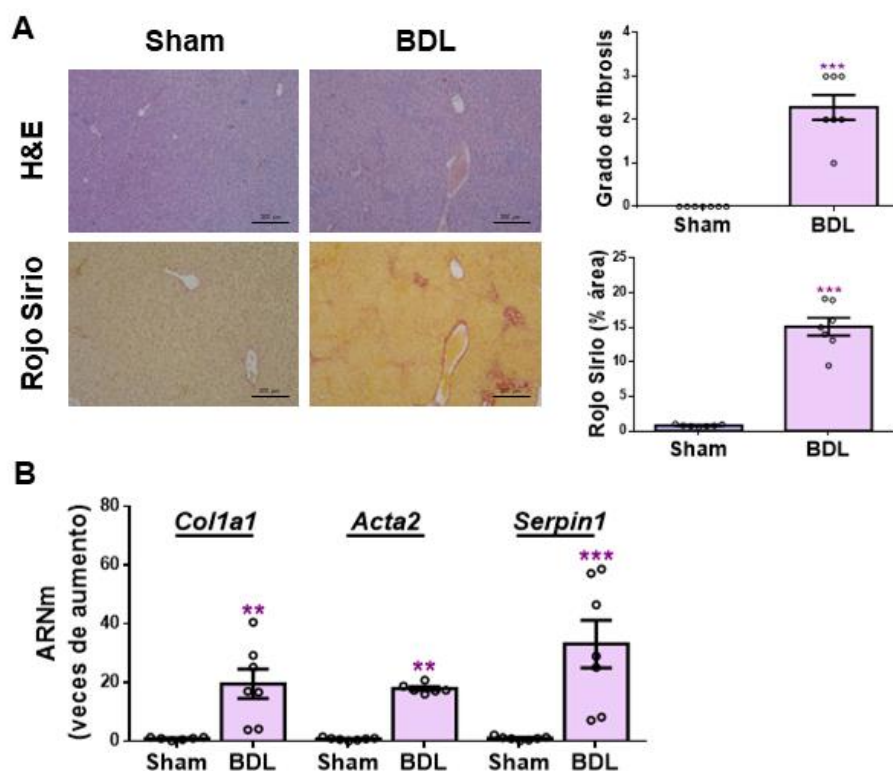


Figura 40. Modelo experimental de fibrosis hepática derivada de enfermedad colestásica. A. Imágenes representativas de las tinciones con Hematoxilina y Eosina (H&E) y Rojo sirio (4X). Evaluación del grado de fibrosis por un patólogo experto (panel superior) y cuantificación de Rojo sirio expresado como porcentaje de área teñida (panel inferior). **B.** Expresión hepática de ARNm de los genes *Col1a1*, *Acta2* y *Serpin1* determinada mediante RT-qPCR y normalizada con el gen *36b4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (Sham, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Ratones sometidos a operación BDL o Sham y sacrificados 28 días después de la operación (n=7 animales por grupo). BDL, ligación del ducto biliar. **p<0,01 y ***p<0,005, BDL vs. Sham.

Una vez caracterizado el modelo, se midió la expresión a nivel de ARNm de BMP8A en el tejido hepático de los animales y se observó un aumento significativo en la expresión del gen *Bmp8a* en los ratones BDL en comparación a sus controles (Figura 41A). Asimismo, se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa entre la expresión hepática de BMP8A y el grado de fibrosis, así como con los niveles de expresión de los marcadores de fibrosis descritos previamente (Figura 41B-E).

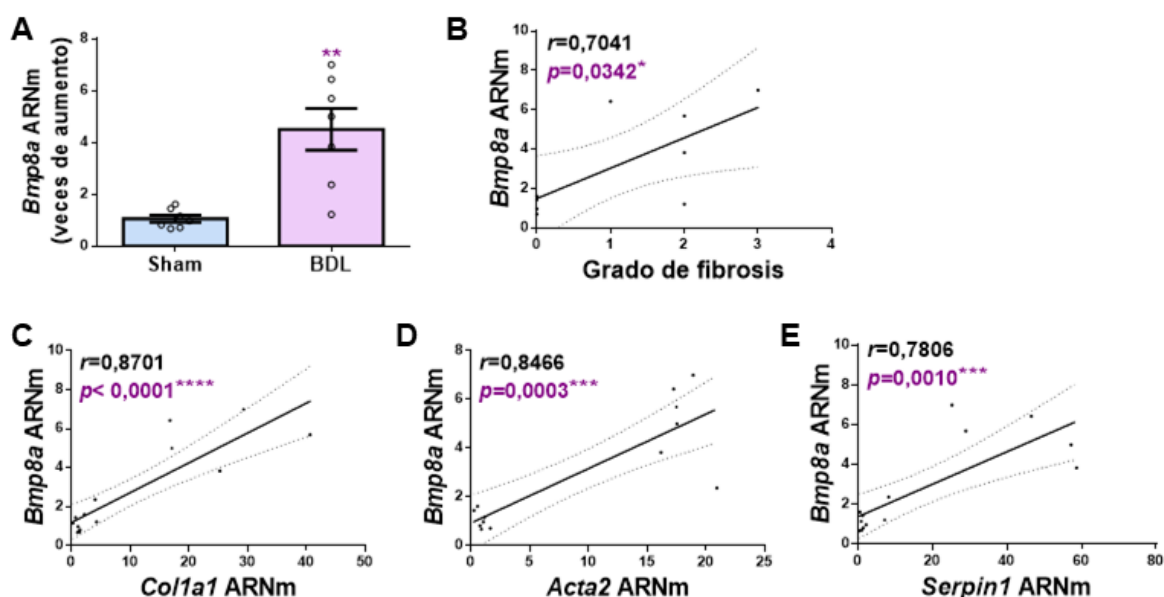


Figura 41. La expresión hepática de BMP8A está aumentada en un modelo experimental de fibrosis mediante BDL. A. Expresión hepática de ARNm del gen *Bmp8a* determinada mediante RT-qPCR y normalizada con el gen *36b4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (Sham, 1) y presentados como media \pm SEM. **B-E.** Análisis de la correlación entre los niveles de ARNm del gen *Bmp8a* con el grado de fibrosis y con la expresión de los genes *Col1a1*, *Acta2* y *Serpin1*, respectivamente. Condiciones experimentales: Ratones sometidos a operación BDL o Sham y sacrificados 28 días después de la operación (n=7 animales por grupo). BDL, ligación del ducto biliar. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005 y ****p<0,0001, BDL vs. Sham.

1.2. La expresión hepática de BMP8A se encuentra aumentada en el hígado de ratones sometidos a un modelo experimental de fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄)

Para determinar si el aumento de expresión de BMP8A observado en el modelo de BDL se produce como consecuencia del proceso fibrogénico y no por el daño hepático derivado de la colestasis, se realizó un modelo experimental clásico para inducir el desarrollo de fibrosis hepática. Para ello, se administró a los ratones una dosis de 1,6 mg/kg de tetracloruro de carbono (CCl₄) por vía intraperitoneal (i.p.) dos veces por semana durante 6 semanas. A los ratones control se les administró el vehículo (aceite de oliva, VEH) de igual manera. Una vez finalizado el tratamiento, los ratones fueron sacrificados y se recogieron los hígados.

Del mismo modo que sucedía en el modelo de BDL, en paralelo al desarrollo de fibrosis se observó un aumento en la expresión hepática de los marcadores de fibrosis COL1A1 y PAI1 (Figura 42A). Asimismo, se observó un aumento en la expresión a nivel de ARNm del gen *Bmp8a* en los hígados de ratones tratados con CCl₄ respecto al grupo control (Figura 42B). De hecho, se observó que el aumento de expresión de BMP8A fue paralelo al aumento de expresión hepática de los marcadores de fibrosis (Figura 42C y D).

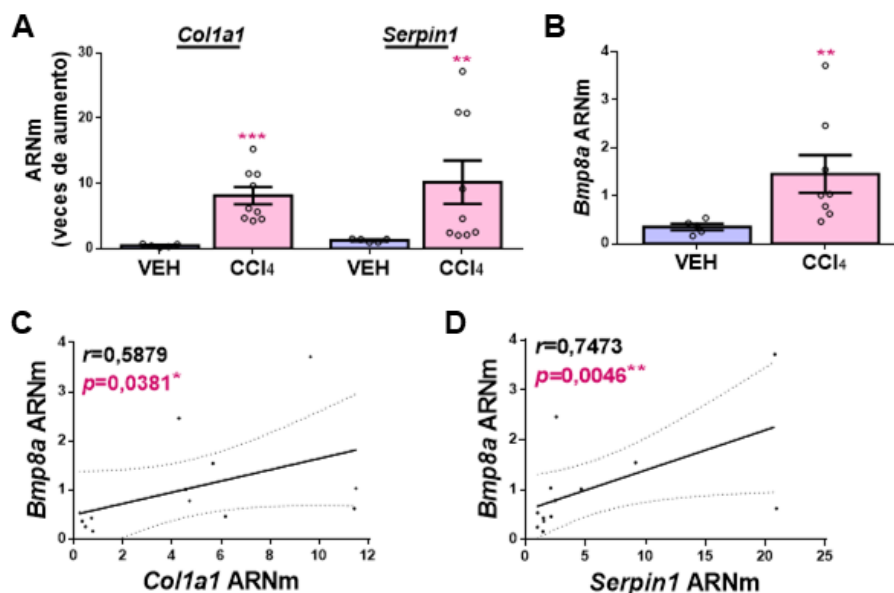
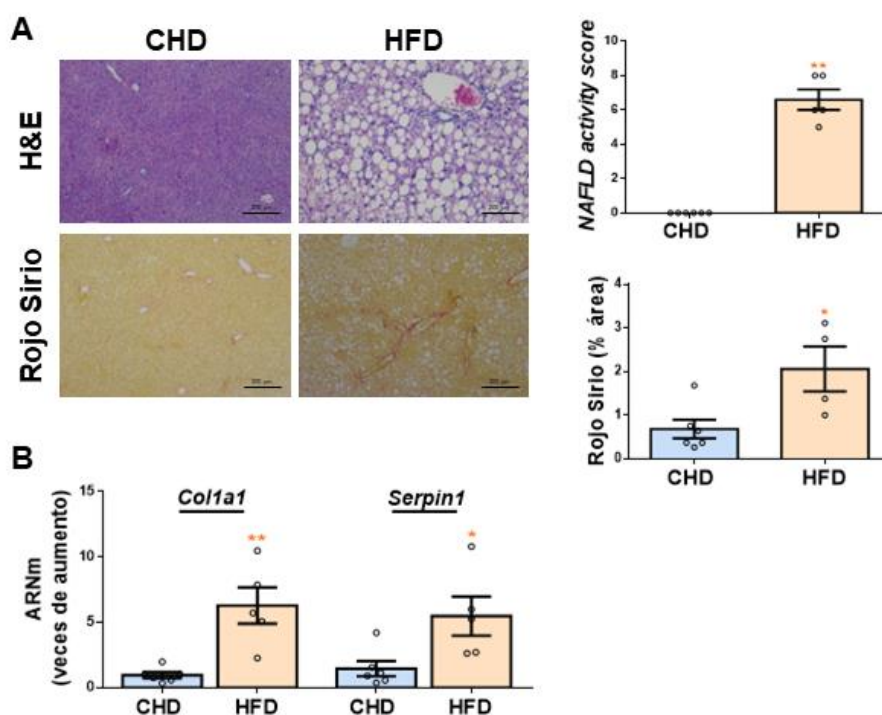


Figura 42. La expresión hepática de BMP8A esta aumentada en un modelo experimental de fibrosis inducida por CCl₄. **A y B.** Niveles hepáticos de ARNm de los genes *Col1a1*, *Serpin1* y *Bmp8a* determinados mediante RT-qPCR y normalizados con el gen *36b4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (VEH, 1) y presentados como media ± SEM. **C y D.** Análisis de la correlación entre los niveles de ARNm del gen *Bmp8a* con la expresión de los genes *Col1a1* y *Serpin1*, respectivamente. Condiciones experimentales: Ratones tratados con CCl₄ o vehículo (VEH) i.p. dos veces por semana durante 6 semanas. (n=6 animales por grupo). *p<0,05 y **p<0,01, CCl₄ vs. VEH.

1.3. La expresión hepática de BMP8A se encuentra aumentada en el hígado de ratones sometidos a un modelo experimental de fibrosis derivada de NAFLD

Una de las principales causas de fibrosis hepática a nivel global es la NAFLD (Younossi et al., 2018). Como ya se ha comentado, entre el 40 y 50% de pacientes con NAFLD progresan al grado de esteatohepatitis (NASH), la forma clínicamente más relevante de esta enfermedad, que se puede dar en presencia de diferentes grados de fibrosis (Younossi et al., 2016). De hecho, la presencia y el grado de fibrosis son factores determinantes para establecer el pronóstico de la enfermedad (Hardy et al., 2016).

Para evaluar si la modulación de BMP8A observada en los modelos previos se da también en fibrosis derivada de NAFLD, se estableció un modelo murino de NAFLD inducido por dieta. Para ello, se alimentó a los ratones con una dieta alta en grasa (60% de grasa) (HFD), o dieta estándar en el caso del grupo control (CHD), durante 16 semanas, tras las cuales los ratones fueron sacrificados y se recogieron los hígados. El análisis histológico mediante tinción con H&E permitió determinar el grado de enfermedad que fue evaluado por un patólogo experto utilizando el *NAFLD activity score*. Como era de esperar, el tejido hepático procedente de ratones que habían recibido una dieta HFD presentó las características típicas de NASH, tales como esteatosis, inflamación lobular y *ballooning* (Figura 43A). El grado de fibrosis se determinó gracias a la tinción con Rojo Sirio (Figura 43A). Asimismo, se observó un incremento en la expresión hepática de los marcadores de fibrosis COL1A1 y PAI1 en los ratones alimentados con HFD (Figura 43B).



Resultados y Discusión: Capítulo III

Figura 43. Modelo experimental de fibrosis hepática derivada de NAFLD. **A.** Imágenes representativas de las tinciones con Hematoxilina y Eosina (H&E) y Rojo sirio (4X). Evaluación del *NAFLD activity score* por un patólogo experto (panel superior) y cuantificación de Rojo sirio expresado como porcentaje de área teñida (panel inferior). **B.** Expresión hepática de ARNm de los genes *Col1a1* y *Serpin1* determinada mediante RT-qPCR y normalizada con el gen *36b4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (CHD, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Ratones alimentados con HFD o CHD (grupo control) durante 16 semanas (n=5 animales por grupo). *p<0,05 y **p<0,01, HFD vs. CHD.

A continuación, se midió la expresión hepática a nivel de ARNm de BMP8A y se observó un incremento significativo en la expresión del gen *Bmp8a* en las muestras de ratones alimentados con HFD respecto a los controles (Figura 44A). De hecho, la expresión hepática de BMP8A correlacionó positivamente y de manera significativa con la puntuación obtenida del *NAFLD activity score*, el grado de fibrosis y con la expresión hepática de los marcadores de fibrosis (Figura 44B-E).

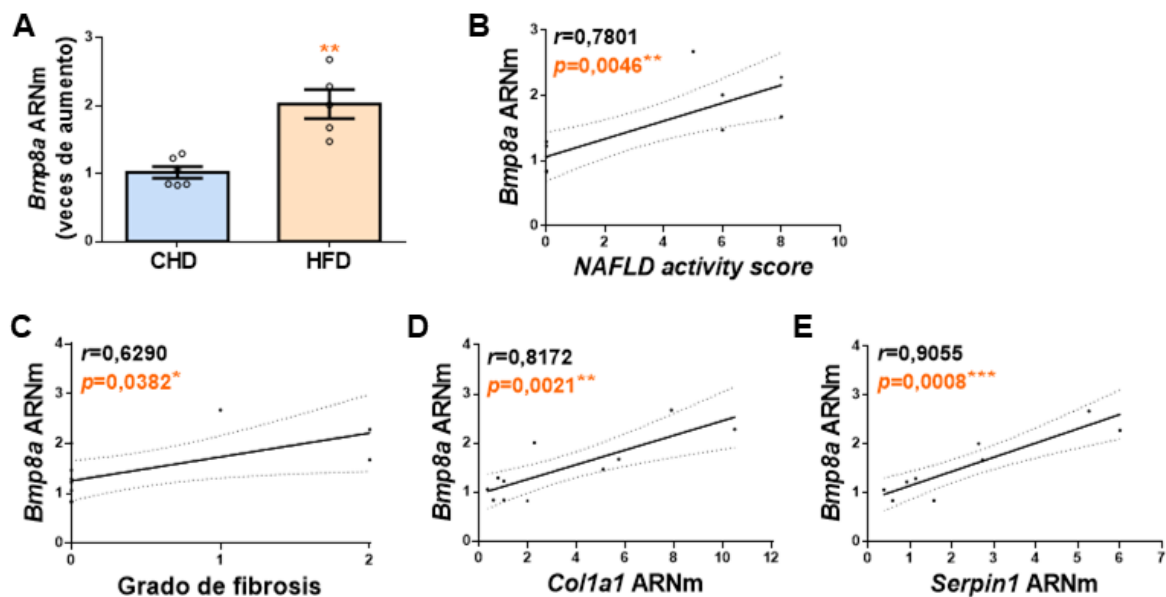


Figura 44. La expresión hepática de BMP8A está aumentada en un modelo experimental de fibrosis inducida por dieta. **A.** Expresión hepática de ARNm del gen *Bmp8a* determinada mediante RT-qPCR y normalizada con el gen *36b4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (CHD, 1) y presentados como media \pm SEM. **B-E.** Análisis de la correlación de los niveles de ARNm del gen *Bmp8a* con el *NAFLD activity score* y el grado de fibrosis y con la expresión de los genes *Col1a1* y *Serpin1*, respectivamente. Condiciones experimentales: Ratones alimentados con HFD o CHD (grupo control) durante 16 semanas (n=5 animales por grupo). *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,005, HFD vs. CHD.

Estudios experimentales previos ya habían reportado que la expresión de diferentes miembros de la familia de las BMP está incrementada en hígados fibróticos. En este sentido, Zhang y colaboradores observaron que ratas sometidas a BDL mostraron un incremento en la expresión hepática de BMP7 en comparación con el grupo control (Zhang et al., 2012). Además, la expresión de BMP7 a nivel de proteína también se observó elevada en hígados de ratones sometidos a un daño hepático agudo inducido por CCl₄, pero no en aquellos sometidos a un daño crónico inducido por este tóxico (Zou et al., 2019). Curiosamente, solo se detectó un incremento en la expresión hepática de BMP6 en animales sometidos a un modelo de NAFLD inducida por dieta, pero no en modelos de fibrosis derivados de BDL o CCl₄ (Arndt et al., 2015). En línea con nuestros resultados, los niveles hepáticos de BMP8B se vieron inducidos en paralelo al grado de fibrosis en un modelo de NASH basado en dieta y en un modelo de daño crónico inducido por CCl₄ (Mahli et al., 2019; Vacca et al., 2020). Por el contrario, la expresión hepática a nivel de ARNm y proteína de BMP9 disminuyó en modelos animales de colestasis (Addante et al., 2018). Estos estudios, en conjunto con nuestros resultados, indican que las proteínas BMP pueden jugar un papel importante en la patogénesis de la fibrosis hepática. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que BMP8A puede ser un importante mediador en la progresión de la fibrosis hepática, independientemente de la etiología de la que se derive el daño hepático crónico; sin embargo, son necesarios más estudios experimentales para dilucidar de forma más precisa el papel de BMP8A en la fisiopatología de la fibrosis hepática.

2. Evaluación de la expresión y secreción de BMP8A en un modelo *in vitro* de fibrosis

Las células estrelladas hepáticas juegan un papel clave en el desarrollo de la fibrosis; su activación por diferentes señales de daño, inflamación o estrés es el evento precipitante por el cual se produce la fibrosis. Una vez activadas, las HSC secretan componentes de la ECM que se acumulan formando una cicatriz como respuesta a un daño crónico en el tejido hepático.

En un intento de esclarecer la posible fuente celular de BMP8A en el hígado, llevamos a cabo un modelo fibrogénico *in vitro*. Para ello se utilizó la línea celular de HSC humanas LX2 y la línea de hepatocitos humanos derivada de hepatocarcinoma Huh7.

2.1. Modelo *in vitro* de fibrosis en la línea celular LX2

Para llevar a cabo el modelo *in vitro*, se estimularon células LX2 con TGFβ, citoquina secretada por diferentes tipos celulares que favorece la activación de las HSC (Puche et al.,

Resultados y Discusión: Capítulo III

2013), a 10 ng/ml durante 24 horas para inducir su paso de un estado quiescente a un estado activado. Transcurridas 24 horas se observó que las células expuestas a TGF β cambiaron su morfología, presentando un fenotipo de tipo miofibroblasto (Figura 45A), característica propia de la activación de estas células. Asimismo, las células tratadas con TGF β aumentaron la expresión a nivel de ARNm de los marcadores de activación COL1A1, α SMA y TGF β (Figura 45B). Del mismo modo, la expresión a nivel de proteína de COL1A1 y α SMA también se vio incrementada en las células HSC activadas (Figura 45C).

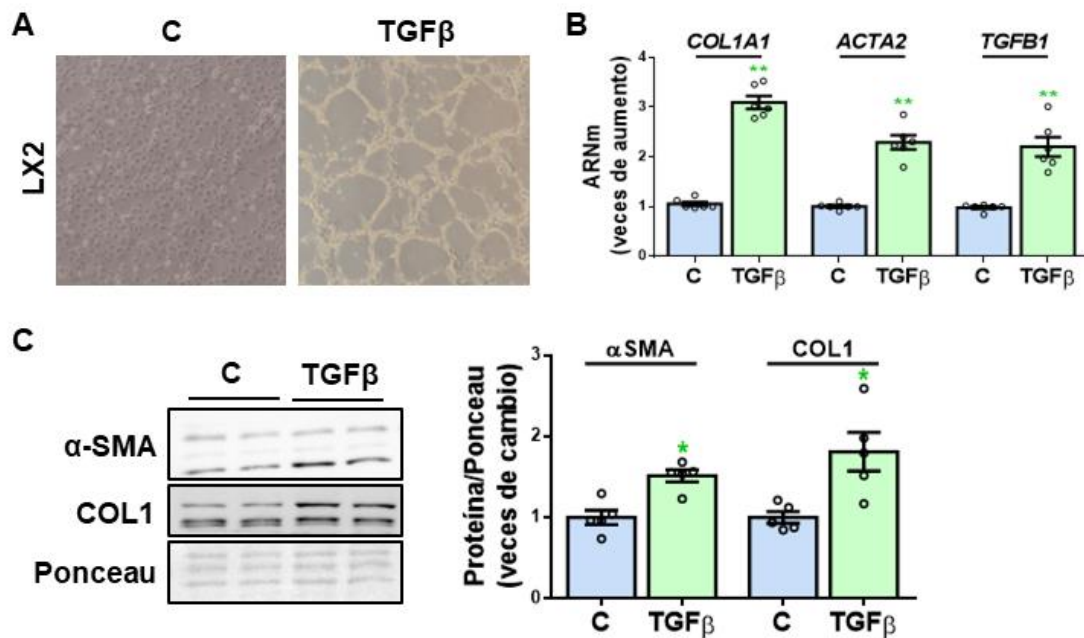


Figura 45. Modelo de fibrosis *in vitro* en las células LX2. A. Imágenes representativas de contraste de fases de células LX2 en estado quiescente (C) y activadas con TGF β (TGF β). B. Niveles hepáticos de ARNm de los genes *COL1A1*, *ACTA2* y *TGFβ1* determinados mediante RT-qPCR y normalizados con el gen *36B4*. C. Imágenes representativas de Western blot del lisado celular de LX2 con los anticuerpos indicados y su normalización con la tinción con Ponceau como control de carga. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (C, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células LX2 tratadas con o sin TGF β a 10 ng/ml durante 24 horas. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). *p<0,05 y **p<0,01, TGF β vs. C.

2.2. Las células Huh7 expresan y secretan BMP8A tras la estimulación con el secretoma de HSC activadas

El siguiente paso fue determinar si los hepatocitos, que son el tipo celular mayoritario del hígado, podrían ser la principal fuente de producción de BMP8A. Para abordar esta cuestión, se expuso a células Huh7 al medio condicionado (MC) de LX2 quiescentes (LX2q) o activadas (LX2a) durante 24 horas (Figura 46A) y se observó un incremento significativo en la expresión

a nivel de ARNm de BMP8A en las células Huh7 tratadas con el MC procedente de LX2a en comparación con aquellas expuestas a MC de LX2q (Figura 46B). Cabe destacar que la morfología de las células Huh7 no se modificó en ninguna de las condiciones experimentales (Figura 46C). Además, en el sobrenadante de Huh7 estimuladas con MC de LX2a se detectó presencia de la proteína BMP8A (Figura 46D). Estos resultados sugieren que los componentes producidos por las HSC activadas son suficientes para inducir la expresión y secreción de BMP8A en hepatocitos.

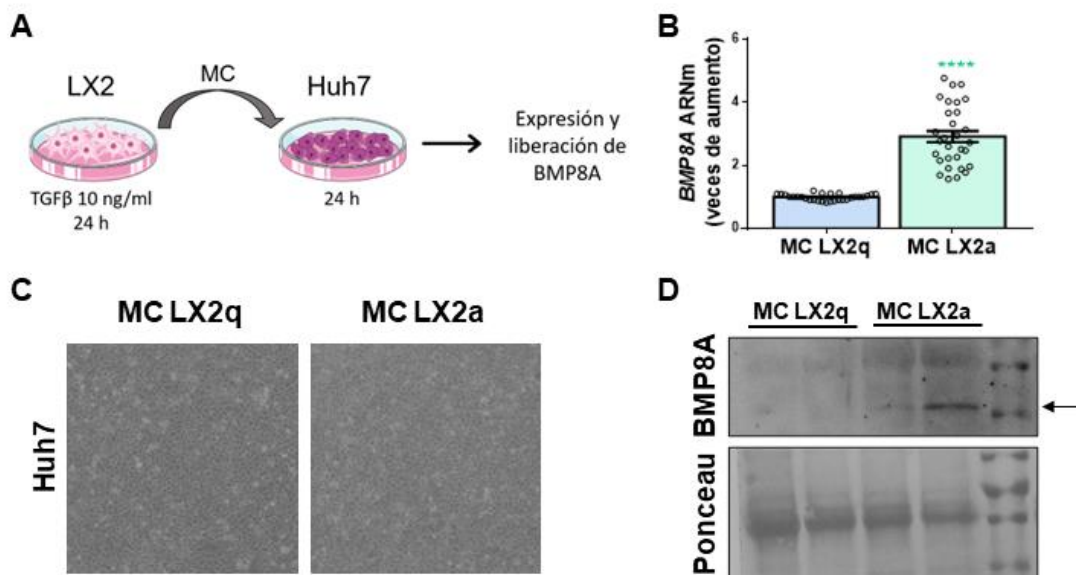


Figura 46. El medio condicionado de células LX2 activadas induce la expresión y liberación de BMP8A en las células Huh7. **A.** Condiciones experimentales: Células Huh7 expuestas durante 24 horas al medio condicionado (MC) de LX2 activadas con TGFβ (LX2a) o quiescentes (LX2q). **B.** Nivel de ARNm del gen *BMP8A* determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (MC LX2q, 1) y presentados como media ± SEM. **C.** Imágenes representativas de contraste de fases de células Huh7 tratadas con MC de LX2a o LX2q. **D.** Imágenes representativas de Western blot del sobrenadante celular de Huh7 con el anticuerpo frente a BMP8A y la tinción con Ponceau como control de carga. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). ****p<0,0001, MC LX2a vs. MC LX2q.

De hecho, se sabe que una vez activadas, las HSC liberan citoquinas y quimioquinas entre ellas TGFβ, que gracias a una estimulación autocrina favorecen la progresión del proceso fibrogénico (Schon & Weiskirchen, 2014). En este sentido, al tratar células Huh7 con TGFβ (10 ng/ml), se observó que también aumenta la expresión del gen *BMP8A* en estas células en presencia de esta citoquina (Figura 47). Sin embargo, el aumento fue menor que el encontrado tras estimular estos hepatocitos con el MC de las HSC activadas, lo que sugiere que, además

Resultados y Discusión: Capítulo III

del TGF β , otros componentes del secretoma de estas células están implicados en la inducción de la expresión de BMP8A en hepatocitos.

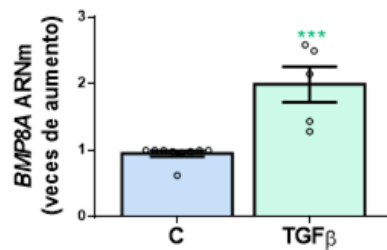


Figura 47. La estimulación con TGF β induce la expresión de BMP8A en Huh7. Nivel de ARNm del gen *BMP8A* determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (C, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células Huh7 tratadas con TGF β a 10 ng/ml durante 24 horas. (n>3 experimentos independientes realizados por duplicado). *p<0,05, TGF β vs. C.

3. Evaluación de la concentración circulante de BMP8A en el modelo de ratones sometidos a BDL

Teniendo en cuenta que en el modelo de fibrosis *in vitro* los hepatocitos, en presencia de MC procedente de HSC activadas, liberan BMP8A al medio de cultivo, se planteó si el aumento de expresión hepática de BMP8A observado en los hígados de ratones sometidos a los modelos de fibrosis se podría ver también reflejado a nivel circulante. Por tanto, se cuantificó la concentración de BMP8A mediante ELISA en las muestras de suero de los ratones sometidos a BDL y sus controles (Sham). Los resultados mostraron que la concentración de BMP8A en el suero de los ratones con BDL es significativamente superior a la de los ratones control (Figura 48A), encontrando una asociación estadísticamente significativa de los niveles en suero de BMP8A con su expresión hepática, así como con el grado de fibrosis (Figura 48B-C). Estos resultados sugieren que BMP8A podría ser un buen biomarcador sérico para la detección de fibrosis hepática.

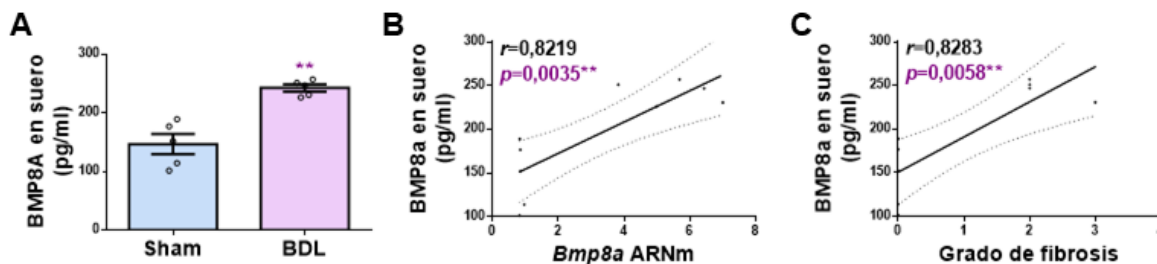


Figura 48. Niveles circulantes de BMP8A en el modelo experimental de fibrosis hepática mediante BDL. **A.** Niveles circulantes de BMP8A determinados mediante ELISA. Los datos están expresados como pg/ml y presentados como media \pm SEM. **B y C.** Análisis de la correlación entre los niveles circulantes de BMP8A y la expresión hepática del gen *Bmp8a* y el grado de fibrosis. Condiciones experimentales: Ratones sometidos a operación BDL o Sham y sacrificados 28 días después de la operación (n=7 animales por grupo). BDL, ligación del ducto biliar. **p<0,01, BDL vs. Sham.

4. Quantificación de la concentración sérica de BMP8A en una cohorte de pacientes con fibrosis hepática

Se sabe que el grado de fibrosis es el principal factor pronóstico de la morbilidad y mortalidad derivada de enfermedad hepática en pacientes con CLD (Ekstedt et al., 2015; Hardy et al., 2016). Por consiguiente, una evaluación precisa del grado de fibrosis hepática es esencial para un manejo clínico adecuado. En este sentido, la identificación de biomarcadores no invasivos de fibrosis hepática ha ganado interés ya que ofrecen una alternativa más rápida y económica que otros métodos diagnósticos (Baranova et al., 2011).

Los resultados obtenidos en los modelos experimentales indican que los niveles en suero de BMP8A pueden tener una relevancia potencial para predecir el grado de fibrosis hepática. Para ahondar en esta hipótesis, se midieron los niveles circulantes de BMP8A en una cohorte de pacientes con NASH con y sin fibrosis avanzada, así como en individuos con hígado histológicamente normal (HN).

4.1. Características de la población de estudio

En esta cohorte se incluyeron 85 pacientes con NASH diagnosticada mediante biopsia hepática, así como 36 individuos con HN a los que se había realizado una biopsia hepática durante una colecistectomía laparoscópica. El grado de fibrosis fue evaluado por un patólogo experto y los pacientes con NASH se dividieron entre aquellos que presentaron ausencia de fibrosis o fibrosis leve (F0-F2) (n=52) y los que presentaron fibrosis avanzada (F3-F4) (n=33). Posteriormente se realizó un estudio de las características clínicas y antropométricas de la

Resultados y Discusión: Capítulo III

cohorte, las cuales se muestran en la Tabla 4. Como era de esperar, existen diferencias significativas entre los individuos con HN y los pacientes con NASH, presentando estos últimos mayor índice de masa corporal (IMC), mayor prevalencia de diabetes y niveles mayores de marcadores bioquímicos como la glucosa, los triglicéridos y las transaminasas (GOT, GPT y GGT). Entre los pacientes con NASH, aquellos que presentaron fibrosis avanzada tienen una edad significativamente mayor; además existe una mayor prevalencia de diabetes en este grupo. Por último, los pacientes con fibrosis avanzada presentaron niveles significativamente mayores de GGT y de plaquetas en comparación con aquellos pacientes con fibrosis leve o ausencia de la misma.

Tabla 4. Características de la población de estudio

	Hígado normal (HN) (n=36)	Fibrosis leve (F0-F2) (n=52)	Fibrosis avanzada (F3-F4) (n=33)
Edad (años)	56,82 ± 12,48	52,75 ± 11,89	60,64 ± 9,37 ^{##}
Sexo (mujer/hombre, %)	58,33 / 41,67	59,62 / 40,38	48,48 / 51,52
IMC (kg/m ²)	27,72 ± 5,93	34,92 ± 7,99 ^{****}	32,6 ± 4,63 ^{***}
Glucosa (mg/dL)	94,17 ± 12,76	125,9 ± 55,49 ^{**}	120 ± 46,13 ^{**}
Diabetes (%)	11,1	53,8 ^{****}	75,8 ^{****#}
Triglicéridos (mg/dL)	107,2 ± 53,23	181 ± 133,7 ^{****}	159,7 ± 74,75 ^{**}
Colesterol total (mg/dL)	186 ± 41,1	197,5 ± 46,83	194,4 ± 35,55
GOT (IU/L)	19,5 ± 5,79	61 ± 121,6 ^{****}	48,15 ± 29,74 ^{****}
GPT (IU/L)	20,58 ± 12,03	67,33 ± 86,66 ^{****}	54,97 ± 35,9 ^{****}
GGT (IU/L)	40,39 ± 29,79	96,52 ± 158 ^{**}	136,5 ± 189,1 ^{****#}
Plaquetas (10 ⁹ /L)	233,3 ± 65,5	234,1 ± 64,38	186,6 ± 68,56 ^{****#}
Albúmina (g/L)	44,85 ± 3,61	45,3 ± 3,64	44,71 ± 3,16
Fibrosis (%)			
Grado 0	100%	32,7%	
Grado 1		40,38%	
Grado 2		26,92%	
Grado 3			66,67%
Grado 4			33,33%

Los datos se muestran como media \pm SD o como número de casos (%). IMC, índice de masa corporal; GOT, glutámico oxalacético transaminasa; GPT, transaminasa glutámico pirúvica; GGT, gamma-glutamil transferasa. (n=121); **p<0,01, ***p<0,005 y ****p<0,0001, fibrosis leve (F0-F2) o avanzada (F3-F4) vs. HN; #p<0,05 y ##p<0,01, fibrosis avanzada (F3-F4) vs. fibrosis leve (F0-F2).

4.2. La concentración de BMP8A está elevada en el suero de pacientes con fibrosis hepática avanzada

Una vez caracterizada la cohorte de estudio, se cuantificó la concentración de BMP8A en el suero de pacientes con NASH, así como en el suero de los individuos con HN. Entre los pacientes con NASH, se encontró que la concentración de BMP8A circulante está significativamente elevada en aquellos que presentaron fibrosis avanzada (F3-F4) ($312,1 \pm 106,5$ pg/mL, n=33) en comparación con aquellos con fibrosis leve o ausencia de fibrosis (F0-F2) ($222,3 \pm 116,8$ pg/mL, $p=0,0001$, n=52), así como en comparación con los individuos con HN ($227,8 \pm 136$ pg/mL, $p=0,0019$, n=36, Figura 49A). Cabe destacar que no se observaron diferencias significativas en los niveles en suero de BMP8A entre los pacientes con F0-F2 y aquellos con HN. Además, se observó una elevación significativa y progresiva del BMP8A circulante en pacientes con NASH paralela a la progresión del daño hepático hacia grados de fibrosis más significativos ($r=0,3978$, n=85, $p=0,0002$, Figura 49B).

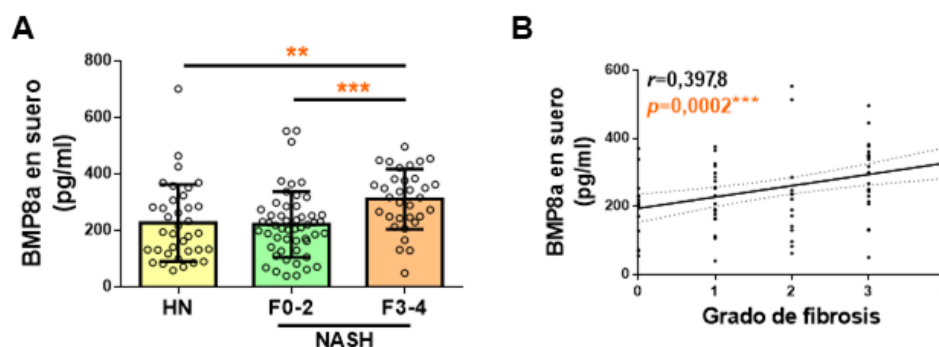


Figura 49. Los niveles circulantes de BMP8A se encuentran aumentados en una cohorte de pacientes con fibrosis hepática. A. Niveles circulantes de BMP8A determinados mediante ELISA. Los datos están expresados como pg/ml y presentados como media \pm SD. **B.** Análisis en la población de estudio de la correlación entre los niveles circulantes de BMP8A y el grado de fibrosis. Población de estudio: 85 pacientes con NASH, 52 con ausencia de fibrosis o fibrosis leve (F0-F2), y 33 con fibrosis avanzada (F3-F4), y 36 individuos con hígado histológicamente normal (HN). **p<0,01 y ***p<0,005, F3-4 vs. F0-2 o HN.

Este es el primer estudio en el que se determina la concentración circulante de BMP8A en pacientes con fibrosis hepática. Otros estudios ya habían reportado anteriormente que en pacientes con CLD se puede detectar una modulación de los niveles séricos de diferentes

proteínas BMP. En este sentido, se ha mostrado que los niveles circulantes de BMP7 están incrementados en pacientes con CLD de diferentes etiologías (Aktug Demir et al., 2014; Tacke et al., 2007; Zoheiry et al., 2015); mientras que la concentración de BMP7 se vio disminuida en suero de pacientes con cáncer hepático (Wang et al., 2018). Por el contrario, los niveles séricos de BMP9 y BMP10 se vieron disminuidos en pacientes con cirrosis en comparación con pacientes con fibrosis hepática pre-cirrótica, por lo que se han asociado con la severidad de la enfermedad (Owen et al., 2020).

5. **BMP8A es un predictor independiente de fibrosis avanzada**

Finalmente, para evaluar la utilidad de BMP8A circulante para predecir fibrosis avanzada (F3-F4), se analizó el área bajo la curva COR (en inglés, *Receiver Operating Characteristic*, ROC) de esta variable en la población de estudio. El área bajo la curva ROC (en inglés, *área under the ROC curve*, AUROC) de BMP8A circulante para identificar pacientes con fibrosis avanzada (F3-F4) fue de 0,74 (IC95% [0,63-0,85]; $p < 0,0001$, Figura 50).

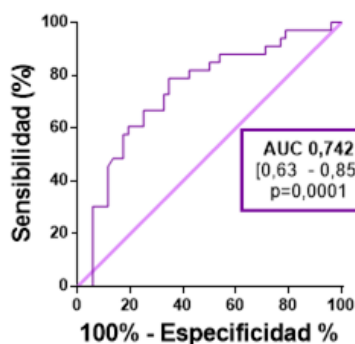


Figura 50. BMP8A es un predictor independiente de fibrosis avanzada. Área bajo la curva ROC (AUROC) mostrando la precisión diagnóstica del análisis univariante de BMP8A para predecir fibrosis avanzada (F3-F4). Población de estudio: Pacientes con NASH (n=85: 52 F0-F2 y 33 F3-F4) y 36 individuos con HN.

Puesto que los marcadores directos o indirectos se pueden utilizar solos o, más comúnmente, en combinación con otras variables clínicas para desarrollar índices compuestos, se combinaron los niveles séricos de BMP8A con otras variables independientes clínicamente relevantes, para llevar a cabo un análisis de regresión logística multivariante en la población de estudio (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis univariante y multivariante de las variables independientes asociadas a fibrosis avanzada en la población de estudio

Variables independientes	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	OR	95% IC	p valor	OR	95% IC	p valor
BMP8A (100 pg/ml)	2,01	[1,3-3,1]	0,002	2,15	[1,33-3,48]	0,002
Sexo (mujer/hombre)	1,56	[0,65-3,78]	0,316			
Edad (años)	1,07	[1,02-1,13]	0,004	1,07	[1,01-1,13]	0,02
IMC (kg/m ²)	0,95	[0,88-1,02]	0,308			
GPT (IU/L)	0,99	[0,98-1]	0,464			
GOT (IU/L)	0,99	[0,99-1]	0,574			
GGT (IU/L)	1	[0,99-1]	0,309			
Plaquetas (10 ⁹ /L)	0,99	[0,98-1]	0,004	0,99	[0,98-1]	0,07
Albúmina (g/L)	0,95	[0,82-1,09]	0,484			

OR, relación de probabilidades (en inglés, *odds ratio*); IC, intervalo de confianza; IMC, índice de masa corporal; GPT, transaminasa glutámico pirúvica; GOT, glutámico oxalacético transaminasa; GGT, gamma-glutamil transferasa; (n=121).

BMP8A se identificó como predictor independiente de fibrosis avanzada (OR=2,15 por cada 100 pg/mL, $p=0,002$) junto con la edad (OR=1,07, $p=0,02$) y las plaquetas (OR=0,99, $p=0,07$). En base a este modelo, se desarrolló un algoritmo denominado BMP8A fibrosis score (BFS) con un excelente rendimiento (AUROC=0,82, IC95% [0,72-0,91], $p<0,0001$, Figura 51).

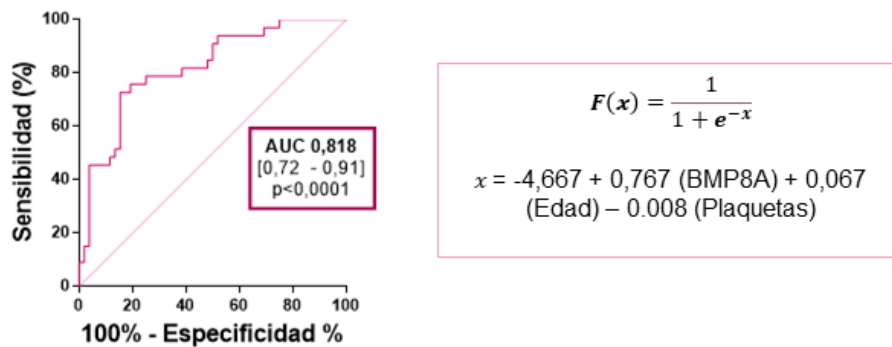


Figura 51. Precisión diagnóstica del algoritmo BMP8A fibrosis score (BFS). Área bajo la curva ROC (AUROC) mostrando la precisión diagnóstica de BFS para detectar fibrosis avanzada (F3-F4). Población de estudio: Pacientes con NASH (n=85: 52 F0-F2 y 33 F3-F4) y 36 individuos con HN.

A continuación, se evaluó la capacidad diagnóstica del modelo aplicando diferentes puntos de corte en su probabilidad predictiva, que resultó en un buen rendimiento general del modelo (Tabla 6). Además, para establecer el mejor punto de corte, es decir, aquel con mayor sensibilidad y especificidad para predecir fibrosis avanzada, se utilizó el Índice de Youden (en inglés *Youden's J statistic*, J): $J = \text{Sensibilidad} + (\text{Especificidad} - 1)$. De este modo, se estableció el mejor punto de corte en 0,46, que es adecuado para predecir fibrosis avanzada con una especificidad (E) de 84,6% y de descartar fibrosis avanzada con una sensibilidad (S) del 69,7%. El valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) fue 74,2% y 81,5% respectivamente.

Tabla 6. Precisión diagnóstica de BFS

BFS pto. de corte	Precisión	%	S	E	VPP	VPN	RV+	RV-
≥ 0,10	54,1	82,4	97,0	26,9	45,7	93,9	1,3	0,1
≥ 0,20	62,4	71,8	93,9	42,3	50,8	91,7	1,6	0,1
≥ 0,30	70,6	51,8	78,8	65,4	59,1	82,9	2,3	0,3
≥ 0,40	76,5	43,5	75,8	76,9	67,6	83,3	3,3	0,3
≥ 0,46	78,8	36,5	69,7	84,6	74,2	81,5	4,5	0,4
≥ 0,50	77,6	35,3	66,7	84,6	73,3	80,0	4,3	0,4
≥ 0,60	72,9	25,9	48,5	88,5	72,7	73,0	4,2	0,6
≥ 0,70	70,6	14,1	30,3	96,2	83,3	68,5	8,0	0,7
≥ 0,80	65,9	9,4	18,2	96,2	75,0	64,9	4,8	0,9
≥ 0,90	62,3	1,2	3,0	100	100	61,9	-	1,0

BFS, *BMP8A fibrosis score*; % = número de pacientes con BFS ≥ punto de corte; S, sensibilidad; E, especificidad; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; RV+, razón de verosimilitud positiva; RV-, razón de verosimilitud negativa.

Algunos algoritmos que utilizan marcadores serológicos, como el FIB4 y el APRI, presentan buena sensibilidad y especificidad para descartar o considerar la presencia de fibrosis avanzada en CLD derivadas de diferentes etiologías (Lin et al., 2011; McPherson et al., 2010; Sterling et al., 2006); sin embargo, todavía son necesarios nuevos biomarcadores o algoritmos con mayor precisión para predecir fibrosis avanzada.

En este sentido, comparando la precisión de BFS con estos dos modelos predictivos de fibrosis validados, BFS mostró mayor valor de AUROC que APRI o FIB4 (0,651, IC95% [0,53-0,77] y 0,756, IC95% [0,65-0,86]), respectivamente, en nuestra población de estudio. Por tanto, con un único punto de corte en 0,46, BFS presentó mayor precisión (78,8%) que APRI y FIB4 para predecir (60,0% y 65,9%, respectivamente) y descartar (62,3% y 64,7%, respectivamente) fibrosis avanzada (Tabla 7). Por un lado, BFS mostró mayor VPP que APRI y FIB4 para predecir fibrosis avanzada (74,2% vs. 44,4% y 64,3%, respectivamente) y mejor razón de verosimilitud positiva (RV+) (4,5 vs. 1,3 y 2,8, respectivamente). Por otro lado, para

Resultados y Discusión: Capítulo III

descartar fibrosis avanzada, BFS presentó mejor VPN que tanto APRI como FIB4 (81,5% vs. 71,7% y 80,6%, respectivamente), mientras que la razón de verosimilitud negativa (RV-) es similar a FIB4 (0,4) y mejor que APRI (0,6). Estos resultados sugieren que el rendimiento de BFS es mejor que APRI o FIB4 para predecir y descartar fibrosis avanzada en nuestra población de estudio.

Tabla 7. Comparación del rendimiento diagnóstico de BFS y otros algoritmos ampliamente utilizados para detectar alto riesgo de fibrosis avanzada (F3-F4).

Rendimiento diagnóstico	BFS	APRI		FIB4	
	≥0,46	<0,5	≥1,5	<1,30	≥2,67
Precisión	78,8	62,3	60,0	64,7	65,9
%	36,5	54,1	10,6	42,4	16,5
S	69,7	60,6	12,1	78,8	27,3
E	84,6	63,5	90,4	55,8	90,4
VPP	74,2	51,3	44,4	53,1	64,3
VPN	81,5	71,7	61,8	80,6	66,2
RV+	4,5	1,7	1,3	1,8	2,8
RV-	0,4	0,6	1,0	0,4	0,8

BFS, *BMP8A fibrosis score*; % = número de pacientes con BFS ≥ punto de corte; S, sensibilidad; E, especificidad; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; RV+, razón de verosimilitud positiva; RV-, razón de verosimilitud negativa.

Actualmente, la mayoría de índices predictivos de diagnóstico no invasivo utilizan dos puntos de corte diferentes para considerar o descartar fibrosis avanzada, estableciendo en consecuencia una zona gris que deja una alta proporción de pacientes sin clasificar. De acuerdo con la categorización obtenida con la aplicación del APRI y el FIB4 en nuestra

cohorte, el 35,3% y 41,1% de los pacientes se incluyeron en la zona gris, respectivamente. El valor de BFS recae en su capacidad de distinguir con precisión la fibrosis leve y avanzada utilizando un único punto de corte, evitando así dejar pacientes sin clasificar y, lo que es más importante, sin sacrificar excesivamente la sensibilidad o especificidad.

6. CONCLUSIÓN

Como ya se ha comentado, las CLD, independientemente de la etiología, se caracterizan por presentar fibrosis hepática progresiva, siendo esta el principal factor de riesgo asociado a mortalidad y morbilidad en estos pacientes. En el presente estudio, se aportan datos que revelan, por primera vez, que la expresión hepática de BMP8A se encuentra incrementada en distintos modelos preclínicos de fibrosis hepática y que dicha expresión correlaciona positivamente con el grado de fibrosis, así como con los niveles de ARNm de diferentes marcadores fibrogénicos. Además, se han identificado a los hepatocitos como posible fuente celular de BMP8A en respuesta a la activación de las HSC, un paso clave en el inicio de la fibrosis hepática (Figura 52).

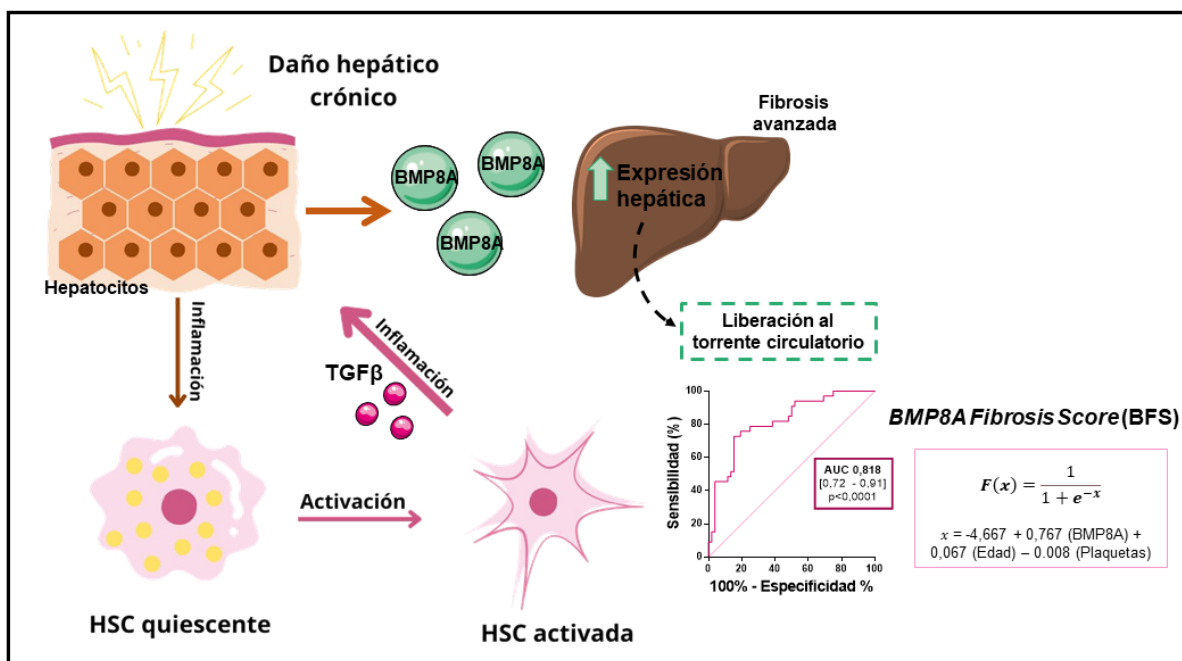


Figura 52. La concentración hepática y circulante de BMP8A se encuentra aumentada en modelos de fibrosis hepática. La activación de HSC durante la fibrosis promueve la expresión y liberación de BMP8A en hepatocitos.

Uno de los hallazgos más importantes de este estudio es que el incremento de expresión hepática del gen *Bmp8a* en ratones sometidos a BDL se vio reflejado en un aumento en los niveles séricos de esta BMP, que además correlaciona con el grado de fibrosis hepática,

Resultados y Discusión: Capítulo III

posicionando esta proteína como un potencial biomarcador para la detección no invasiva de fibrosis. Asimismo, en la cohorte de pacientes diagnosticados mediante biopsia de NASH con o sin fibrosis avanzada, la concentración circulante de BMP8A se encontró significativamente asociada con el grado de fibrosis hepática, indicando que puede ser un marcador para distinguir fibrosis hepática avanzada de fibrosis hepática leve. En concordancia con este resultado, el análisis de regresión logística univariante mostró que la concentración circulante de BMP8A permite identificar pacientes con NASH que presentan grados de fibrosis F3-F4 con buena precisión (AUROC, 0,742). Asimismo, combinando esta variable con otras clínicamente relevantes, y basándonos en la fórmula derivada del modelo de regresión logística multivariante, se desarrolló un algoritmo denominado BMP8A fibrosis score (BFS) combinando BMP8A circulante (OR=2,15 por cada 100 pg/mL, $p=0,002$), con la edad (OR=1,07, $p=0,02$) y las plaquetas (OR=0,99, $p=0,07$) obteniendo un rendimiento excelente para predecir fibrosis avanzada en los pacientes con NASH de nuestra cohorte (AUROC=0,818, $p<0,0001$).

Cabe destacar, que el nuevo algoritmo serológico descrito en este estudio denominado BFS presentó mayor rendimiento para predecir fibrosis hepática avanzada en nuestra cohorte de estudio que APRI y FIB4, dos de los algoritmos más ampliamente utilizados para evaluar fibrosis hepática en pacientes con CLD de diferentes etiologías (Lin et al., 2011; McPherson et al., 2010; Sterling et al., 2006).

La principal limitación de este estudio es que solo incluye pacientes con fibrosis hepática derivada de NASH y, por tanto, los resultados pueden ser diferentes en pacientes con CLD de distintas etiologías. Sin embargo, los estudios preclínicos mostraron que la expresión de BMP8A está incrementada en diferentes modelos experimentales de fibrosis hepática. La validación de estos resultados en cohortes que incluyan mayor número de pacientes con CLD y de distintas etiologías es imprescindible para implementar el algoritmo BFS como una herramienta clínicamente útil para identificar pacientes con CLD con fibrosis avanzada.

Por tanto, los resultados del presente estudio aportan por primera vez evidencia de que los niveles hepáticos y séricos de BMP8A están anormalmente elevados en modelos experimentales de fibrosis hepática y en el suero de pacientes con NASH que presentan fibrosis avanzada, indicando que BMP8A es una nueva diana molecular asociada a la fibrogénesis hepática. Además, se ha definido un algoritmo sencillo y eficiente capaz de discriminar fibrosis hepática avanzada con una buena precisión en pacientes con NASH.

CAPÍTULO IV

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA 2 (BMP2) EN MODELOS EXPERIMENTALES DE ESTEATOSIS HEPÁTICA Y EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON NAFLD.

La NAFLD se está convirtiendo en la CLD más prevalente a nivel global y se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico (Marchesini et al., 2001; Younossi et al., 2018).

Como ya se ha comentado, las proteínas BMP juegan un papel en la fisiopatología hepática. En este sentido, mientras que se ha demostrado el papel fisiopatológico de algunas BMP tales como BMP3B, BMP4, BMP6, BMP8B y BMP9, en modelos animales y pacientes con NAFLD (Arndt et al., 2015; Mahli et al., 2019; Peng et al., 2019; Platko et al., 2019; Yang et al., 2019), poco se conoce de la implicación de BMP2 en modelos experimentales de NAFLD (Thayer et al., 2020), y de momento no hay datos que relacionen BMP2 con la progresión de esta enfermedad en pacientes.

Por ello, en este estudio se propuso explorar el impacto de BMP2 en el desarrollo de la NAFLD, mediante la cuantificación de la expresión hepática y circulante de esta proteína en modelos experimentales y cohortes de pacientes con NAFLD. Del mismo modo se quiso evaluar la utilidad de BMP2 como marcador pronóstico y/o diagnóstico de dicha enfermedad.

1. Evaluación de la expresión hepática de BMP2 en un modelo experimental de NAFLD

Para evaluar la modulación en la expresión hepática de BMP2 se realizó un modelo experimental de NAFLD. En este sentido, cabe destacar que los modelos animales han jugado un importante papel a la hora de estudiar los mecanismos fisiopatológicos de la NAFLD. Sin embargo, ningún modelo es capaz de reproducir todas las principales características de la NAFLD avanzada que se encuentran presentes en humanos.

Se diseñó un modelo murino basado en dieta en el que los ratones fueron alimentados con una dieta con alto contenido en grasa (45% de grasa) (HFD) para inducir NAFLD, mientras que el grupo control se alimentó con dieta normal (CHD). Los animales fueron sacrificados tras 16 semanas de alimentación con la dieta mencionada; se recogieron el hígado y el suero de los ratones y se almacenaron convenientemente para futuros análisis.

Resultados y Discusión: Capítulo IV

Como era de esperar, los ratones alimentados con HFD ganaron significativamente más peso a lo largo del estudio en comparación con los animales alimentados con CHD (Figura 53A). El análisis histológico de las muestras hepáticas mostró que los hígados procedentes de la mayoría de los ratones alimentados con HFD presentaron características histológicas propias de NASH. Se observó acumulación de grasa, infiltración de células inflamatorias y/o *ballooning*. Asimismo, se estableció la puntuación *NAFLD activity score* (NAS score) para cada una de las muestras. La presencia de fibrosis en el tejido hepático se evaluó mediante tinción de las muestras con Rojo Sirio; el máximo grado de fibrosis observado en los animales fue grado 2 (fibrosis perisinusoidal y/o portal/peripoportal y puentes de fibrosis incompletos) (Figura 53B).

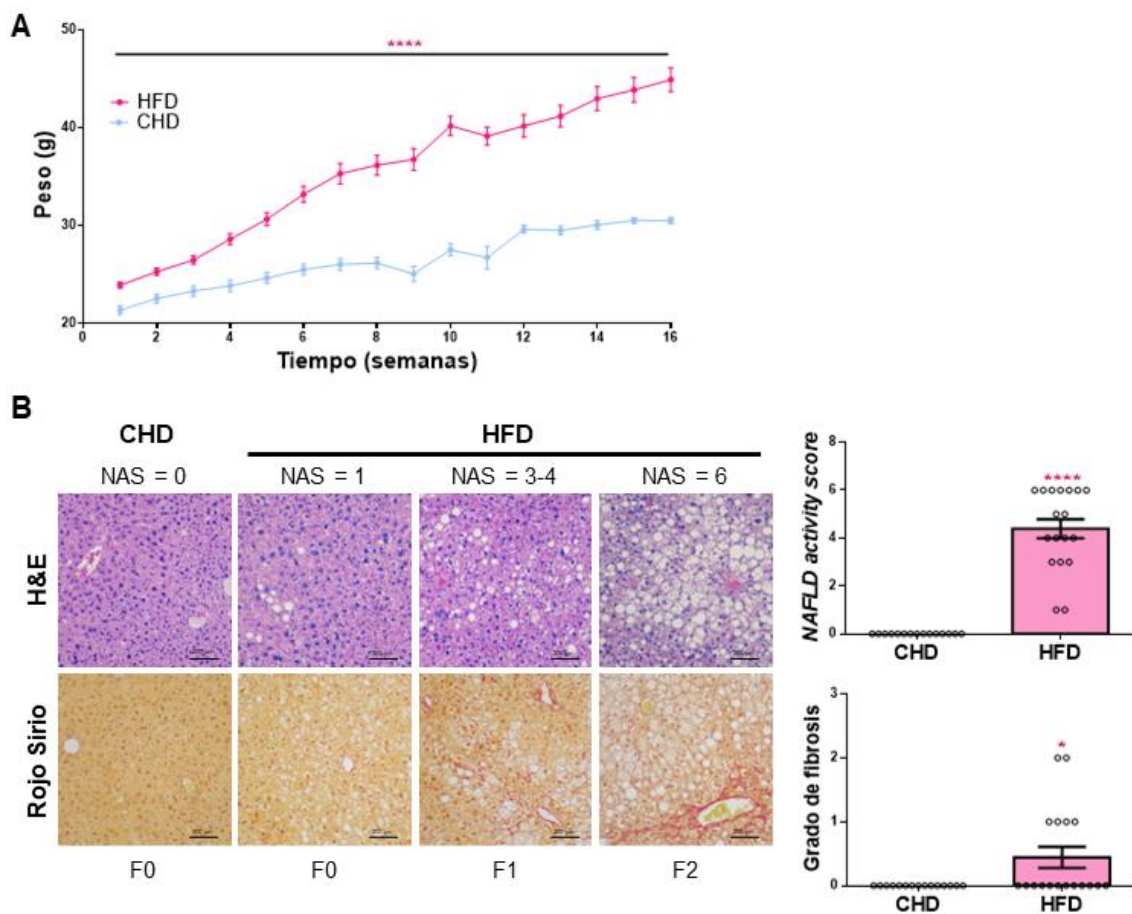


Figura 53. Caracterización del modelo animal de NAFLD. A. Medida de los pesos de los ratones tomadas dos veces por semana. **B.** Imágenes representativas del tejido hepático teñido con Hematoxilina y Eosina (H&E) y Rojo Sirio (4X). Puntuación de *NAFLD activity score* (panel superior) y evaluación del grado de fibrosis (panel inferior) por un patólogo experto. Condiciones experimentales: Ratones alimentados con HFD o CHD (grupo control) durante 16 semanas (n=15 animales por grupo). * $p < 0,05$ y **** $p < 0,0001$, HFD vs. CHD.

1.1. La expresión hepática de BMP2 se encuentra aumentada en el hígado de ratones sometidos a un modelo experimental de NAFLD

Una vez establecido el modelo experimental, se estudió la expresión hepática de BMP2 a nivel de ARNm. Para ello, se realizó la extracción de ARN de los hígados procedentes de los ratones y se analizó la expresión del gen *Bmp2* mediante RT-qPCR. Se observó que la expresión hepática de BMP2 se encuentra significativamente aumentada en los animales alimentados con HFD en comparación a los controles (Figura 54A). Además, la expresión hepática de esta proteína correlaciona de manera significativa tanto con la puntuación de *NAFLD activity score* como con el grado de esteatosis y de *ballooning* (Figura 54B-D). Curiosamente, la expresión de BMP2 no parece estar afectada por la presencia o ausencia de fibrosis (Figura 54E).

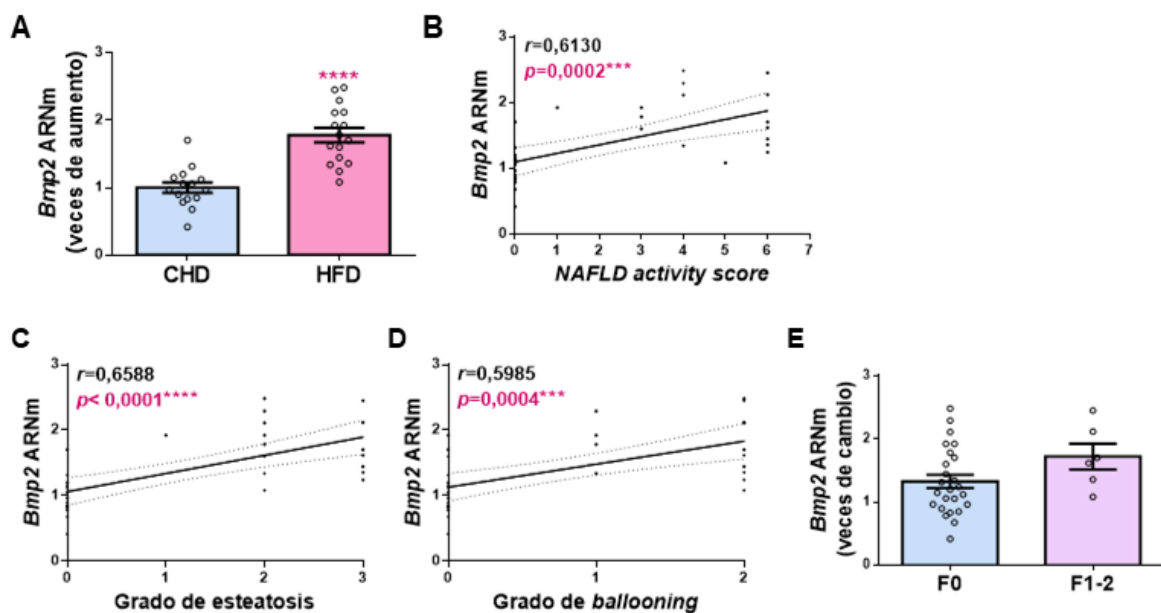


Figura 54. La expresión hepática de BMP2 se encuentra aumentada en el hígado de ratones sometidos a un modelo experimental de NAFLD. **A.** Nivel hepático de ARNm del gen *Bmp2* determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36b4*. **B-D.** Análisis de la correlación entre los niveles de ARNm del gen *Bmp2* y el *NAFLD activity score*, grado de esteatosis y grado de *ballooning*. **E.** Nivel hepático de ARNm del gen *Bmp2* determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36b4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (CHD o F0, 1) y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Ratones alimentados con HFD o CHD (grupo control) durante 16 semanas (n=15 animales por grupo). *** $p < 0,005$ y **** $p < 0,0001$, HFD vs. CHD.

Recientemente, se ha demostrado que la inhibición farmacológica de la señalización de BMP reduce la esteatosis hepática inducida por dieta en ratones obesos interfiriendo en la

producción de triglicéridos en el hígado (Thayer et al., 2020). Cabe destacar que este estudio muestra que este efecto es específico de la inhibición del receptor de BMP tipo I ALK3. Como ya se indica en la introducción de esta Tesis, existe cierta afinidad de los ligandos BMP por cada receptor; en este caso BMP2, al igual que BMP4, señala preferentemente uniéndose al receptor ALK3. Por tanto, este estudio propone un posible papel de BMP2 y BMP4 en la aparición de NAFLD, lo cual podría explicar el aumento de expresión de dicha proteína observado en el modelo animal.

2. Evaluación de la modulación de la expresión hepática y circulante de BMP2 en una cohorte de pacientes con NAFLD

2.1. Características de la población de estudio

Tras los resultados obtenidos en el modelo animal de NAFLD inducido por dieta, se comprobó si este aumento de expresión hepática de BMP2 observada en los ratones se ve reflejada también en pacientes con NAFLD. Para ello, se estudió una cohorte de 115 pacientes con diagnóstico de NAFLD realizado mediante biopsia hepática; entre ellos, 56 recibieron un diagnóstico de NAFL y 59 de NASH. Asimismo, se incluyeron 75 individuos con hígado histológicamente normal (HN) a los que se había realizado una biopsia hepática durante una colecistectomía laparoscópica. Primeramente, se realizó un estudio de las características clínicas y antropométricas de la cohorte con el fin de caracterizar la cohorte de estudio. Dichas características se muestran en la Tabla 8. Brevemente, las mujeres fueron predominantes en todos los grupos estudiados y los pacientes con NAFLD presentaron una edad significativamente más avanzada que los individuos con HN. Como era de esperar, los pacientes con NASH presentaron un IMC significativamente mayor en comparación con los otros dos grupos (HN y NAFL). Además, las variables relacionadas con el metabolismo de glúcidos (glucosa, insulina, HOMA-IR) así como las enzimas hepáticas (GPT, GOT y GGT) mostraron diferencias significativas entre todos los grupos.

Tabla 8. Características de la población de estudio

	HN (n=75)	NAFL (n=56)	NASH (n=59)
Edad (años)	46,58 ± 14,11	52,51 ± 14,15*	55,42 ± 11,1***
Sexo (mujer/hombre, %)	13,33 / 86,67	33,9 / 66,1	44,07 / 55,93
IMC (kg/m ²)	27,57 ± 5,1	28,46 ± 3,96	34,14 ± 6,56***###
Glucosa (mg/dL)	92,6 ± 19,46	99,23 ± 13,92***	119,35 ± 48,5***
Insulina (μU/L)	7,67 ± 4,44	10,06 ± 5,36**	21,38 ± 15,11***###
HOMA-IR	1,83 ± 1,31	2,52 ± 1,53***	6,19 ± 4,92***###
Triglicéridos (mg/dL)	122,33 ± 66,78	135,52 ± 56,47*	176,22 ± 120,84***###
Colesterol total (mg/dL)	191,17 ± 38,48	203,96 ± 39,13	192,44 ± 45,29
GOT (IU/L)	17,96 ± 5,69	21,59 ± 8,65*	42,12 ± 25,95***###
GPT (IU/L)	18,52 ± 10,1	27,12 ± 17,27***	54,73 ± 33,02***###
GGT (IU/L)	32,36 ± 29,51	48,82 ± 52,26**	117,24 ± 194,33***###
Esteatosis (%)			
Grado 0	100%		8,5%
Grado 1		73,21%	28,8%
Grado 2		17,86%	33,9%
Grado 3		8,93%	28,8%
Ballooning e inflamación lobular (%)			
Grado 0	100%	87,5%	1,85%
Grado 1		12,5%	37,04%
Grado 2			51,85%
Grado 3			9,26%
Fibrosis (%)			
Grado 0	100%	100%	13,56%
Grado 1			35,6%
Grado 2			18,64%
Grado 3			20,34%
Grado 4			11,86%

Resultados y Discusión: Capítulo IV

Los datos se muestran como media \pm SD o como número de casos (%). HN, hígado normal; NAFL, hígado graso no alcohólico; NASH, esteatohepatitis no alcohólica; IMC, índice de masa corporal; HOMA-IR, índice de resistencia a la insulina HOMA (del inglés, *homeostatic model assessment-insulin resistance*); GOT, glutámico oxalacético transaminasa; GPT, transaminasa glutámico pirúvica; GGT, gamma-glutamil transferasa; (n=190). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$, NAFL o NASH vs. HN; ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,005$, NASH vs. NAFL.

2.2. La expresión hepática de BMP2 está aumentada en pacientes con NAFLD

Una vez establecidas las características de la población, se analizó la expresión hepática de BMP2 en el tejido hepático de estos pacientes obtenido mediante biopsia. Para ello, se realizó la extracción de ARNm del tejido y se midió mediante RT-qPCR la expresión del gen *BMP2*, observando que dicho gen se expresa el doble en las biopsias hepáticas de pacientes con NAFLD que en aquellas procedentes de individuos con una biopsia histológicamente normal ($p < 0,0002$, Figura 55A). De hecho, al comparar por grupos la expresión de BMP2 a nivel de ARNm con los HN, ésta fue significativamente mayor tanto en pacientes con NAFL (1,7 veces de aumento, $p = 0,0323$) como en pacientes con NASH (2,6 veces de aumento, $p < 0,0001$, Figura 55B) Cabe destacar que los niveles hepáticos de BMP2 fueron significativamente mayores en los pacientes con NASH comparados con los pacientes con NAFL ($p = 0,0047$), lo cual también sugiere que el aumento de expresión de BMP2 va en paralelo al daño hepático.

Asimismo, se encontró una correlación positiva y significativa entre la expresión a nivel de ARNm de BMP2 y la expresión del gen *CD36* en toda la población ($p < 0,0001$, Figura 55C). Este gen codifica para la proteína CD36, un transportador de ácidos grasos que contribuye a la acumulación de grasa en el hígado de los pacientes con NAFLD y a la disfunción metabólica; de hecho, se ha demostrado que su expresión está aumentada en pacientes con NAFLD y, particularmente, en la membrana plasmática de los hepatocitos (Miquilena-Colina et al., 2011; Rey et al., 2020).

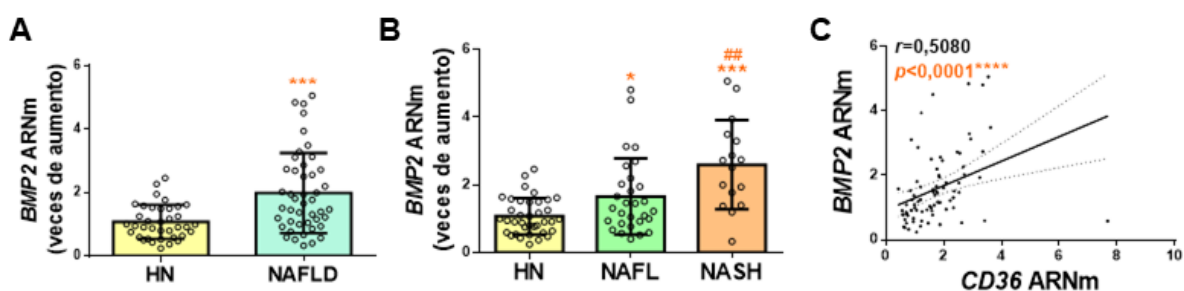
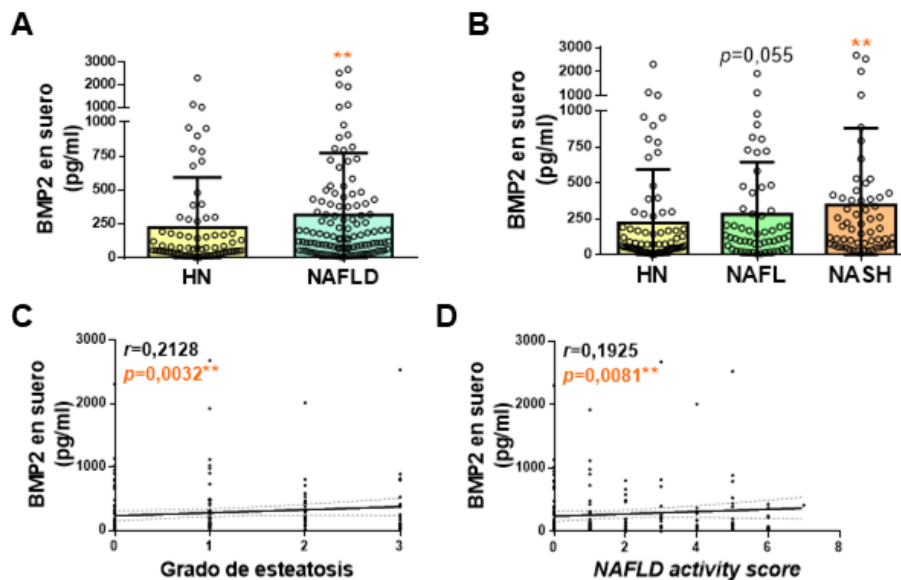


Figura 55. La expresión hepática de BMP2 está incrementada en pacientes con NAFLD. A y B. Nivel hepático de ARNm del gen *BMP2* determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (HN, 1) y presentados como media \pm SD. **C.** Análisis de la correlación entre los niveles de ARNm del gen *BMP2* y el gen *CD36*. Población de estudio: 115 pacientes con NAFLD, 56 con NAFL y 59 con NASH, y 75 individuos con HN. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,005$, NAFLD, NAFL o NASH vs. HN; ## $p < 0,01$, NASH vs. NAFL.

2.3. Los niveles circulantes de BMP2 están aumentados en pacientes con NAFLD

A continuación, se midieron los niveles de BMP2 en el suero de los individuos incluidos en la cohorte mediante ELISA, con el fin de evaluar si el aumento de BMP2 observado a nivel hepático se ve reflejado a nivel circulante y, por tanto, BMP2 podría servir como marcador sérico del daño hepático. Otros autores han descrito previamente que los niveles circulantes de diferentes proteínas BMP varían ampliamente en el contexto de otras enfermedades metabólicas. Por ejemplo, elevados niveles séricos de BMP4 se han asociado con aterosclerosis de la carótida en pacientes con DMT2 (Son et al., 2011); mientras que, en pacientes con síntomas asociados al síndrome metabólico como resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 o hipertensión arterial se ha detectado una disminución en la concentración circulante de BMP9 (Huang et al., 2018; Luo et al., 2017; Xu et al., 2017).

De manera similar a lo observado en el tejido hepático, se pudo comprobar que la media de los niveles circulantes de BMP2 fue significativamente más elevada en los pacientes con NAFLD en comparación con los individuos con HN ($p=0,0033$, Figura 56A). De hecho, las concentraciones en suero de BMP2 fueron más elevadas tanto en pacientes con NAFL como con NASH en comparación a los individuos con HN ($p=0,0552$ y $p=0,0025$, respectivamente; Figura 56B); aunque, no se halló una diferencia significativa entre ambos grupos de pacientes con NAFLD. Además, se observó un aumento progresivo y significativo de los niveles de BMP2 en pacientes con NAFLD en paralelo al grado de esteatosis ($p=0,0032$, Figura 56C) y al *NAFLD activity score* ($p=0,0081$, Figura 56D).



Teniendo en cuenta que la presencia de mujeres es superior en todos los grupos histológicos y que los pacientes con NAFLD presentan una edad más avanzada en comparación con los individuos con HN, una limitación de este estudio es el bajo tamaño muestral.

Por otro lado, estudios previos centrados en BMP2, asocian un incremento de los niveles séricos de esta proteína con la enfermedad de la arteria coronaria en pacientes diabéticos (Zhang et al., 2015). Además, se ha observado una elevación de la concentración circulante de BMP2 en mujeres de avanzada edad obesas o con sobrepeso (Ribeiro et al., 2017). Sin embargo, no se observaron diferencias al separar a la población en función del sexo ($p=0,2035$, Figura 57A), y no se observó una correlación significativa entre los niveles circulantes de BMP2 y la edad ($r=-0,05484$ $p=0,4524$, Figura 57B). Además, tampoco se observó una correlación significativa entre la concentración circulante de BMP2 y el IMC ($p=0,9132$, Figura 57C), lo cual concuerda con los resultados mostrados recientemente por Lopes et al. (Lopes et al., 2018). Del mismo modo, los niveles circulantes de BMP2 tampoco correlacionaron con el índice de resistencia a la insulina HOMA ($p=0,4420$, Figura 57D).

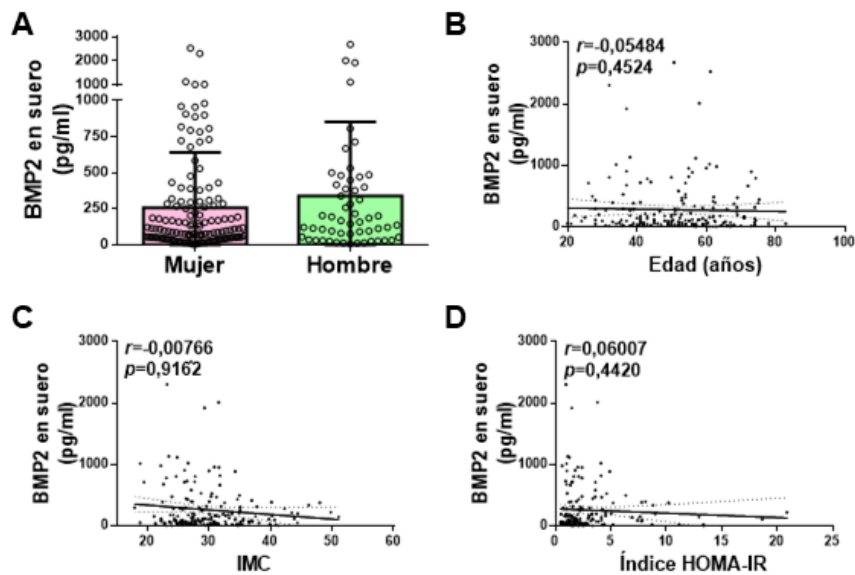


Figura 57. Los niveles séricos de BMP2 no están influenciados por otras variables clínicas. A Niveles circulantes de BMP2 determinado mediante ELISA. Los datos están expresados como media \pm SD. **B-D.** Análisis en la población de estudio de la correlación entre los niveles circulantes de BMP2 y la edad, el IMC y el Índice HOMA-IR. Población de estudio: 115 pacientes con NAFLD, 56 con NAFL y 59 con NASH, y 75 individuos con HN. IMC, índice de masa corporal.

3. La concentración circulante de BMP2 es un predictor independiente de NASH y el algoritmo SAN es capaz de discriminar NASH

El diagnóstico temprano, así como el tratamiento de los estadios iniciales de la NAFLD son importantes para prevenir su progresión hacia fases más avanzadas de la enfermedad. Hoy en día, no existen métodos no invasivos que hayan sido validados para la cuantificación histológica de la evolución de la NAFLD, y la biopsia hepática sigue siendo la técnica de referencia para diferenciar NAFL de NASH y/o el grado de fibrosis (Brunt, 2004; Kleiner et al., 2005). Por tanto, la búsqueda de nuevos marcadores serológicos para el diagnóstico y pronóstico de NASH es una prioridad.

Puesto que los niveles séricos de BMP2 fueron significativamente más elevados en pacientes con NAFLD que en individuos con HN, realizamos un análisis de regresión logística en toda la población de estudio para determinar si los niveles circulantes de BMP2 están asociados con NASH. Se aplicó el índice de Youden con el fin de encontrar el punto de corte (*cut-off*) con mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de NASH. Así, se estableció el *cut-off* en 49,21 pg/mL y la concentración de BMP2 circulante se identificó como un predictor independiente de NASH en análisis univariante (OR=3,5, IC95% [1,47-8,37], $p=0,005$; Tabla 9). A continuación, se llevó a cabo un análisis multivariante ajustado para factores de

Resultados y Discusión: Capítulo IV

confusión (edad, sexo, IMC) y variables clínicas relevantes para la NAFLD (Glucosa y γ -Glutaril transferasa, GGT). Este análisis mostró que la concentración de BMP2 en suero se mantiene como variable significativa asociada a NASH (OR=5,07, IC95% [1,55-16,6], $p=0,007$; Tabla 9).

Tabla 9. Análisis univariante y multivariante de las variables independientes asociadas a NASH en la población de estudio

Variables independientes	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	OR	95% IC	p valor	OR	95% IC	p valor
BMP2 (pg/ml) Cut-off = 49,21	3,5	[1,47-8,37]	0,005	5,07	[1,55-16,6]	0,007
Sexo (mujer/hombre)	2,77	[1,43-5,36]	0,002	2,96	[1,22-7,14]	0,016
Edad (años)	1,04	[1,01-1,06]	0,004	1,03	[0,99-1,06]	0,06
IMC (kg/m ²)	1,22	[1,14-1,31]	<0,001	1,28	[1,16-1,41]	<0,001
Glucosa (mg/dl)	1,03	[1,01-1,04]	<0,001	1,02	[1-1,04]	0,018
GGT (IU/L)	1,01	[1,01-1,02]	0,001	1,01	[1-1,02]	0,016

OR, relación de probabilidades (en inglés, *odds ratio*); IC, intervalo de confianza; IMC, índice de masa corporal; GGT, gamma-glutamil transferasa; (n=190).

Asimismo, se realizó un análisis de curva ROC para determinar la precisión del algoritmo basado en la fórmula derivada del modelo de regresión logística mencionado previamente (Figura 58). El análisis de curva ROC de este algoritmo, que se ha denominado SAN (del inglés *Screening Algorithm for NASH*), reveló una buena precisión para discriminar entre pacientes con NASH (AUROC, 0,886) e individuos con HN o pacientes con NAFL.

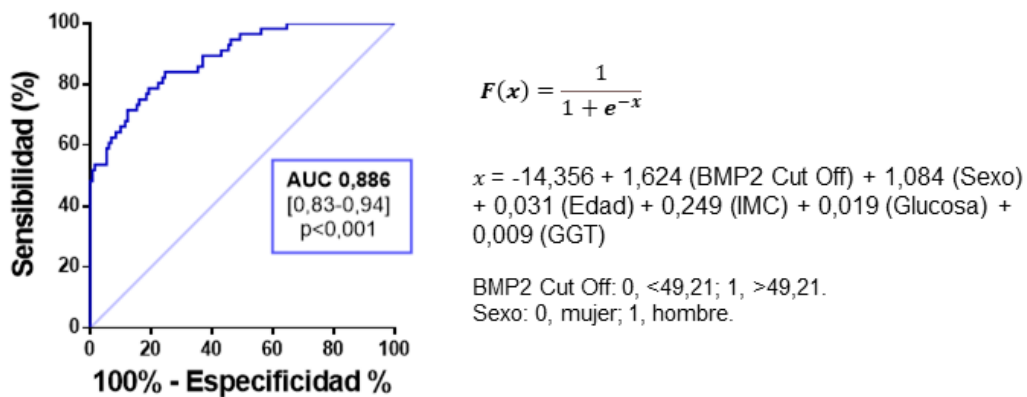


Figura 58. Precisión diagnóstica del algoritmo *Screening Algorithm for NASH (SAN)*. Área bajo la curva ROC (AUROC) mostrando la precisión diagnóstica de SAN para detectar NASH. Población de estudio: 115 pacientes con NAFLD, 56 con NAFL y 59 con NASH, y 75 individuos con HN. IMC, índice de masa corporal; GGT, gamma-glutamil transferasa.

A continuación, se analizó la precisión diagnóstica de SAN aplicando puntos de corte arbitrarios y equidistantes en los valores de probabilidad obtenidos tras la aplicación del algoritmo y establecer así los mejores puntos de corte (Tabla 10). En esta población, un valor de $SAN \leq 0,2$ permite excluir pacientes con NASH ($S = 0,84$, $VPN = 0,909$), mientras que un valor de $SAN \geq 0,6$ indica alto riesgo de obtener un diagnóstico mediante biopsia de NASH con una alta precisión ($E = 0,96$; $VPP = 0,86$), indicando que SAN puede ser de utilidad para cribar poblaciones en riesgo de padecer NASH. La importancia de este resultado recae en que, como se ha comentado anteriormente, actualmente no hay herramientas diagnósticas no invasivas validadas para predecir NASH, la fase clínicamente más relevante de la NAFLD que solo puede ser diagnosticada mediante biopsia hepática.

Tabla 10. Precisión diagnóstica de SAN

SAN pto. de corte	Precisión	%	S	E	VPP	VPN	RV+	RV-
≥ 0,10	0,66	60,2	0,93	0,54	0,46	0,95	2,02	0,13
≥ 0,20	0,71	48,9	0,84	0,66	0,52	0,90	2,47	0,24
≥ 0,30	0,80	36,6	0,77	0,81	0,63	0,89	4,05	0,28
≥ 0,40	0,81	32,8	0,73	0,85	0,67	0,88	4,87	0,32
≥ 0,50	0,83	24,2	0,62	0,92	0,78	0,85	7,75	0,41
≥ 0,60	0,83	18,8	0,54	0,96	0,86	0,83	13,5	0,48
≥ 0,70	0,84	15,1	0,48	0,99	0,96	0,82	48,0	0,53
≥ 0,80	0,82	12,4	0,41	1,00	1,00	0,80	N/A	0,59
≥ 0,90	0,78	8,1	0,27	1,00	1,00	0,76	N/A	0,73

SAN, *Screening Algorithm for NASH*; % = número de pacientes con SAN ≥ punto de corte; S, sensibilidad; E, especificidad; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; RV+, razón de verosimilitud positiva; RV-, razón de verosimilitud negativa.

4. Expresión de BMP2 en las células Huh7 sometidas a un modelo esteatogénico

Finalmente, con el fin de dilucidar qué tipo celular hepático podría ser responsable de la producción de BMP2 en el hígado graso, realizamos una serie de experimentos *in vitro* utilizando la línea hepatocitos humanos derivada de hepatoma Huh7 tratados con ácido palmítico (AP) a 750 μ M (AP750) durante 16 horas; un conocido protocolo utilizado para inducir la acumulación intracelular de lípidos (González-Rodríguez et al., 2014). Como era de esperar, tras la exposición al AP, aumentó el contenido lipídico intracelular de las células Huh7, lo cual se detectó gracias a la tinción con Oil Red O (ORO) (Figura 59A). En paralelo a esta acumulación de lípidos, se observó un aumento de BMP2 a nivel de ARNm en las Huh7 tratadas con AP750 (Figura 59B). Asimismo, se detectó un aumento de la concentración de BMP2 en el sobrenadante celular tras el tratamiento con AP (Figura 59C). Previamente se ha descrito que la estimulación de hepatocitos humanos con BMP2 en presencia de ácido oleico favorece la acumulación de ácidos grasos en estas células mediante la regulación de DGAT2, un importante regulador de los niveles hepáticos de triglicéridos, concediendo a BMP2 una posible función en el establecimiento y desarrollo de la NAFLD (Thayer et al., 2020).

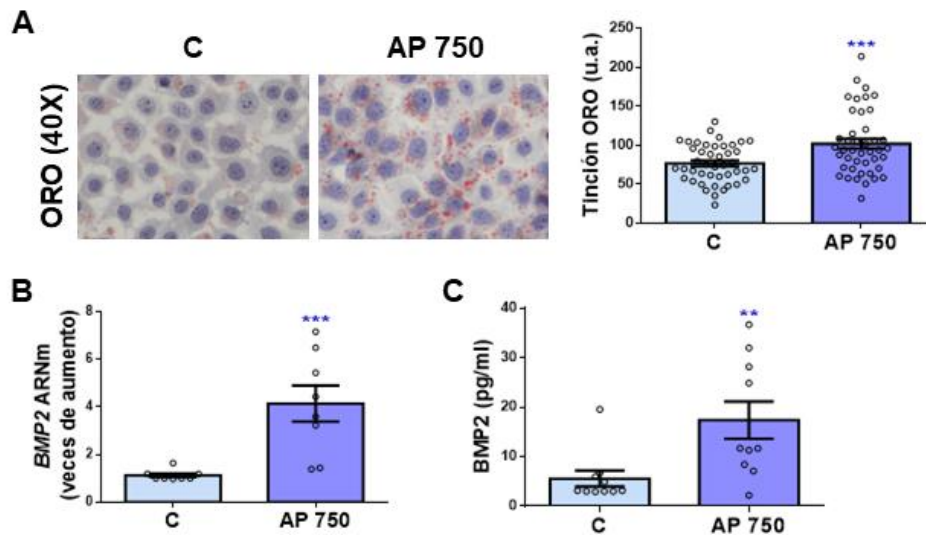


Figura 59. Expresión de BMP2 en células Huh7 tratadas con ácido palmítico. **A.** Imágenes representativas de tinción Oil Red O (ORO) (40X) y su cuantificación. **B.** Nivel de ARNm del gen *BMP2* determinado mediante RT-qPCR y normalizado con el gen *36B4*. Los datos están expresados como veces de aumento relativo a la condición control (C, 1). **C.** Niveles de BMP2 en el sobrenadante celular determinado mediante ELISA. Los datos están expresados como pg/ml y presentados como media \pm SEM. Condiciones experimentales: Células Huh7 tratadas con ácido palmítico a 750 μ M (AP750) o isopropanol como control (C) durante 16 horas (n=3 experimentos independientes realizados por duplicado). **p<0,01 y ***p<0,005, AP750 vs. C.

5. CONCLUSIÓN

Dado que la NAFLD es generalmente asintomática en el momento del diagnóstico, en la última década, ha habido un gran avance en la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico y/o pronóstico de esta patología. En este estudio, se muestra por primera vez que la expresión de BMP2 está incrementada en el hígado de ratones sometidos a un modelo de NAFLD inducido por dieta. Este incremento de expresión hepática de BMP2 también se detectó en el hígado de pacientes con NAFLD. Asimismo, los niveles circulantes de BMP2 fueron también mayores en estos pacientes que en individuos con un hígado histológicamente normal, posicionando esta proteína como una nueva diana molecular asociada a la NAFLD. Además, se muestra que las células Huh7 son capaces de producir y secretar BMP2 cuando se estimulan con ácido palmítico simulando las condiciones de la esteatosis (González-Rodríguez et al., 2014). Estos resultados indican que BMP2 podría estar involucrado en el proceso de hepatoesteatosis y no solo en el desarrollo de fibrosis como sugieren estudios previos donde se han puesto de manifiesto resultados contradictorios describiendo inicialmente un papel profibrogénico de BMP2 y posteriormente un papel antifibrogénico (Chung et al., 2018; Shen et al., 2003).

Resultados y Discusión: Capítulo IV

Además del que se ha expuesto en el capítulo anterior centrado en BMP8A, cabe destacar que solo dos estudios hasta ahora han demostrado que la expresión hepática de algunas proteínas BMP, específicamente BMP6 y BMP8B, se ven aumentadas en pacientes con NAFLD (Arndt et al., 2015; Mahli et al., 2019). Estos estudios, en conjunto con nuestros resultados, indican que las BMP pueden jugar un papel en la fisiopatología de la NAFLD. De hecho, aunque estudios previos señalan una modulación de los niveles circulantes de diferentes proteínas BMP en diferentes patologías metabólicas, este estudio es el primero publicado en reportar la concentración en suero de alguna BMP en pacientes con NAFLD.

Uno de los principales hallazgos del presente estudio es que los niveles en suero de BMP2 están significativamente asociados con la NASH diagnosticada mediante biopsia en un modelo de regresión logística multivariante, sugiriendo que BMP2 podría tener utilidad como biomarcador para el cribado de NASH en diferentes escenarios de la práctica clínica (Figura 60). Usando la concentración circulante de BMP2, combinada con las variables edad, sexo, IMC, glucosa y GGT, se generó mediante un modelo de regresión logística, el algoritmo denominado SAN (en inglés *Screening Algorithm for NASH*), capaz de discriminar entre pacientes con NASH e individuos con HN o pacientes con NAFL. Este hallazgo es de gran importancia dado que actualmente no existen métodos no invasivos y validados que permitan detectar la progresión de NAFL al estadio de NASH. Sin embargo, son necesarios futuros estudios en cohortes de pacientes con NAFLD más amplias para validar la potencial utilidad de SAN como algoritmo no invasivo para la evaluación de la NAFLD.

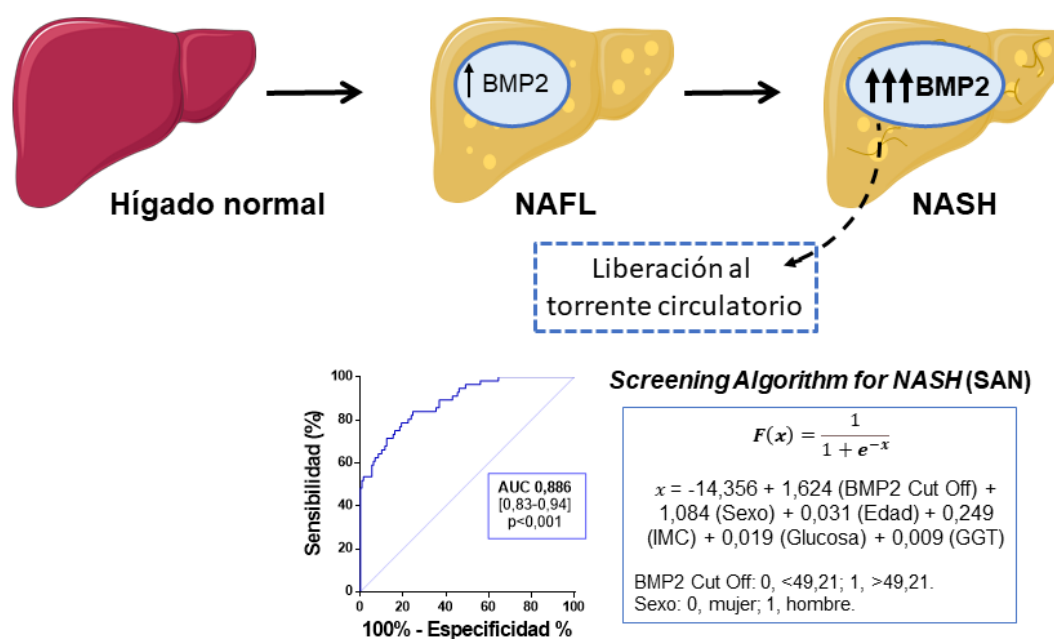


Figura 60. La expresión hepática y los niveles circulantes de BMP2 están aumentados en NAFLD en paralelo a la progresión de la enfermedad.

En conclusión, este estudio es una “prueba de concepto” que aporta por primera vez evidencia científica de que la expresión hepática y circulante de BMP2 se encuentra anormalmente elevada en pacientes con NAFLD, indicando que BMP2 es una nueva diana molecular asociada a la NAFLD en humanos.

CONCLUSIONS

Taking into account the results previously described, the following conclusions have been reached:

1. Inhibition of ALK3, but not ALK2, -mediated BMP signalling, protects against APAP-induced hepatotoxicity by reducing both necrosis and apoptosis, and oxidative stress.
2. Pharmacological inhibition of ALK3 using DMH2 attenuates hepatocyte necrosis, reduces the levels of serum transaminases, and prevents oxidative stress induced by an overdose of APAP in mice, providing new mechanistic evidence on the role of BMP signalling in the pathogenesis of ALF.
3. Both hepatic and serum levels of BMP6 are increased in an animal model of APAP-induced DILI, and correlate with liver injury markers. Moreover, circulating levels of BMP6 significantly correlate with the transaminase ALT in patients with an overdose of APAP, positioning this protein as a novel biomarker for diagnosis and/or prognosis of APAP-DILI.
4. BMP6 results a key player in the inflammatory cross talk between hepatocytes and macrophages during APAP hepatotoxicity, being released by hepatocytes during necrosis and promoting the expression of M2 markers in macrophages, in an attempt to counteract the inflammatory response.
5. Hepatic and serum levels of BMP8A are abnormally elevated in experimental models of liver fibrosis and in the serum of NASH patients with advanced hepatic fibrosis, indicating that BMP8A is a new molecular target linked to liver fibrogenesis.
6. *BMP8A fibrosis score* is a simple and efficient algorithm able to discriminate advanced hepatic fibrosis with a good accuracy in NASH patients, using the circulating concentration of BMP8A as an independent predictor.
7. Hepatic expression of BMP2 is increased in experimental models and patients with NAFLD, in parallel to the progression of the disease; positioning BMP2 as a new molecular target linked to NAFLD.
8. Circulating levels of BMP2 are abnormally elevated in NAFLD patients and significantly associated with NASH, suggesting that BMP2 is a good predictor for this pathology. Combination of serum levels of BMP2 with other variables in the algorithm *Screening Algorithm for NASH* showed good accuracy to discriminate NASH.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Misih, S. R., & Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *Surg Clin North Am*, 90(4), 643-653. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>
- Addante, A., Roncero, C., Almalé, L., Lazcanoiturburu, N., García-Álvaro, M., Fernández, M., . . . Sánchez, A. (2018). Bone morphogenetic protein 9 as a key regulator of liver progenitor cells in DDC-induced cholestatic liver injury. *Liver Int*, 38(9), 1664-1675. <https://doi.org/10.1111/liv.13879>
- Aktug Demir, N., Kolgelier, S., Inkaya, A. C., Sumer, S., Demir, L. S., Pehlivan, F. S., . . . Arpaci, A. (2014). Are bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) serum levels correlated with development of hepatic fibrosis? *J Infect Dev Ctries*, 8(5), 605-610. <https://doi.org/10.3855/jidc.4033>
- Almazroo, O. A., Miah, M. K., & Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clin Liver Dis*, 21(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.001>
- Almpanis, Z., Demonakou, M., & Tiniakos, D. (2016). Evaluation of liver fibrosis: "Something old, something new...". *Ann Gastroenterol*, 29(4), 445-453. <https://doi.org/10.20524/aog.2016.0046>
- Alves-Bezerra, M., & Cohen, D. E. (2017). Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr Physiol*, 8(1), 1-8. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>
- Ampuero, J., Pais, R., Aller, R., Gallego-Durán, R., Crespo, J., García-Monzón, C., . . . Registry, H. (2020). Development and Validation of Hepamet Fibrosis Scoring System-A Simple, Noninvasive Test to Identify Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease With Advanced Fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 18(1), 216-225.e215. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.05.051>
- Andrade, R. J., Chalasani, N., Björnsson, E. S., Suzuki, A., Kullak-Ublick, G. A., Watkins, P. B., . . . Aithal, G. P. (2019). Drug-induced liver injury. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), 58. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0105-0>
- Angulo, P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*, 346(16), 1221-1231. <https://doi.org/10.1056/NEJMra011775>

Bibliografía

Angulo, P., Hui, J. M., Marchesini, G., Bugianesi, E., George, J., Farrell, G. C., . . . Day, C. P. (2007). The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*, *45*(4), 846-854. <https://doi.org/10.1002/hep.21496>

Angulo, P., Kleiner, D. E., Dam-Larsen, S., Adams, L. A., Bjornsson, E. S., Charatcharoenwitthaya, P., . . . Bendtsen, F. (2015). Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, *149*(2), 389-397. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.043>

Antoniades, C. G., Berry, P. A., Wendon, J. A., & Vergani, D. (2008). The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *J Hepatol*, *49*(5), 845-861. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.08.009>

Arezes, J., Foy, N., McHugh, K., Sawant, A., Quinkert, D., Terraube, V., . . . Drakesmith, H. (2018). Erythroferrone inhibits the induction of hepcidin by BMP6. *Blood*, *132*(14), 1473-1477. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-857995>

Arndt, S., Wacker, E., Dorn, C., Koch, A., Saugspier, M., Thasler, W. E., . . . Hellerbrand, C. (2015). Enhanced expression of BMP6 inhibits hepatic fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, *64*(6), 973-981. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306968>

Arshad, M. A., Murphy, N., & Bangash, M. N. (2020). Acute liver failure. *Clin Med (Lond)*, *20*(5), 505-508. <https://doi.org/10.7861/clinmed.2020-0612>

Arthur, M. J. (2002). Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology*, *122*(5), 1525-1528. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.33367>

Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J., & Kamath, P. S. (2019). Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol*, *70*(1), 151-171. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>

Augeri, D. J., Langenfeld, E., Castle, M., Gilleran, J. A., & Langenfeld, J. (2016). Inhibition of BMP and of TGF β receptors downregulates expression of XIAP and TAK1 leading to lung cancer cell death. *Mol Cancer*, *15*, 27. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0511-9>

- B**abitt, J. L., Huang, F. W., Wrighting, D. M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T. A., . . . Lin, H. Y. (2006). Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*, *38*(5), 531-539. <https://doi.org/10.1038/ng1777>
- Baranova, A., Lal, P., Biredinc, A., & Younossi, Z. M. (2011). Non-invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterol*, *11*, 91. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-91>
- Barr, J., Caballería, J., Martínez-Arranz, I., Domínguez-Díez, A., Alonso, C., Muntané, J., . . . Mato, J. M. (2012). Obesity-dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression. *J Proteome Res*, *11*(4), 2521-2532. <https://doi.org/10.1021/pr201223p>
- Bartres, C., & Lens, S. (2013). [Elastography of the liver (Fibroscan®) in hepatology]. *Rev Esp Enferm Dig*, *105*(4), 235. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082013000400011>
- Bebarta, V. S., Kao, L., Froberg, B., Clark, R. F., Lavonas, E., Qi, M., . . . Al-Heljal, M. (2010). A multicenter comparison of the safety of oral versus intravenous acetylcysteine for treatment of acetaminophen overdose. *Clin Toxicol (Phila)*, *48*(5), 424-430. <https://doi.org/10.3109/15563650.2010.486381>
- Bedogni, G., Bellentani, S., Miglioli, L., Masutti, F., Passalacqua, M., Castiglione, A., & Tiribelli, C. (2006). The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol*, *6*, 33. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-6-33>
- Bernal, W., & Wendon, J. (2013). Acute liver failure. *N Engl J Med*, *369*(26), 2525-2534. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1208937>
- Bertolini, A., Ferrari, A., Ottani, A., Guerzoni, S., Tacchi, R., & Leone, S. (2006). Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev*, *12*(3-4), 250-275. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2006.00250.x>
- Blázquez-Medela, A. M., Jumabay, M., & Boström, K. I. (2019). Beyond the bone: Bone morphogenetic protein signaling in adipose tissue. *Obes Rev*, *20*(5), 648-658. <https://doi.org/10.1111/obr.12822>

Bibliografía

Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., & Nohe, A. (2011). Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal*, 23(4), 609-620. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.003>

Breitkopf-Heinlein, K., Meyer, C., König, C., Gaitantzi, H., Addante, A., Thomas, M., . . . Ten Dijke, P. (2017). BMP-9 interferes with liver regeneration and promotes liver fibrosis. *Gut*, 66(5), 939-954. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313314>

Brune, K., Renner, B., & Tiegs, G. (2015). Acetaminophen/paracetamol: A history of errors, failures and false decisions. *Eur J Pain*, 19(7), 953-965. <https://doi.org/10.1002/ejp.621>

Brunt, E. M. (2004). Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis*, 24(1), 3-20. <https://doi.org/10.1055/s-2004-823098>

Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A., & Bacon, B. R. (1999). Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*, 94(9), 2467-2474. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x>

Bunchorntavakul, C., & Reddy, K. R. (2018). Acetaminophen (APAP or N-Acetyl-p-Aminophenol) and Acute Liver Failure. *Clin Liver Dis*, 22(2), 325-346. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2018.01.007>

Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, 65(8), 1038-1048. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>

Caldwell, S., & Marchesini, G. (2018). Cryptogenic vs. NASH-cirrhosis: The rose exists well before its name.. *J Hepatol*, 68(3), 391-392. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.12.006>

Canali, S., Wang, C. Y., Zumbrennen-Bullough, K. B., Bayer, A., & Babitt, J. L. (2017). Bone morphogenetic protein 2 controls iron homeostasis in mice independent of Bmp6. *Am J Hematol*, 92(11), 1204-1213. <https://doi.org/10.1002/ajh.24888>

Cardoso, F. S., Marcelino, P., Bagulho, L., & Karvellas, C. J. (2017). Acute liver failure: An up-to-date approach. *J Crit Care*, 39, 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2017.01.003>

- Carreira, A. C., Alves, G. G., Zambuzzi, W. F., Sogayar, M. C., & Granjeiro, J. M. (2014). Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys*, *561*, 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.07.011>
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M., Cusi, K., . . . Sanyal, A. J. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*, *55*(6), 2005-2023. <https://doi.org/10.1002/hep.25762>
- Chaston, T. B., Matak, P., Pourvali, K., Srail, S. K., McKie, A. T., & Sharp, P. A. (2011). Hypoxia inhibits hepcidin expression in HuH7 hepatoma cells via decreased SMAD4 signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*, *300*(4), C888-895. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00121.2010>
- Chayanupatkul, M., Honsawek, S., Vejchapipat, P., Chongsrisawat, V., & Poovorawan, Y. (2009). Elevated serum bone morphogenetic protein 7 levels and clinical outcome in children with biliary atresia. *Eur J Pediatr Surg*, *19*(4), 246-250. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1216378>
- Cheemerla, S., & Balakrishnan, M. (2021). Global Epidemiology of Chronic Liver Disease. *Clin Liver Dis (Hoboken)*, *17*(5), 365-370. <https://doi.org/10.1002/cld.1061>
- Chen, G., Cheung, R., & Tom, J. W. (2017). Hepatitis: Sedation and Anesthesia Implications. *Anesth Prog*, *64*(2), 106-118. <https://doi.org/10.2344/anpr-64-02-13>
- Chiew, A. L., Glud, C., Brok, J., & Buckley, N. A. (2018). Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. *Cochrane Database Syst Rev*, *2*(2), CD003328. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003328.pub3>
- Chiu, H., Brittingham, J. A., & Laskin, D. L. (2002). Differential induction of heme oxygenase-1 in macrophages and hepatocytes during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat: effects of hemin and biliverdin. *Toxicol Appl Pharmacol*, *181*(2), 106-115. <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9409>
- Chung, D., Gao, F., Jegga, A. G., & Das, S. K. (2015). Estrogen mediated epithelial proliferation in the uterus is directed by stromal Fgf10 and Bmp8a. *Mol Cell Endocrinol*, *400*, 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.11.002>

Bibliografía

Chung, R. T., Stravitz, R. T., Fontana, R. J., Schiodt, F. V., Mehal, W. Z., Reddy, K. R., & Lee, W. M. (2012). Pathogenesis of liver injury in acute liver failure. *Gastroenterology*, *143*(3), e1-e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.07.011>

Chung, Y. H., Huang, Y. H., Chu, T. H., Chen, C. L., Lin, P. R., Huang, S. C., . . . Tai, M. H. (2018). BMP-2 restoration aids in recovery from liver fibrosis by attenuating TGF- β 1 signaling. *Lab Invest*, *98*(8), 999-1013. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0069-9>

Cobbina, E., & Akhlaghi, F. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Rev*, *49*(2), 197-211. <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1293683>

Corradini, E., Babitt, J. L., & Lin, H. Y. (2009). The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, *20*(5-6), 389-398. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.008>

Daher, R., Kannengiesser, C., Houamel, D., Lefebvre, T., Bardou-Jacquet, E., Ducrot, N., . . . Tchernitchko, D. (2016). Heterozygous Mutations in BMP6 Pro-peptide Lead to Inappropriate Hepcidin Synthesis and Moderate Iron Overload in Humans. *Gastroenterology*, *150*(3), 672-683.e674. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.049>

Day, C. P., & James, O. F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*, *114*(4), 842-845. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70599-2](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70599-2)

DeLeve, L. D., & Maretta-Mira, A. C. (2017). Liver Sinusoidal Endothelial Cell: An Update. *Semin Liver Dis*, *37*(4), 377-387. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1617455>

Delima, R. D., Chua, A. C., Tirnitz-Parker, J. E., Gan, E. K., Croft, K. D., Graham, R. M., . . . Trinder, D. (2012). Disruption of hemochromatosis protein and transferrin receptor 2 causes iron-induced liver injury in mice. *Hepatology*, *56*(2), 585-593. <https://doi.org/10.1002/hep.25689>

Dixon, J. B., Bhathal, P. S., Hughes, N. R., & O'Brien, P. E. (2004). Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology*, *39*(6), 1647-1654. <https://doi.org/10.1002/hep.20251>

Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., & Nagy, L. E. (2013). Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol*, 3(2), 785-797. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120026>

Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 115(5), 1343-1351. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>

Du, K., Ramachandran, A., & Jaeschke, H. (2016). Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biol*, 10, 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.001>

Du, Z., Ma, Z., Lai, S., Ding, Q., Hu, Z., Yang, W., . . . Li, S. (2022). Atractylenolide I Ameliorates Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury. *Front Pharmacol*, 13, 797499. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.797499>

Duarte, S., Baber, J., Fujii, T., & Coito, A. J. (2015). Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol*, 44-46, 147-156. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.004>

Ducy, P., & Karsenty, G. (2000). The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int*, 57(6), 2207-2214. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00081.x>

Dulai, P. S., Singh, S., Patel, J., Soni, M., Prokop, L. J., Younossi, Z., . . . Loomba, R. (2017). Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology*, 65(5), 1557-1565. <https://doi.org/10.1002/hep.29085>

Ekstedt, M., Hagström, H., Nasr, P., Fredrikson, M., Stål, P., Kechagias, S., & Hultcrantz, R. (2015). Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*, 61(5), 1547-1554. <https://doi.org/10.1002/hep.27368>

Falade-Nwulia, O., Suarez-Cuervo, C., Nelson, D. R., Fried, M. W., Segal, J. B., & Sulkowski, M. S. (2017). Oral Direct-Acting Agent Therapy for Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review. *Ann Intern Med*, 166(9), 637-648. <https://doi.org/10.7326/M16-2575>

Fan, J., Shen, H., Sun, Y., Li, P., Burczynski, F., Namaka, M., & Gong, Y. (2006). Bone morphogenetic protein 4 mediates bile duct ligation induced liver fibrosis through activation of

Bibliografía

Smad1 and ERK1/2 in rat hepatic stellate cells. *J Cell Physiol*, 207(2), 499-505. <https://doi.org/10.1002/jcp.20593>

Fisher, E. S., & Curry, S. C. (2019). Evaluation and treatment of acetaminophen toxicity. *Adv Pharmacol*, 85, 263-272. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2018.12.004>

Foucher, J., Castéra, L., Bernard, P. H., Adhoute, X., Laharie, D., Bertet, J., . . . de Lédinghen, V. (2006). Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 18(4), 411-412. <https://doi.org/10.1097/00042737-200604000-00015>

Friedman, S. L. (2003). Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol*, 38 Suppl 1, S38-53. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(02\)00429-4](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(02)00429-4)

Fu, S., Wu, D., Jiang, W., Li, J., Long, J., Jia, C., & Zhou, T. (2019). Molecular Biomarkers in Drug-Induced Liver Injury: Challenges and Future Perspectives. *Front Pharmacol*, 10, 1667. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01667>

García-Monzón, C., Vargas-Castrillón, J., Porrero, J. L., Alonso, M. T., Bonachía, O., Castillo, M. J., . . . Miquilena-Colina, M. E. (2015). Prevalence and risk factors for biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in a prospective cohort of adult patients with gallstones. *Liver Int*, 35(8), 1983-1991. <https://doi.org/10.1111/liv.12813>

Geib, T., Lento, C., Wilson, D. J., & Sleno, L. (2019). Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Acetaminophen Covalent Binding to Glutathione. *Front Chem*, 7, 558. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00558>

Germani, G., Theocharidou, E., Adam, R., Karam, V., Wendon, J., O'Grady, J., . . . Burroughs, A. K. (2012). Liver transplantation for acute liver failure in Europe: outcomes over 20 years from the ELTR database. *J Hepatol*, 57(2), 288-296. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.03.017>

Goh, G. B., & McCullough, A. J. (2016). Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci*, 61(5), 1226-1233. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4095-4>

Golabi, P., Rhea, L., Henry, L., & Younossi, Z. M. (2019). Hepatocellular carcinoma and non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int*, 13(6), 688-694. <https://doi.org/10.1007/s12072-019-09995-8>

Gomez-Puerto, M. C., Iyengar, P. V., García de Vinuesa, A., Ten Dijke, P., & Sanchez-Duffhues, G. (2019). Bone morphogenetic protein receptor signal transduction in human disease. *J Pathol*, 247(1), 9-20. <https://doi.org/10.1002/path.5170>

González-Rodríguez, A., Mayoral, R., Agra, N., Valdecantos, M. P., Pardo, V., Miquilena-Colina, M. E., . . . Valverde, Á. (2014). Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis*, 5(4), e1179. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.162>

Graham, G. G., Davies, M. J., Day, R. O., Mohamudally, A., & Scott, K. F. (2013). The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology*, 21(3), 201-232. <https://doi.org/10.1007/s10787-013-0172-x>

Graham, G. G., & Scott, K. F. (2005). Mechanism of action of paracetamol. *Am J Ther*, 12(1), 46-55. <https://doi.org/10.1097/00045391-200501000-00008>

Grant, D. M. (1991). Detoxification pathways in the liver. *J Inherit Metab Dis*, 14(4), 421-430. <https://doi.org/10.1007/BF01797915>

Grek, A., & Arasi, L. (2016). Acute Liver Failure. *AACN Adv Crit Care*, 27(4), 420-429. <https://doi.org/10.4037/aacnacc2016324>

Hao, Z. M., Cai, M., Lv, Y. F., Huang, Y. H., & Li, H. H. (2012). Oral administration of recombinant adeno-associated virus-mediated bone morphogenetic protein-7 suppresses CCl(4)-induced hepatic fibrosis in mice. *Mol Ther*, 20(11), 2043-2051. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.148>

Hardy, T., Oakley, F., Anstee, Q. M., & Day, C. P. (2016). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annu Rev Pathol*, 11, 451-496. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044224>

Bibliografía

Heard, K. J., Green, J. L., James, L. P., Judge, B. S., Zolot, L., Rhyee, S., & Dart, R. C. (2011). Acetaminophen-cysteine adducts during therapeutic dosing and following overdose. *BMC Gastroenterol*, 11, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-20>

Hernandez-Gea, V., & Friedman, S. L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol*, 6, 425-456. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130246>

Herrera, B., García-Álvaro, M., Cruz, S., Walsh, P., Fernández, M., Roncero, C., . . . Inman, G. J. (2013). BMP9 is a proliferative and survival factor for human hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*, 8(7), e69535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069535>

Herrera, B., Sánchez, A., & Fabregat, I. (2012). BMPS and liver: more questions than answers. *Curr Pharm Des*, 18(27), 4114-4125. <https://doi.org/10.2174/138161212802430503>

Higashi, T., Friedman, S. L., & Hoshida, Y. (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev*, 121, 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.007>

Huang, D. Q., El-Serag, H. B., & Loomba, R. (2021). Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 18(4), 223-238. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00381-6>

Huang, H., Wang, W., Yang, G., Zhang, Y., Li, X., Liu, H., . . . Li, L. (2018). Circulating bone morphogenetic protein-9 levels are associated with hypertension and insulin resistance in humans. *J Am Soc Hypertens*, 12(5), 372-380. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2018.02.007>

Iorga, A., Dara, L., & Kaplowitz, N. (2017). Drug-Induced Liver Injury: Cascade of Events Leading to Cell Death, Apoptosis or Necrosis. *Int J Mol Sci*, 18(5). <https://doi.org/10.3390/ijms18051018>

Jóźwiak-Bebenista, M., & Nowak, J. Z. (2014). Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol Pharm*, 71(1), 11-23.

Kandiah, P. A., & Subramanian, R. M. (2019). Extracorporeal Devices. *Crit Care Clin*, 35(1), 135-150. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2018.08.003>

- Kanwar, P., & Kowdley, K. V. (2016). The Metabolic Syndrome and Its Influence on Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis*, 20(2), 225-243. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2015.10.002>
- Katagiri, T., & Watabe, T. (2016). Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021899>
- Kautz, L., Besson-Fournier, C., Meynard, D., Latour, C., Roth, M. P., & Coppin, H. (2011). Iron overload induces BMP6 expression in the liver but not in the duodenum. *Haematologica*, 96(2), 199-203. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.031963>
- Kim, S. K., Henen, M. A., & Hinck, A. P. (2019). Structural biology of betaglycan and endoglin, membrane-bound co-receptors of the TGF-beta family. *Exp Biol Med (Maywood)*, 244(17), 1547-1558. <https://doi.org/10.1177/1535370219881160>
- Kinoshita, K., Iimuro, Y., Otagawa, K., Saika, S., Inagaki, Y., Nakajima, Y., . . . Ikeda, K. (2007). Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. *Gut*, 56(5), 706-714. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.092460>
- Kjærsgaard, K., Frisch, K., Sørensen, M., Munk, O. L., Hofmann, A. F., Horsager, J., . . . Keiding, S. (2021). Obeticholic acid improves hepatic bile acid excretion in patients with primary biliary cholangitis. *J Hepatol*, 74(1), 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.07.028>
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., . . . Network, N. S. C. R. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), 1313-1321. <https://doi.org/10.1002/hep.20701>
- Knight, T. R., Ho, Y. S., Farhood, A., & Jaeschke, H. (2002). Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: protection by glutathione. *J Pharmacol Exp Ther*, 303(2), 468-475. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.038968>
- Kobayashi, H., Gieniec, K. A., Wright, J. A., Wang, T., Asai, N., Mizutani, Y., . . . Woods, S. L. (2021). The Balance of Stromal BMP Signaling Mediated by GREM1 and ISLR Drives Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 160(4), 1224-1239.e1230. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.11.011>

Bibliografía

Koch, P. S., Olsavszky, V., Ulbrich, F., Sticht, C., Demory, A., Leibing, T., . . . Géraud, C. (2017). Angiocrine Bmp2 signaling in murine liver controls normal iron homeostasis. *Blood*, 129(4), 415-419. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-729822>

Koyama, Y., & Brenner, D. A. (2017). Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest*, 127(1), 55-64. <https://doi.org/10.1172/JCI88881>

Kwon, S. J., Lee, G. T., Lee, J. H., Kim, W. J., & Kim, I. Y. (2009). Bone morphogenetic protein-6 induces the expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Immunology*, 128(1 Suppl), e758-765. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03079.x>

Lai, M., & Afdhal, N. H. (2019). Liver Fibrosis Determination. *Gastroenterol Clin North Am*, 48(2), 281-289. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2019.02.002>

Larson, A. M. (2007). Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis*, 11(3), 525-548, vi. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2007.06.006>

Lee, G. T., Jung, Y. S., Lee, J. H., Kim, W. J., & Kim, I. Y. (2011). Bone morphogenetic protein 6-induced interleukin-1 β expression in macrophages requires PU.1/Smad1 interaction. *Mol Immunol*, 48(12-13), 1540-1547. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.04.019>

Lee, J. H., Kim, D., Kim, H. J., Lee, C. H., Yang, J. I., Kim, W., . . . Lee, H. S. (2010). Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis*, 42(7), 503-508. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2009.08.002>

Lee, J. H., Lee, G. T., Woo, S. H., Ha, Y. S., Kwon, S. J., Kim, W. J., & Kim, I. Y. (2013). BMP-6 in renal cell carcinoma promotes tumor proliferation through IL-10-dependent M2 polarization of tumor-associated macrophages. *Cancer Res*, 73(12), 3604-3614. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4563>

Lee, W. M. (2017). Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity-Isn't it time for APAP to go away? *J Hepatol*, 67(6), 1324-1331. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.07.005>

Lee, W. M., Squires, R. H., Nyberg, S. L., Doo, E., & Hoofnagle, J. H. (2008). Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology*, 47(4), 1401-1415. <https://doi.org/10.1002/hep.22177>

- Letteron, P., Fromenty, B., Terris, B., Degott, C., & Pessayre, D. (1996). Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol*, *24*(2), 200-208. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(96\)80030-4](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(96)80030-4)
- Li, W., Cai, H. X., Ge, X. M., Li, K., Xu, W. D., & Shi, W. H. (2013). Prognostic significance of BMP7 as an oncogene in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*, *34*(2), 669-674. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0594-x>
- Li, Y., Huang, X., Wang, J., Huang, R., & Wan, D. (2020). Regulation of Iron Homeostasis and Related Diseases. *Mediators Inflamm*, *2020*, 6062094. <https://doi.org/10.1155/2020/6062094>
- Liang, Z., Wu, B., Ji, Z., Liu, W., Shi, D., Chen, X., . . . Jiang, J. (2021). The binding of LDN193189 to CD133 C-terminus suppresses the tumorigenesis and immune escape of liver tumor-initiating cells. *Cancer Lett*, *513*, 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.05.003>
- Lim, P. J., Duarte, T. L., Arezes, J., Garcia-Santos, D., Hamdi, A., Pasricha, S. R., . . . Drakesmith, H. (2019). Nrf2 controls iron homeostasis in haemochromatosis and thalassaemia via Bmp6 and hepcidin. *Nat Metab*, *1*(5), 519-531. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0063-6>
- Lin, Z. H., Xin, Y. N., Dong, Q. J., Wang, Q., Jiang, X. J., Zhan, S. H., . . . Xuan, S. Y. (2011). Performance of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the staging of hepatitis C-related fibrosis: an updated meta-analysis. *Hepatology*, *53*(3), 726-736. <https://doi.org/10.1002/hep.24105>
- Lindenmeyer, C. C., & McCullough, A. J. (2018). The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-An Evolving View. *Clin Liver Dis*, *22*(1), 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2017.08.003>
- Liu, K., Gao, M., Qin, D., Wang, H., & Lu, Q. (2020). Serous BMP8A has Clinical Significance in the Ultrasonic Diagnosis of Thyroid Cancer and Promotes Thyroid Cancer Cell Progression. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, *20*(4), 591-598. <https://doi.org/10.2174/1871530319666191018170022>
- Liu, L., Ding, W. Y., Zhao, J., Wang, Z. H., Zhong, M., Zhang, W., . . . Tang, M. X. (2013). Activin receptor-like kinase 7 mediates high glucose-induced H9c2 cardiomyoblast apoptosis through activation of Smad2/3. *Int J Biochem Cell Biol*, *45*(9), 2027-2035. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.018>

Bibliografía

Liu, Z., Shen, J., Pu, K., Katus, H. A., Plöger, F., Tiefenbacher, C. P., . . . Braun, T. (2009). GDF5 and BMP2 inhibit apoptosis via activation of BMPR2 and subsequent stabilization of XIAP. *Biochim Biophys Acta*, 1793(12), 1819-1827. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.09.012>

Lopes, L. R., Ribeiro, S. M. L. T., Figueiredo, V. P., Leite, A. L. J., Nicolato, R. L. C., Gomes, J. A. E., . . . Talvani, A. (2018). The overweight increases circulating inflammatory mediators commonly associated with obesity in young individuals. *Cytokine*, 110, 169-173. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.04.024>

Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B., & Oh, B. J. (1980). Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*, 55(7), 434-438.

Luo, Y., Li, L., Xu, X., Wu, T., Yang, M., Zhang, C., . . . Zhang, X. (2017). Decreased circulating BMP-9 levels in patients with Type 2 diabetes is a signature of insulin resistance. *Clin Sci (Lond)*, 131(3), 239-246. <https://doi.org/10.1042/CS20160543>

Maegdefrau, U., & Bosserhoff, A. K. (2012). BMP activated Smad signaling strongly promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Exp Mol Pathol*, 92(1), 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.10.004>

Mahli, A., Seitz, T., Beckröge, T., Freese, K., Thasler, W. E., Benkert, M., . . . Hellerbrand, C. (2019). Bone Morphogenetic Protein-8B Expression is Induced in Steatotic Hepatocytes and Promotes Hepatic Steatosis and Inflammation In Vitro. *Cells*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/cells8050457>

Marcellin, P., & Kutala, B. K. (2018). Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver Int*, 38 Suppl 1, 2-6. <https://doi.org/10.1111/liv.13682>

Marchesini, G., Brizi, M., Bianchi, G., Tomassetti, S., Bugianesi, E., Lenzi, M., . . . Melchionda, N. (2001). Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*, 50(8), 1844-1850. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1844>

Martínez, V. G., Rubio, C., Martínez-Fernández, M., Segovia, C., López-Calderón, F., Garín, M. I., . . . Dueñas, M. (2017). BMP4 Induces M2 Macrophage Polarization and Favors Tumor

Progression in Bladder Cancer. *Clin Cancer Res*, 23(23), 7388-7399. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1004>

Mayo, R., Crespo, J., Martínez-Arranz, I., Banales, J. M., Arias, M., Mincholé, I., . . . Mato, J. M. (2018). Metabolomic-based noninvasive serum test to diagnose nonalcoholic steatohepatitis: Results from discovery and validation cohorts. *Hepatol Commun*, 2(7), 807-820. <https://doi.org/10.1002/hep4.1188>

McGill, M. R., & Jaeschke, H. (2018). Biomarkers of drug-induced liver injury: progress and utility in research, medicine, and regulation. *Expert Rev Mol Diagn*, 18(9), 797-807. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1508998>

McPherson, S., Hardy, T., Henderson, E., Burt, A. D., Day, C. P., & Anstee, Q. M. (2015). Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol*, 62(5), 1148-1155. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.034>

McPherson, S., Stewart, S. F., Henderson, E., Burt, A. D., & Day, C. P. (2010). Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, 59(9), 1265-1269. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.216077>

Meynard, D., Kautz, L., Darnaud, V., Canonne-Hergaux, F., Coppin, H., & Roth, M. P. (2009). Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet*, 41(4), 478-481. <https://doi.org/10.1038/ng.320>

Miquilena-Colina, M. E., Lima-Cabello, E., Sánchez-Campos, S., García-Mediavilla, M. V., Fernández-Bermejo, M., Lozano-Rodríguez, T., . . . García-Monzón, C. (2011). Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*, 60(10), 1394-1402. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.222844>

Miyazono, K., Kamiya, Y., & Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*, 147(1), 35-51. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp148>

Mobasher, M. A., González-Rodríguez, A., Santamaría, B., Ramos, S., Martín, M., Goya, L., . . . Valverde, A. M. (2013). Protein tyrosine phosphatase 1B modulates GSK3 β /Nrf2 and IGFIR

Bibliografía

signaling pathways in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Cell Death Dis*, 4(5), e626. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.150>

Modica, S., & Wolfrum, C. (2013). Bone morphogenic proteins signaling in adipogenesis and energy homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, 1831(5), 915-923. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2013.01.010>

Morrell, N. W., Bloch, D. B., ten Dijke, P., Goumans, M. J., Hata, A., Smith, J., . . . Bloch, K. D. (2016). Targeting BMP signalling in cardiovascular disease and anaemia. *Nat Rev Cardiol*, 13(2), 106-120. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.156>

Mueller, T. D., & Nickel, J. (2012). Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett*, 586(14), 1846-1859. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.02.043>

Muñoz, M., García-Erce, J. A., & Remacha, A. F. (2011). Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homeostasis. *J Clin Pathol*, 64(4), 281-286. <https://doi.org/10.1136/jcp.2010.079046>

Muñoz-Félix, J. M., Cuesta, C., Perretta-Tejedor, N., Subileau, M., López-Hernández, F. J., López-Novoa, J. M., & Martínez-Salgado, C. (2016). Identification of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) as a novel profibrotic factor in vitro. *Cell Signal*, 28(9), 1252-1261. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.05.015>

Muñoz-Félix, J. M., González-Núñez, M., Martínez-Salgado, C., & López-Novoa, J. M. (2015). TGF- β /BMP proteins as therapeutic targets in renal fibrosis. Where have we arrived after 25 years of trials and tribulations? *Pharmacol Ther*, 156, 44-58. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.10.003>

Nakashima, M., & Reddi, A. H. (2003). The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 21(9), 1025-1032. <https://doi.org/10.1038/nbt864>

Nakatsuka, R., Taniguchi, M., Hirata, M., Shiota, G., & Sato, K. (2007). Transient expression of bone morphogenetic protein-2 in acute liver injury by carbon tetrachloride. *J Biochem*, 141(1), 113-119. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm012>

Nanra, R. S. (1980). Clinical and pathological aspects of analgesic nephropathy. *Br J Clin Pharmacol*, 10 Suppl 2(Suppl 2), 359S-368S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1980.tb01824.x>

Nassir, F., Rector, R. S., Hammoud, G. M., & Ibdah, J. A. (2015). Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 11(3), 167-175.

Nickel, J., Ten Dijke, P., & Mueller, T. D. (2018). TGF- β family co-receptor function and signaling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 50(1), 12-36. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx126>

Nikolic, I., Yung, L. M., Yang, P., Malhotra, R., Paskin-Flerlage, S. D., Dinter, T., . . . Yu, P. B. (2019). Bone Morphogenetic Protein 9 Is a Mechanistic Biomarker of Portopulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 199(7), 891-902. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1236OC>

Oketani, M., Uto, H., Ido, A., & Tsubouchi, H. (2014). Management of hepatitis B virus-related acute liver failure. *Clin J Gastroenterol*, 7(1), 19-26. <https://doi.org/10.1007/s12328-013-0447-1>

Oumi, N., Taniguchi, K. A., Kanai, A. M., Yasunaga, M., Nakanishi, T., & Sato, K. (2012). A crucial role of bone morphogenetic protein signaling in the wound healing response in acute liver injury induced by carbon tetrachloride. *Int J Hepatol*, 2012, 476820. <https://doi.org/10.1155/2012/476820>

Owen, N. E., Alexander, G. J., Sen, S., Bunclark, K., Polwarth, G., Pepke-Zaba, J., . . . Upton, P. D. (2020). Reduced circulating BMP10 and BMP9 and elevated endoglin are associated with disease severity, decompensation and pulmonary vascular syndromes in patients with cirrhosis. *EBioMedicine*, 56, 102794. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102794>

Palmentieri, B., de Sio, I., La Mura, V., Masarone, M., Vecchione, R., Bruno, S., . . . Persico, M. (2006). The role of bright liver echo pattern on ultrasound B-mode examination in the diagnosis of liver steatosis. *Dig Liver Dis*, 38(7), 485-489. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2006.03.021>

Bibliografía

Pardo, V., González-Rodríguez, Á., Muntané, J., Kozma, S. C., & Valverde, Á. (2015). Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection. *Food Chem Toxicol*, *80*, 298-309. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.029>

Park, B. K., Pirmohamed, M., & Kitteringham, N. R. (1995). The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol Ther*, *68*(3), 385-424. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)02013-6)

Parola, M., & Pinzani, M. (2019). Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Mol Aspects Med*, *65*, 37-55. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.09.002>

Patricia, M., Ernesto, F.-G. C., Stephania, C. I., Esther, R., Rocío, G.-D., Rocío, M.-V., . . . Águeda, G.-R. (2022). Bone morphogenetic protein 2 is a new molecular target linked to nonalcoholic fatty liver disease with potential value as non-invasive screening tool. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.03.17.22272494>

Peng, Q., Chen, B., Wang, H., Zhu, Y., Wu, J., Luo, Y., . . . Fan, J. (2019). Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) alleviates hepatic steatosis by increasing hepatic lipid turnover and inhibiting the mTORC1 signaling axis in hepatocytes. *Aging (Albany NY)*, *11*(23), 11520-11540. <https://doi.org/10.18632/aging.102552>

Pezzia, C., Sanders, C., Welch, S., Bowling, A., Lee, W. M., & Group, A. L. F. S. (2017). Psychosocial and behavioral factors in acetaminophen-related acute liver failure and liver injury. *J Psychosom Res*, *101*, 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2017.08.006>

Pfaffenbach, K. T., Gentile, C. L., Nivala, A. M., Wang, D., Wei, Y., & Pagliassotti, M. J. (2010). Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *298*(5), E1027-1035. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00642.2009>

Pfeiffenberger, J., Weiss, K. H., & Stremmel, W. (2017). Wilson disease: symptomatic liver therapy. *Handb Clin Neurol*, *142*, 205-209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63625-6.00017-3>

Pimpin, L., Cortez-Pinto, H., Negro, F., Corbould, E., Lazarus, J. V., Webber, L., . . . Committee, E. H. S. (2018). Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of

risk factors to identify prevention policies. *J Hepatol*, 69(3), 718-735. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.05.011>

Platko, K., Lebeau, P. F., Byun, J. H., Poon, S. V., Day, E. A., MacDonald, M. E., . . . Austin, R. C. (2019). GDF10 blocks hepatic PPAR γ activation to protect against diet-induced liver injury. *Mol Metab*, 27, 62-74. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.06.021>

Plauth, M., Bernal, W., Dasarathy, S., Merli, M., Plank, L. D., Schütz, T., & Bischoff, S. C. (2019). ESPEN guideline on clinical nutrition in liver disease. *Clin Nutr*, 38(2), 485-521. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.022>

Powell, E. E., Cooksley, W. G., Hanson, R., Searle, J., Halliday, J. W., & Powell, L. W. (1990). The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology*, 11(1), 74-80. <https://doi.org/10.1002/hep.1840110114>

Puche, J. E., Saiman, Y., & Friedman, S. L. (2013). Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*, 3(4), 1473-1492. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120035>

Rada, P., González-Rodríguez, Á., García-Monzón, C., & Valverde, Á. (2020). Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver? *Cell Death Dis*, 11(9), 802. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03003-w>

Rada, P., Pardo, V., Mobasher, M. A., García-Martínez, I., Ruiz, L., González-Rodríguez, Á., . . . Valverde, Á. (2018). SIRT1 Controls Acetaminophen Hepatotoxicity by Modulating Inflammation and Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*, 28(13), 1187-1208. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7373>

Rahman, M. S., Akhtar, N., Jamil, H. M., Banik, R. S., & Asaduzzaman, S. M. (2015). TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res*, 3, 15005. <https://doi.org/10.1038/boneres.2015.5>

Rajaram, P., & Subramanian, R. (2018). Acute Liver Failure. *Semin Respir Crit Care Med*, 39(5), 513-522. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1673372>

Bibliografía

Ramachandran, A., & Jaeschke, H. (2018). Acetaminophen Toxicity: Novel Insights Into Mechanisms and Future Perspectives. *Gene Expr*, 18(1), 19-30. <https://doi.org/10.3727/105221617X15084371374138>

Ramachandran, P., & Iredale, J. P. (2009). Reversibility of liver fibrosis. *Ann Hepatol*, 8(4), 283-291.

Rausa, M., Pagani, A., Nai, A., Campanella, A., Gilberti, M. E., Apostoli, P., . . . Silvestri, L. (2015). Bmp6 expression in murine liver non parenchymal cells: a mechanism to control their high iron exporter activity and protect hepatocytes from iron overload? *PLoS One*, 10(4), e0122696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122696>

Ravichandra, A., & Schwabe, R. F. (2021). Mouse Models of Liver Fibrosis. *Methods Mol Biol*, 2299, 339-356. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1382-5_23

Reddy, Y. K., Marella, H. K., Jiang, Y., Ganguli, S., Snell, P., Podila, P. S. B., . . . Satapathy, S. K. (2020). Natural History of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Study With Paired Liver Biopsies. *J Clin Exp Hepatol*, 10(3), 245-254. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2019.07.002>

Reid, A. B., Kurten, R. C., McCullough, S. S., Brock, R. W., & Hinson, J. A. (2005). Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 312(2), 509-516. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.075945>

Ren, J., Smid, M., Iaria, J., Salvatori, D. C. F., van Dam, H., Zhu, H. J., . . . Ten Dijke, P. (2019). Cancer-associated fibroblast-derived Gremlin 1 promotes breast cancer progression. *Breast Cancer Res*, 21(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1194-0>

Rengachary, S. S. (2002). Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus*, 13(6), e2. <https://doi.org/10.3171/foc.2002.13.6.3>

Renner, E. L. (2007). How to decide when to list a patient with acute liver failure for liver transplantation? Clichy or King's College criteria, or something else? *J Hepatol*, 46(4), 554-557. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.01.009>

Rey, E., Meléndez-Rodríguez, F., Marañón, P., Gil-Valle, M., Carrasco, A. G., Torres-Capelli, M., . . . González-Rodríguez, Á. (2020). Hypoxia-inducible factor 2 α drives hepatosteatosis

through the fatty acid translocase CD36. *Liver Int*, 40(10), 2553-2567. <https://doi.org/10.1111/liv.14519>

Ribeiro, S. M. T. L., Lopes, L. R., Paula Costa, G., Figueiredo, V. P., Shrestha, D., Batista, A. P., . . . Talvani, A. (2017). CXCL-16, IL-17, and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) are associated with overweight and obesity conditions in middle-aged and elderly women. *Immun Ageing*, 14, 6. <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0089-0>

Rinella, M. E., & Sanyal, A. J. (2016). Management of NAFLD: a stage-based approach. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 13(4), 196-205. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.3>

Roehlen, N., Crouchet, E., & Baumert, T. F. (2020). Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9040875>

Roldan-Valadez, E., Favila, R., Martínez-López, M., Uribe, M., & Méndez-Sánchez, N. (2008). Imaging techniques for assessing hepatic fat content in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*, 7(3), 212-220.

Rosendahl, A., Pardali, E., Speletas, M., Ten Dijke, P., Heldin, C. H., & Sideras, P. (2002). Activation of bone morphogenetic protein/Smad signaling in bronchial epithelial cells during airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 27(2), 160-169. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.27.2.4779>

Rumack, B. H., & Matthew, H. (1975). Acetaminophen poisoning and toxicity. *Pediatrics*, 55(6), 871-876.

Rushworth, G. F., & Megson, I. L. (2014). Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther*, 141(2), 150-159. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.09.006>

Saab, S., Wang, V., Ibrahim, A. B., Durazo, F., Han, S., Farmer, D. G., . . . Busuttil, R. W. (2003). MELD score predicts 1-year patient survival post-orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl*, 9(5), 473-476. <https://doi.org/10.1053/jlts.2003.50090>

Safadi, R., & Friedman, S. L. (2002). Hepatic fibrosis--role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed*, 4(3), 27.

Bibliografía

Saito, C., Lemasters, J. J., & Jaeschke, H. (2010). c-Jun N-terminal kinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 246(1-2), 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.04.015>

Saito, C., Zwingmann, C., & Jaeschke, H. (2010). Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology*, 51(1), 246-254. <https://doi.org/10.1002/hep.23267>

Salazar, V. S., Gamer, L. W., & Rosen, V. (2016). BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol*, 12(4), 203-221. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.12>

Sanchez-Duffhues, G., Williams, E., Goumans, M. J., Heldin, C. H., & Ten Dijke, P. (2020). Bone morphogenetic protein receptors: Structure, function and targeting by selective small molecule kinase inhibitors. *Bone*, 138, 115472. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115472>

Sanz-Garcia, C., Ferrer-Mayorga, G., González-Rodríguez, Á., Valverde, A. M., Martín-Duce, A., Velasco-Martín, J. P., . . . Alemany, S. (2013). Sterile inflammation in acetaminophen-induced liver injury is mediated by Cot/tpl2. *J Biol Chem*, 288(21), 15342-15351. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.439547>

Saremba, S., Nickel, J., Seher, A., Kotsch, A., Sebald, W., & Mueller, T. D. (2008). Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand. *FEBS J*, 275(1), 172-183. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06187.x>

Sasso, M., Beaugrand, M., de Ledinghen, V., Douvin, C., Marcellin, P., Poupon, R., . . . Miette, V. (2010). Controlled attenuation parameter (CAP): a novel VCTE™ guided ultrasonic attenuation measurement for the evaluation of hepatic steatosis: preliminary study and validation in a cohort of patients with chronic liver disease from various causes. *Ultrasound Med Biol*, 36(11), 1825-1835. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2010.07.005>

Schon, H. T., & Weiskirchen, R. (2014). Immunomodulatory effects of transforming growth factor- β in the liver. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 3(6), 386-406. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.06>

Shen, H., Huang, G. J., & Gong, Y. W. (2003). Effect of transforming growth factor beta and bone morphogenetic proteins on rat hepatic stellate cell proliferation and trans-differentiation. *World J Gastroenterol*, *9*(4), 784-787. <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i4.784>

Silvestri, L., Nai, A., Dulja, A., & Pagani, A. (2019). Hepcidin and the BMP-SMAD pathway: An unexpected liaison. *Vitam Horm*, *110*, 71-99. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.01.004>

Simonse, E., Valk-Swinkels, C. G., van 't Veer, N. E., Ermens, A. A., & Veldkamp, E. J. (2013). Iron autointoxication in a 16-year-old girl: a protective role for hepcidin? *Ann Clin Biochem*, *50*(Pt 1), 76-79. <https://doi.org/10.1258/acb.2012.012038>

Simpson, K. J., Bates, C. M., Henderson, N. C., Wigmore, S. J., Garden, O. J., Lee, A., . . . Hayes, P. C. (2009). The utilization of liver transplantation in the management of acute liver failure: comparison between acetaminophen and non-acetaminophen etiologies. *Liver Transpl*, *15*(6), 600-609. <https://doi.org/10.1002/lt.21681>

Singh, A., & Morris, R. J. (2010). The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, *21*(4), 299-313. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.06.003>

Smilkstein, M. J., Knapp, G. L., Kulig, K. W., & Rumack, B. H. (1988). Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multicenter study (1976 to 1985). *N Engl J Med*, *319*(24), 1557-1562. <https://doi.org/10.1056/NEJM198812153192401>

Smith, A., Baumgartner, K., & Bositis, C. (2019). Cirrhosis: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician*, *100*(12), 759-770.

Smith, H. S. (2009). Potential analgesic mechanisms of acetaminophen. *Pain Physician*, *12*(1), 269-280.

Smith, R. L., Soeters, M. R., Wüst, R. C. I., & Houtkooper, R. H. (2018). Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. *Endocr Rev*, *39*(4), 489-517. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00211>

Son, J. W., Jang, E. H., Kim, M. K., Baek, K. H., Song, K. H., Yoon, K. H., . . . Kwon, H. S. (2011). Serum BMP-4 levels in relation to arterial stiffness and carotid atherosclerosis in patients with Type 2 diabetes. *Biomark Med*, *5*(6), 827-835. <https://doi.org/10.2217/bmm.11.81>

Bibliografía

Spivak, I., Arora, J., Meinzer, C., Durkalski-Mauldin, V., Lee, W. M., Trautwein, C., . . . (ALFSG), A. L. F. S. G. (2019). Low Serum Hepcidin Is Associated With Reduced Short-Term Survival in Adults With Acute Liver Failure. *Hepatology*, *69*(5), 2136-2149. <https://doi.org/10.1002/hep.30486>

StatPearls. (2022). In. <https://doi.org/NBK537183>

Stavropoulos, A., Divolis, G., Manioudaki, M., Gavriil, A., Kloukina, I., Perrea, D. N., . . . Sideras, P. (2022). Coordinated activation of TGF- β and BMP pathways promotes autophagy and limits liver injury after acetaminophen intoxication. *Sci Signal*, *15*(740), eabn4395. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abn4395>

Sterling, R. K., Lissen, E., Clumeck, N., Sola, R., Correa, M. C., Montaner, J., . . . Investigators, A. C. (2006). Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*, *43*(6), 1317-1325. <https://doi.org/10.1002/hep.21178>

Tacke, F., Gäbele, E., Bataille, F., Schwabe, R. F., Hellerbrand, C., Klebl, F., . . . Schnabl, B. (2007). Bone morphogenetic protein 7 is elevated in patients with chronic liver disease and exerts fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. *Dig Dis Sci*, *52*(12), 3404-3415. <https://doi.org/10.1007/s10620-007-9758-8>

Thayer, T. E., Lino Cardenas, C. L., Martyn, T., Nicholson, C. J., Traeger, L., Wunderer, F., . . . Malhotra, R. (2020). The Role of Bone Morphogenetic Protein Signaling in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep*, *10*(1), 9831. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66770-8>

Todd, G. M., Gao, Z., Hyvönen, M., Brazil, D. P., & Ten Dijke, P. (2020). Secreted BMP antagonists and their role in cancer and bone metastases. *Bone*, *137*, 115455. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115455>

Traeger, L., Gallitz, I., Sekhri, R., Bäumer, N., Kuhlmann, T., Kemming, C., . . . Steinbicker, A. U. (2018). ALK3 undergoes ligand-independent homodimerization and BMP-induced heterodimerization with ALK2. *Free Radic Biol Med*, *129*, 127-137. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.021>

Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Curr Biol*, 27(21), R1147-R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>

Tsugawa, D., Oya, Y., Masuzaki, R., Ray, K., Engers, D. W., Dib, M., . . . Karp, S. J. (2014). Specific activin receptor-like kinase 3 inhibitors enhance liver regeneration. *J Pharmacol Exp Ther*, 351(3), 549-558. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.216903>

Umbaugh, D. S., & Jaeschke, H. (2021). Biomarkers of drug-induced liver injury: a mechanistic perspective through acetaminophen hepatotoxicity. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 15(4), 363-375. <https://doi.org/10.1080/17474124.2021.1857238>

Underhill, T. J., Greene, M. K., & Dove, A. F. (1990). A comparison of the efficacy of gastric lavage, ipecacuanha and activated charcoal in the emergency management of paracetamol overdose. *Arch Emerg Med*, 7(3), 148-154. <https://doi.org/10.1136/emj.7.3.148>

Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150(3698), 893-899. <https://doi.org/10.1126/science.150.3698.893>

Vacca, M., Leslie, J., Virtue, S., Lam, B. Y. H., Govaere, O., Tiniakos, D., . . . Vidal-Puig, A. (2020). Bone morphogenetic protein 8B promotes the progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Nat Metab*, 2(6), 514-531. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0214-9>

van Swelm, R. P., Laarakkers, C. M., Blous, L., Peters, J. G., Blaney Davidson, E. N., van der Kraan, P. M., . . . Russel, F. G. (2012). Acute acetaminophen intoxication leads to hepatic iron loading by decreased hepcidin synthesis. *Toxicol Sci*, 129(1), 225-233. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs176>

Venkatesh, S. K., & Torbenson, M. S. (2022). Liver fibrosis quantification. *Abdom Radiol (NY)*, 47(3), 1032-1052. <https://doi.org/10.1007/s00261-021-03396-y>

Vernon, G., Baranova, A., & Younossi, Z. M. (2011). Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*, 34(3), 274-285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x>

Bibliografía

Villar-Lorenzo, A., Rada, P., Rey, E., Marañón, P., Arroba, A. I., Santamaría, B., . . . González-Rodríguez, Á. (2019). Insulin receptor substrate 2 (IRS2) deficiency delays liver fibrosis associated with cholestatic injury. *Dis Model Mech*, 12(7). <https://doi.org/10.1242/dmm.038810>

Vliegenthart, A. D., Antoine, D. J., & Dear, J. W. (2015). Target biomarker profile for the clinical management of paracetamol overdose. *Br J Clin Pharmacol*, 80(3), 351-362. <https://doi.org/10.1111/bcp.12699>

Voumvourakis, K. I., Antonelou, R. C. h., Kitsos, D. K., Stamboulis, E., & Tsiodras, S. (2011). TGF- β /BMPs: crucial crossroad in neural autoimmune disorders. *Neurochem Int*, 59(5), 542-550. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.06.004>

Wang, L., Ding, Q., Zhao, L., Pan, Y., Song, Z., Qin, Y., & Yan, X. (2018). Decreased BMP-7 and p-Smad1/5/8 expression, and increased levels of gremlin in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*, 16(2), 2113-2118. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8918>

Wang, L. P., Dong, J. Z., Xiong, L. J., Shi, K. Q., Zou, Z. L., Zhang, S. N., . . . Chen, Y. P. (2014). BMP-7 attenuates liver fibrosis via regulation of epidermal growth factor receptor. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(7), 3537-3547.

Wang, Y., Ma, C., Sun, T., & Ren, L. (2020). Potential roles of bone morphogenetic protein-9 in glucose and lipid homeostasis. *J Physiol Biochem*, 76(4), 503-512. <https://doi.org/10.1007/s13105-020-00763-z>

Wendon, J., Cordoba, J., Dhawan, A., Larsen, F. S., Manns, M., Samuel, D., . . . representative, E. G. B. (2017). EASL Clinical Practical Guidelines on the management of acute (fulminant) liver failure. *J Hepatol*, 66(5), 1047-1081. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.12.003>

Whitehouse, T., & Wendon, J. (2013). Acute liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 27(5), 757-769. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.08.010>

Whittle, A. J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vázquez, M. J., . . . Vidal-Puig, A. (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*, 149(4), 871-885. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.066>

Wozney, J. M. (1998). The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci*, *106 Suppl 1*, 160-166. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1998.tb02170.x>

Wu, F. J., Lin, T. Y., Sung, L. Y., Chang, W. F., Wu, P. C., & Luo, C. W. (2017). BMP8A sustains spermatogenesis by activating both SMAD1/5/8 and SMAD2/3 in spermatogonia. *Sci Signal*, *10(477)*. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aal1910>

Xiao, Y. T., Xiang, L. X., & Shao, J. Z. (2007). Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun*, *362(3)*, 550-553. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.045>

Xu, X., Li, X., Yang, G., Li, L., Hu, W., Zhang, L., . . . Zhu, D. (2017). Circulating bone morphogenetic protein-9 in relation to metabolic syndrome and insulin resistance. *Sci Rep*, *7(1)*, 17529. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17807-y>

Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., . . . Matsumoto, K. (1999). XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J*, *18(1)*, 179-187. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.179>

Yan, M., Huo, Y., Yin, S., & Hu, H. (2018). Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. *Redox Biol*, *17*, 274-283. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.04.019>

Yang, A., & Mottillo, E. P. (2020). Adipocyte lipolysis: from molecular mechanisms of regulation to disease and therapeutics. *Biochem J*, *477(5)*, 985-1008. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190468>

Yang, M., Liang, Z., Jia, Y., Yang, G., He, Y., Li, X., . . . Li, L. (2019). Role of bone morphogenetic protein-9 in the regulation of glucose and lipid metabolism. *FASEB J*, *33(9)*, 10077-10088. <https://doi.org/10.1096/fj.201802544RR>

Yang, P., Troncone, L., Augur, Z. M., Kim, S. S. J., McNeil, M. E., & Yu, P. B. (2020). The role of bone morphogenetic protein signaling in vascular calcification. *Bone*, *141*, 115542. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115542>

Bibliografía

Yang, T., Chen, S. L., Lu, X. J., Shen, C. Y., Liu, Y., & Chen, Y. P. (2012). Bone morphogenetic protein 7 suppresses the progression of hepatic fibrosis and regulates the expression of gremlin and transforming growth factor β 1. *Mol Med Rep*, 6(1), 246-252. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.892>

Ye, H., Chen, C., Wu, H., Zheng, K., Martín-Adrados, B., Caparros, E., . . . Cubero, F. J. (2022). Genetic and pharmacological inhibition of XBP1 protects against APAP hepatotoxicity through the activation of autophagy. *Cell Death Dis*, 13(2), 143. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04580-8>

Younossi, Z., Anstee, Q. M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., . . . Bugianesi, E. (2018). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 15(1), 11-20. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109>

Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73-84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>

Younossi, Z. M., Stepanova, M., Younossi, Y., Golabi, P., Mishra, A., Rafiq, N., & Henry, L. (2020). Epidemiology of chronic liver diseases in the USA in the past three decades. *Gut*, 69(3), 564-568. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318813>

Zhang, C. Y., Yuan, W. G., He, P., Lei, J. H., & Wang, C. X. (2016). Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World J Gastroenterol*, 22(48), 10512-10522. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i48.10512>

Zhang, J., Zhao, Y., Xu, C., Hong, Y., Lu, H., Wu, J., & Chen, Y. (2014). Association between serum free fatty acid levels and nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. *Sci Rep*, 4, 5832. <https://doi.org/10.1038/srep05832>

Zhang, L., Xu, L. M., Chen, Y. W., Ni, Q. W., Zhou, M., Qu, C. Y., & Zhang, Y. (2012). Antifibrotic effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on bile duct ligation induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol*, 18(37), 5283-5288. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i37.5283>

Zhang, M., Sara, J. D., Wang, F. L., Liu, L. P., Su, L. X., Zhe, J., . . . Liu, J. H. (2015). Increased plasma BMP-2 levels are associated with atherosclerosis burden and coronary calcification in type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol*, 14, 64. <https://doi.org/10.1186/s12933-015-0214-3>

Zheng, Y., Lei, L., Liang, S., Ai, J., Deng, X., Li, Y. Q., . . . Ren, Y. S. (2022). Protective Effect of Fresh/Dry Dandelion Extracts on APAP-Overdose-Induced Acute Liver Injury. *Chin J Integr Med*, 28(8), 683-692. <https://doi.org/10.1007/s11655-021-3295-8>

Zhong, L., Wang, X., Wang, S., Yang, L., Gao, H., & Yang, C. (2013). The anti-fibrotic effect of bone morphogenetic protein-7(BMP-7) on liver fibrosis. *Int J Med Sci*, 10(4), 441-450. <https://doi.org/10.7150/ijms.5765>

Zoheiry, M. M., Hasan, S. A., El-Ahwany, E., Nagy, F. M., Taleb, H. A., Nousseir, M., . . . Raafat, I. (2015). Serum Markers of Epithelial Mesenchymal Transition as Predictors of HCV-induced Liver Fibrosis, Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Electron Physician*, 7(8), 1626-1637. <https://doi.org/10.19082/1626>

Zou, G. L., Zuo, S., Lu, S., Hu, R. H., Lu, Y. Y., Yang, J., . . . Li, H. Y. (2019). Bone morphogenetic protein-7 represses hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *World J Gastroenterol*, 25(30), 4222-4234. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i30.4222>

Zou, M. L., Chen, Z. H., Teng, Y. Y., Liu, S. Y., Jia, Y., Zhang, K. W., . . . Yuan, F. L. (2021). The Smad Dependent TGF- β and BMP Signaling Pathway in Bone Remodeling and Therapies. *Front Mol Biosci*, 8, 593310. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.593310>

Zuckerbraun, B. S., & Billiar, T. R. (2003). Heme oxygenase-1: a cellular Hercules. *Hepatology*, 37(4), 742-744. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50139>

Las ilustraciones de esta Tesis Doctoral se han realizado utilizando imágenes de “Servier Medical ART: SMART”, “Canva” y “Freepik”.

ANEXO I

Parte de los resultados recogidos en esta Tesis, se hayan descritos en los siguientes artículos:

- **Marañón, P.**, Fernández-García, C. E., Isaza, S. C., Rey, E., Gallego-Durán, R., Montero-Vallejo, R., de Cía, J. R., Ampuero, J., Romero-Gómez, M., García-Monzón, C., & González-Rodríguez, Á. (2022). Bone morphogenetic protein 2 is a new molecular target linked to non-alcoholic fatty liver disease with potential value as non-invasive screening tool. *Biomarker research*, 10(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00383-3>
- **Marañón, P.***, Isaza, S. C.*, Fernández-García, C. E., Rey, E., Gallego-Durán, R., Montero-Vallejo, R., de Cía, J. R., Ampuero, J., Valverde, A. M., Romero-Gómez, M., García-Monzón, C., González-Rodríguez, Á. Circulating bone morphogenetic protein 8A is a novel biomarker to predict advanced liver fibrosis. *Autores con igual contribución. (*En revisión en Biomarker research*).
- **Marañón, P.**, Wu, H., Choya-Foces, C., Martínez-Ruiz, A., García-Monzón, C., Cubero, F.J., González-Rodríguez, Á. Inhibition of ALK3-mediated signalling pathway protects against acetaminophen-induced liver injury. (*En revisión en International Journal of Biological Science*).

Asimismo, los resultados recogidos en esta Tesis han dado como resultado la generación de la siguiente patente:

- “Método de detección temprano de daño hepático mediante la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) en biopsia líquida” **Patricia Marañón**; Paloma Narros; Esther Rey; Carmelo García Monzón; Javier Egea; Águeda González Rodríguez. P202130777. España. 10/08/2021. Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario de La Princesa.

Además, durante el periodo de formación la doctoranda ha participado en el desarrollo de los siguientes trabajos:

- da Silva Lima, N., Fondevila, M. F., Nóvoa, E., Buqué, X., Mercado-Gómez, M., Gallet, S., González-Rellan, M. J., Fernandez, U., Loyens, A., Garcia-Vence, M., Chantada-Vazquez, M. D. P., Bravo, S. B., **Marañón, P.**, Senra, A., Escudero, A., Leiva, M., Guallar, D., Fidalgo, M., Gomes, P., Claret, M., ... Nogueiras, R. (2022). Inhibition of ATG3 ameliorates liver steatosis by increasing mitochondrial function. *Journal of hepatology*, 76(1), 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.09.008>

- Rey, E.*, Ampuero, J.*, Molina-Jiménez, F.*, **Marañón, P.**, García-García, Y., Muñoz-Hernández, R., Romero-Gómez, M., García-Monzón, C., Majano, P., & González-Rodríguez, Á. (2021). Sofosbuvir improves HCV-induced insulin resistance by blocking IRS1 degradation. *Clinical and translational medicine*, 11(1), e275. *Autores con igual contribución. <https://doi.org/10.1002/ctm2.275>
- Rey, E.*, Del Pozo-Maroto, E.*, **Marañón, P.***, Beeler, B., García-García, Y., Landete, P., Isaza, S. C., Farré, R., García-Monzón, C., Almendros, I., & González-Rodríguez, Á. (2020). Intrahepatic Expression of Fatty Acid Translocase CD36 Is Increased in Obstructive Sleep Apnea. *Frontiers in medicine*, 7, 450. *Autores con igual contribución. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00450>
- Rey, E.*, Meléndez-Rodríguez, F.*, **Marañón, P.**, Gil-Valle, M., Carrasco, A. G., Torres-Capelli, M., Chávez, S., Del Pozo-Maroto, E., Rodríguez de Cía, J., Aragonés, J., García-Monzón, C., & González-Rodríguez, Á. (2020). Hypoxia-inducible factor 2 α drives hepatosteatosis through the fatty acid translocase CD36. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 40(10), 2553–2567. *Autores con igual contribución. <https://doi.org/10.1111/liv.14519>
- Villar-Lorenzo, A., Rada, P.*, Rey, E.*, **Marañón, P.**, Arroba, A. I.[§], Santamaría, B.[§], Sáiz, J., Rupérez, F. J., Barbas, C., García-Monzón, C., Valverde, Á. M., & González-Rodríguez, Á. (2019). Insulin receptor substrate 2 (IRS2) deficiency delays liver fibrosis associated with cholestatic injury. *Disease models & mechanisms*, 12(7), dmm038810. *[§]Autores con igual contribución. <https://doi.org/10.1242/dmm.038810>
- García-Monzón, C., Petrov, P. D., Rey, E., **Marañón, P.**, Del Pozo-Maroto, E., Guzmán, C., Rodríguez de Cía, J., Casado-Collado, A. J., Vargas-Castrillón, J., Saez, A., Miquilena-Colina, M. E., Lo Iacono, O., Castell, J. V., González-Rodríguez, Á., & Jover, R. (2018). Angiopoietin-Like Protein 8 Is a Novel Vitamin D Receptor Target Gene Involved in Nonalcoholic Fatty Liver Pathogenesis. *The American journal of pathology*, 188(12), 2800–2810. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.07.028>


ANEXO II

RESEARCH

Open Access



Bone morphogenetic protein 2 is a new molecular target linked to non-alcoholic fatty liver disease with potential value as non-invasive screening tool

Patricia Marañón¹, Carlos Ernesto Fernández-García^{1†}, Stephania C. Isaza^{1†}, Esther Rey^{1†}, Rocío Gallego-Durán^{2,3}, Rocío Montero-Vallejo^{2,3}, Javier Rodríguez de Cía¹, Javier Ampuero^{2,3}, Manuel Romero-Gómez^{2,3}, Carmelo García-Monzón^{1,3} and Águeda González-Rodríguez^{1,4,5*} 

Abstract

Background: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the commonest cause of chronic liver disease worldwide, being non-alcoholic steatohepatitis (NASH) its most clinically relevant form. Given the risks associated with taking a liver biopsy, the design of accurate non-invasive methods to identify NASH patients is of utmost importance. BMP2 plays a key role in metabolic homeostasis; however, little is known about its involvement in NAFLD onset and progression. This study aimed to elucidate the impact of BMP2 in NAFLD pathophysiology.

Methods: Hepatic and circulating levels of BMP2 were quantified in serum and liver specimens from 115 biopsy-proven NAFLD patients and 75 subjects with histologically normal liver (NL). In addition, BMP2 content and release was determined in cultured human hepatocytes upon palmitic acid (PA) overload.

Results: We found that BMP2 expression was abnormally increased in livers from NAFLD patients than in subjects with NL and this was reflected in higher serum BMP2 levels. Notably, we observed that PA upregulated BMP2 expression and secretion by human hepatocytes. An algorithm based on serum BMP2 levels and clinically relevant variables to NAFLD showed an AUROC of 0.886 (95%CI, 0.83–0.94) to discriminate NASH. We used this algorithm to develop SAN (Screening Algorithm for NASH): a SAN < 0.2 implied a low risk and a SAN ≥ 0.6 indicated high risk of NASH diagnosis.

Conclusion: This proof-of-concept study shows BMP2 as a new molecular target linked to NAFLD and introduces SAN as a simple and efficient algorithm to screen individuals at risk for NASH.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease, Bone morphogenetic proteins, BMP2, Non-invasive diagnosis, Hepatocytes

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), is becoming the most prevalent chronic liver disease worldwide and is considered the hepatic manifestation of the metabolic syndrome; consequently, it is highly linked with the most relevant features of this syndrome, as obesity, hypertension, dyslipidemia, central adiposity and insulin

[†]Carlos Ernesto Fernández-García, Stephania C. Isaza and Esther Rey contributed equally to this work.

*Correspondence: aguedagr.phd@gmail.com

⁵ Present address: Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (Centro Mixto CSIC-UAM), 28029 Madrid, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

resistance or type 2 diabetes (T2D) [1, 2]. Indeed, the prevalence of NAFLD in obese and diabetic patients can be over 50%, whereas, the global prevalence of NAFLD is around 25% in adults, being higher in Western countries [3, 4].

NAFLD encompasses a range of liver diseases from simple fatty liver (NAFL), mostly a benign non-progressive clinical entity defined as the presence of fat in >5% of hepatocytes, to steatohepatitis (NASH), a more severe condition featured by steatosis, lobular and portal inflammation, and degeneration (ballooning) of hepatocytes, with or without fibrosis, which in turn can lead to more severe conditions of liver disease such as cirrhosis, portal hypertension and even hepatocellular carcinoma (HCC) [5, 6]. In this regard, while most of NAFLD patients are usually asymptomatic and only present a simple accumulation of fat in the hepatocyte (NAFL), a 44–59% of patients end up developing NASH with variable fibrosis stages. Up to 25% of patients with NAFLD progress to cirrhosis and approximately 7% to end-stage liver disease, needing for liver transplantation [3].

The prompt diagnosis and treatment of the early stages of NAFLD are important to prevent the progression to advanced stages of the liver disease. The determination of the lipid content of the liver can be an important challenge in terms of identification, treatment and control of the progression of the disease [7]. Nowadays, there are no validated non-invasive diagnostic methods for quantifying NAFLD histological evolution, and liver biopsy is still the gold standard to differentiate fatty liver from NASH and/or fibrosis stages [1]. However, liver biopsy is not recommended for routine use due to increased risk of bleeding and complications, and intra and inter-observer variations. In the last years, many diagnostic non-invasive tools (mainly serological tests and imaging techniques) have been described, but they are not ready yet for widespread use, or to replace histological examination [8, 9].

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are secreted glycoproteins belonging to the transforming growth factor β (TGF β) superfamily. More than 20 BMPs have been described and originally identified as growth factors involved in the differentiation of osteogenic cells; however, it has been demonstrated that these proteins also play a critical role in the development of many cells types in various tissues, acting in cell proliferation and differentiation, tooth morphogenesis, organogenesis, embryonic development, apoptosis, chemotaxis and tissue regeneration [10, 11].

Regarding BMPs and liver physiology, these proteins are known to have a crucial role in different stages of hepatic development and also are implicated in adult liver homeostasis, as iron and glucose homeostasis [12].

In this regard, while it has been demonstrated the pathophysiological role of some BMPs, such as BMP3B, BMP4, BMP6, BMP8B and BMP9, in animal models of NASH and NASH patients [13–17], little is known about the involvement of BMP2 in experimental models of NAFLD [18], and no data exist so far directly linking BMP2 to human NAFLD. Therefore, we sought to explore whether BMP2 could be related to NAFLD by assessing the expression of BMP2 in liver and serum from patients with biopsy-proven NAFLD as well as in an *in vitro* model of hepatic steatosis.

Methods

Study population

This study comprises 115 patients with biopsy-proven NAFLD, 56 with simple steatosis (NAFL) and 59 with steatohepatitis (NASH), to whom a liver biopsy were performed for diagnosis purposes or had histological features of NAFLD in a liver biopsy carried out during programmed laparoscopic cholecystectomy, and 75 patients with histologically normal liver (NL) to whom a liver biopsy was performed during laparoscopic cholecystectomy. All patients were recruited from Hospital Universitario Santa Cristina (Madrid, Spain) and Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, Spain). Inclusion criteria were: age between 18 and 75 years old, alcohol consumption lower than 20g/day, no history of potentially hepatotoxic drugs and no analytical evidence of iron overload, autoimmunity and hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus infection.

This study was performed in agreement with the Declaration of Helsinki, and with local and national laws. The Human Ethics Committee of the Hospital Universitario Santa Cristina (reference, PI-688A) and Hospital Universitario Virgen del Rocío (reference, C.I. 0359-N-15) approved the study procedures, and all participants signed an informed written consent before inclusion in the study.

Clinical, biochemical and metabolic assessment

A complete clinical examination was performed to all patients studied. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kilograms) divided by height (meters) squared. At the time of liver biopsy, blood samples of each participant were obtained to determine serum levels of liver enzymes, metabolic parameters and serologic tests using routine laboratory methods. Insulin resistance was calculated by the homeostasis model assessment (HOMA-IR) method [19].

Histopathological assessment

Hematoxylin-eosin and Masson's trichrome-stained paraffin-embedded liver biopsy sections showing more

than 10 complete portal tracts were examined and interpreted by experienced hepatopathologists of each clinical site using the same internationally accepted criteria. Briefly, steatosis was assessed as outlined by Brunt et al. [20] grading percentage involvement by steatotic hepatocytes as follows: grade 0, <5%; grade 1, 5–33%; grade 2, >33–66%; and grade 3, >66%. Simple steatosis or NAFL was defined as the presence of at least 5% of steatotic hepatocytes with or without mild lobular or portal inflammation but in the absence of features of hepatocellular injury (ballooning, apoptosis or necrosis) or fibrosis. On the other hand, minimal criteria for the histological diagnosis of NASH included the combined presence of grade 1 steatosis, hepatocellular injury and lobular inflammation with or without fibrosis. In addition, NAFLD activity score was also calculated to each liver biopsy according to Kleiner's criteria [21].

Cell culture and treatment

Human hepatoma cell line Huh7 (ATCC, Manassas, VA, USA) was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Cytiva, USA) containing high glucose, antibiotics and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C with 5% CO₂. For the steatogenic protocol, cells were treated overnight with 750 μM of palmitic acid (PA, Merk Millipore, Darmstadt, Germany), dissolved in isopropyl alcohol, in serum free DMEM with 1% BSA. In all experiments, control cells (C) were treated with the corresponding vehicle (isopropanol).

Gene expression analysis

Total RNA from liver samples was extracted using the NucleoSpin RNA purification kit (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Dueren, Germany) following manufacturer's instruction. For cell samples, plates were washed with phosphate buffered saline (PBS) and total RNA was extracted with TRIzol Reagent (Vitro, Sevilla, Spain). Reverse transcription was performed with ImProm-II™ Reverse transcription kit (Promega Inc., Madison, WI, USA) in a T100™ Thermal Cycler (BioRad Inc., Madrid, Spain). Quantitative Real time PCR (RTqPCR) was performed using Syber Green method and quantified with ΔΔCt method. All samples were run in duplicate and normalized by *36B4*.

Primer sequences used were: *BMP2*, 5' CAACACTGT CGCAGCTTC 3' (forward) and 5' GAAGAATCTCCG GGTGTTTTTC 3' (reverse); *CD36*, 5' ATGTGTGTG GAGAGCGTCAACC 3' (forward) and 5' TGAGCAGAG TCTTCAGAGACAGCC 3' (reverse); *36B4*, 5' CAGGCG TCCTCGTGGAAGTGAC 3' (forward) 5' CCAGGT CGCCCTGTCTTCCCT 3' (reverse).

ELISA assay

BMP2 concentration in serum samples from patients or supernatants from cell culture was measured using an ELISA kit (CSB-E04507h, Cusabio Technology LLC, Hubei, China) following manufacturer's instructions. Absorbance from samples was interpolated to a standard curve using a four parameter logistic (4-PL) equation.

Intracellular lipid content detection by oil red O staining

Cells were cultured in 12mm coverslips and treated as described above. Then, cells were washed with PBS and stained with an Oil red O (ORO, Merk Millipore, Darmstadt, Germany) working solution (60% ORO/isopropanol) and counter-stained with hematoxylin. Images were taken using an optical microscope Nikon Eclipse E400 (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a plan Apocromatic 20x objective (Nikon). Intensity of red stain was quantified using the FIJI software (NIH, Bethesda, MD).

Statistical analysis

Kolmogorov-Smirnoff test was applied to evaluate if the variables were adjusted or not to a normal distribution. Qualitative variables are presented as relative frequencies. Quantitative variables are expressed as measures of central tendency (mean) and dispersion (standard deviation -SD- for patients' data or standard error of mean -SEM- for experimental data). Data between groups were compared with Student's t test for variables following a normal distribution and Mann-Whitney U test for continuous variables following a non-parametric distribution. Binary and multinomial logistic regression analysis adjusted for confounders were used to test the independence of the associations of dependent variable (NASH) with its significant correlates in univariate models and with those considered of clinical interest. In addition, multivariate regression models were constructed and parameters selected by stepwise method based on likelihood ratio test. Box-Tidwell procedure was used for testing linearity of logit and to obtain a linear logit the appropriate transformation of variables was used. The goodness of fit of the model was evaluated using the Hosmer-Lemeshow statistic and Pearson's Chi-squared test as appropriated. In order to assess diagnostic accuracy of distinct regression models constructed, receiver operating characteristics (ROC) curves and area under the ROC curve (AUROC) were carried out. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and the IBM SPSS Statistics 24.0 (SPSS Inc., IBM, Armonk, NY) software with two-sided tests, with a *p* value of <0.05 considered as statistically significant.

Results

Characteristics of the study population

Characteristics of all patients included in this study based on the histological diagnosis are shown in Table 1. Briefly, women were predominant in all the histological groups studied and NAFLD patients were significantly older than NL subjects. As expected, BMI was significantly higher in NASH patients compared to both NL and NAFL groups, and variables regarding glucose metabolism (glucose, insulin, HOMA-IR) and liver enzymes (aspartate aminotransferase -AST-, alanine aminotransferase -ALT-, gamma-glutamyltransferase -GGT-) were significantly different between all groups.

Hepatic BMP2 expression is increased in patients with NAFLD

We found that BMP2 gene expression was significantly increased in the liver tissue of NAFLD patients with respect to NL subjects (2-fold, $p < 0.0002$; Fig. 1A).

Indeed, when compared with NL, hepatic mRNA levels of BMP2 were significantly higher in patients with NAFL (1.7-fold, $p = 0.0323$) and NASH (2.6-fold, $p < 0.0001$) (Fig. 1B), in parallel with the increase of the liver injury. It was noteworthy that hepatic BMP2 levels were significantly more elevated in NASH than in NAFL patients ($p = 0.0047$). Notably, a significant positive correlation in all study population was observed ($p < 0.0001$, Fig. 1C) between the hepatic mRNA levels of BMP2 and CD36, a fatty acid transporter which contributes to liver fat accumulation in patients with NAFLD [22].

Serum levels of BMP2 are elevated in NAFLD patients

Next, we measured the concentration of BMP2 in serum samples from all NAFLD patients and NL subjects included in our study. Mean circulating BMP2 levels were significantly higher in NAFLD patients than in NL subjects ($p = 0.0033$; Fig. 2A). Notably, serum BMP2 concentrations were more elevated in both NAFL and

Table 1 Characteristics of the study population

	NL (n = 75)	NAFL (n = 56)	NASH (n = 59)
Age (years)	46.58 ± 14.11	52.51 ± 14.15*	55.42 ± 11.1***
Gender (female/male, %)	13.33 / 86.67	33.9 / 66.1	44.07 / 55.93
BMI (kg/m ²)	27.57 ± 5.1	28.46 ± 3.96	34.14 ± 6.56*****
Glucose (mg/dL)	92.6 ± 19.46	99.23 ± 13.92***	119.35 ± 48.5***
Insulin (μU/L)	7.67 ± 4.44	10.06 ± 5.36**	21.38 ± 15.11*****
HOMA-IR	1.83 ± 1.31	2.52 ± 1.53***	6.19 ± 4.92*****
Triglycerides (mg/dL)	122.33 ± 66.78	135.52 ± 56.47*	176.22 ± 120.84*****
Total cholesterol (mg/dL)	191.17 ± 38.48	203.96 ± 39.13	192.44 ± 45.29
AST (IU/L)	17.96 ± 5.69	21.59 ± 8.65*	42.12 ± 25.95*****
ALT (IU/L)	18.52 ± 10.1	27.12 ± 17.27***	54.73 ± 33.02*****
GGT (IU/L)	32.36 ± 29.51	48.82 ± 52.26**	117.24 ± 194.33*****
Steatosis (%)			
Grade 0	100%		8.5%
Grade 1		73.21%	28.8%
Grade 2		17.86%	33.9%
Grade 3		8.93%	28.8%
Ballooning and lobular inflammation (%)			
Grade 0	100%	87.5%	1.85%
Grade 1		12.5%	37.04%
Grade 2			51.85%
Grade 3			9.26%
Fibrosis (%)			
Grade 0	100%	100%	13.56%
Grade 1			35.6%
Grade 2			18.64%
Grade 3			20.34%
Grade 4			11.86%

NL Normal liver, NAFL Nonalcoholic fatty liver, NASH Nonalcoholic steatohepatitis, BMI Body mass index, HOMA-IR Homeostatic model assessment-insulin resistance, AST Aspartate aminotransferase, ALT Alanine aminotransferase, GGT Gamma-glutamyltransferase

Data are shown as mean ± SD or as number of cases (%)

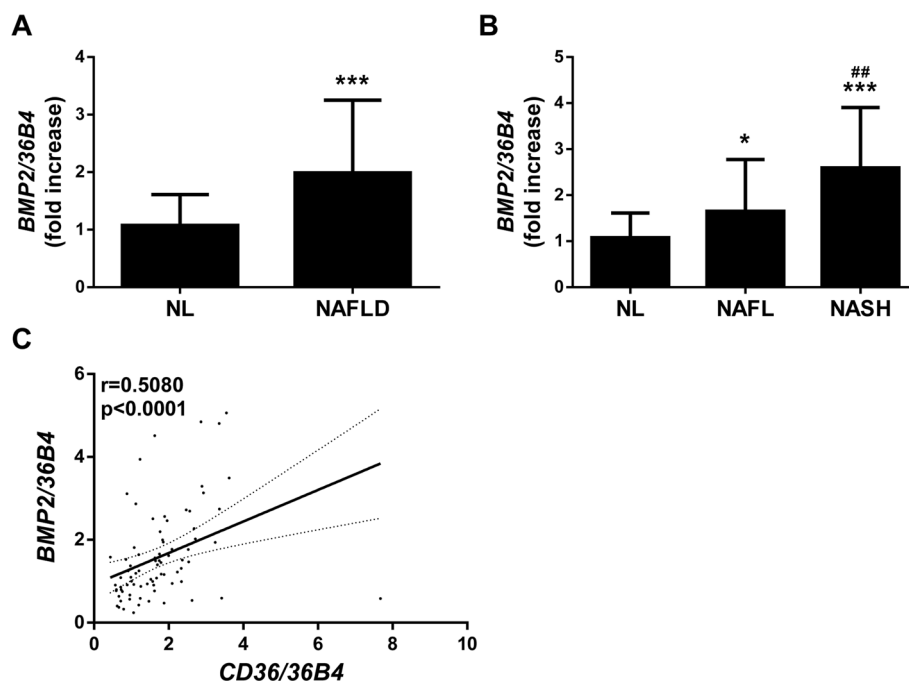


Fig. 1 Expression of BMP2 is increased within the liver of NAFLD patients. **A** and **B** Hepatic BMP2 mRNA levels determined by RT-qPCR and normalized to 36B4 gene expression. Data are expressed as fold increase relative to control condition [1] and presented as mean \pm SD. **C** Correlation in the study population of matched mRNA expression levels (BMP2 and CD36). Study population: Normal liver (NL) individuals ($n=75$), NAFLD patients ($n=115$: 56 NAFL and 59 NASH). * $p<0.05$ and *** $p<0.005$, NAFLD, NAFL or NASH vs. NL; ## $p<0.01$, NASH vs. NAFL

NASH patients compared to NL subjects ($p=0.0552$ and $p=0.0025$, respectively; Fig. 2B). Interestingly, no significant differences were found between patients with NAFL and NASH. In addition, a significant and progressive increase in serum BMP2 levels was found in NAFLD patients in relation to the histological grade of steatosis ($p=0.0032$, Fig. 2C) and NAFLD activity score ($p=0.0081$, Fig. 2D). However, circulating BMP2 levels did not correlate with either BMI ($p=0.9162$, Fig. 2E) or HOMA-IR ($p=0.4420$, Fig. 2F), indicating that serum BMP2 levels in patients with NAFLD are not influenced by adiposity or insulin resistant state.

BMP2 expression in human hepatocytes

In order to clarify which liver cells can be the cellular source of BMP2, we performed some in vitro experiments using human hepatocytes (Huh7 cells) treated with different doses of palmitic acid (PA) for 16 hours, a known protocol for inducing intracellular lipid accumulation [23]. After the exposure to PA, results obtained revealed an elevation of intracellular lipid content (Fig. 3A) in parallel to an increase of mRNA levels of BMP2 in Huh7 hepatocytes (Fig. 3B). Moreover, an increase of supernatant BMP2 concentration was also observed upon PA treatment (Fig. 3C).

Circulating BMP2 is an independent predictor of NASH and the algorithm SAN is able to discriminate NASH

Since serum BMP2 levels were significantly higher in NASH than in NL subjects, we performed logistic regression analysis in the entire study population in order to determine whether serum BMP2 levels are associated with NASH. In order to find the best sensitivity and specificity threshold for NASH diagnosis, the best cut-off value for serum BMP2 concentrations was established by using the Youden index at 49.21 pg/mL. Circulating BMP2 was identified as an independent predictor of NASH in univariate analysis (OR [95% CI], 3.5 [1.47–8.37], $p=0.005$; Table 2). Multivariate analysis, adjusted for potential confounders (age, gender and BMI) and variables clinically relevant to NAFLD (glucose and GGT) showed that serum BMP2 concentrations persisted significantly associated with NASH (OR [95% CI], 5.07 [1.55–16.6], $p=0.007$; Table 2).

Thus, we performed ROC curve analysis to determine the accuracy of the algorithm termed SAN (Screening Algorithm for NASH), based in a formula derived from the previously mentioned logistic regression model (Fig. 4), which revealed a good accuracy to discriminate NASH (AUROC, 0.886). Next, 0.1 unit intervals of SAN were analyzed to establish best cut off points (Table 3). A $\text{SAN} \leq 0.2$ can be used to exclude NASH (SN=0.84;

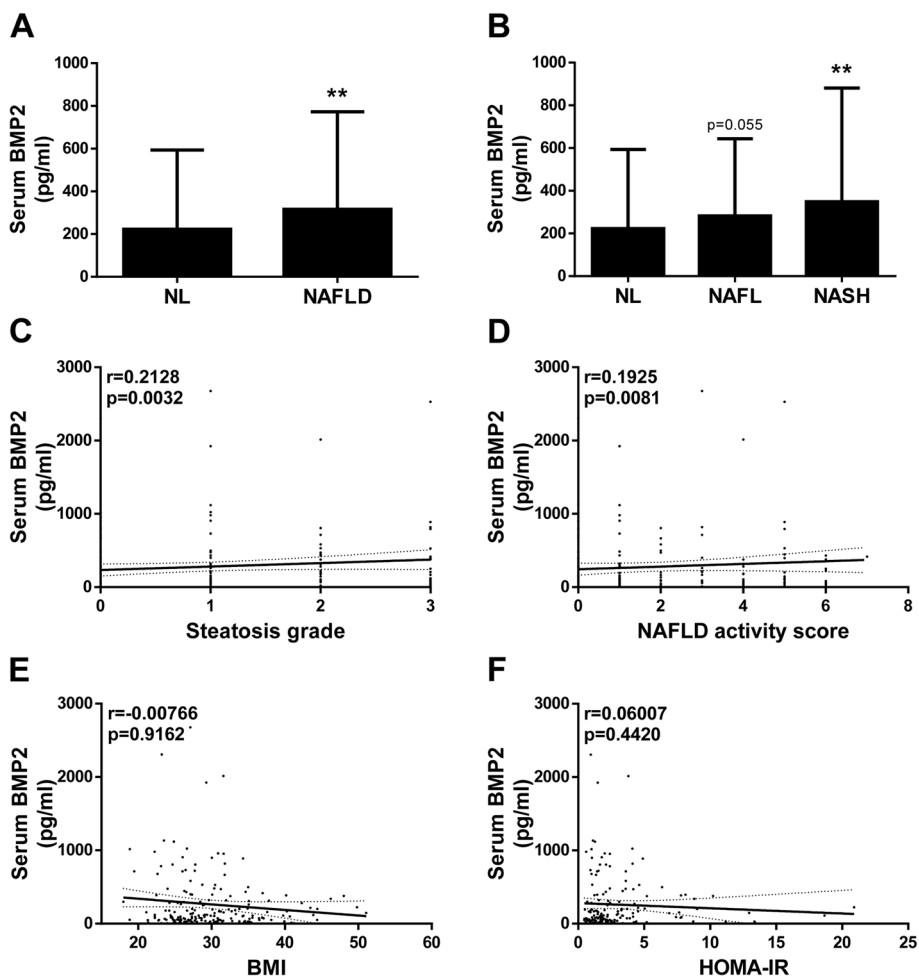


Fig. 2 Serum levels of BMP2 are increased in NAFLD patients. **A** and **B** Serum levels of BMP2 determined by ELISA. Data are expressed as mean \pm SD. **C** Correlation in the study population of matched serum BMP2 levels with the steatosis grade. **D** Correlation in the study population of matched serum BMP2 levels with the NAFLD activity score. **E** Correlation in the study population of matched serum BMP2 levels with the BMI. **F** Correlation in the study population of matched serum BMP2 levels with the HOMA-IR. Study population: Normal liver (NL) individuals ($n = 75$), NAFLD patients ($n = 115$: 56 NAFL and 59 NASH). ** $p < 0.01$, NAFLD, or NASH vs. NL

NPV = 0.909) and a $SAN \geq 0.6$ to rule it in (SP = 0.96; PPV = 0.86).

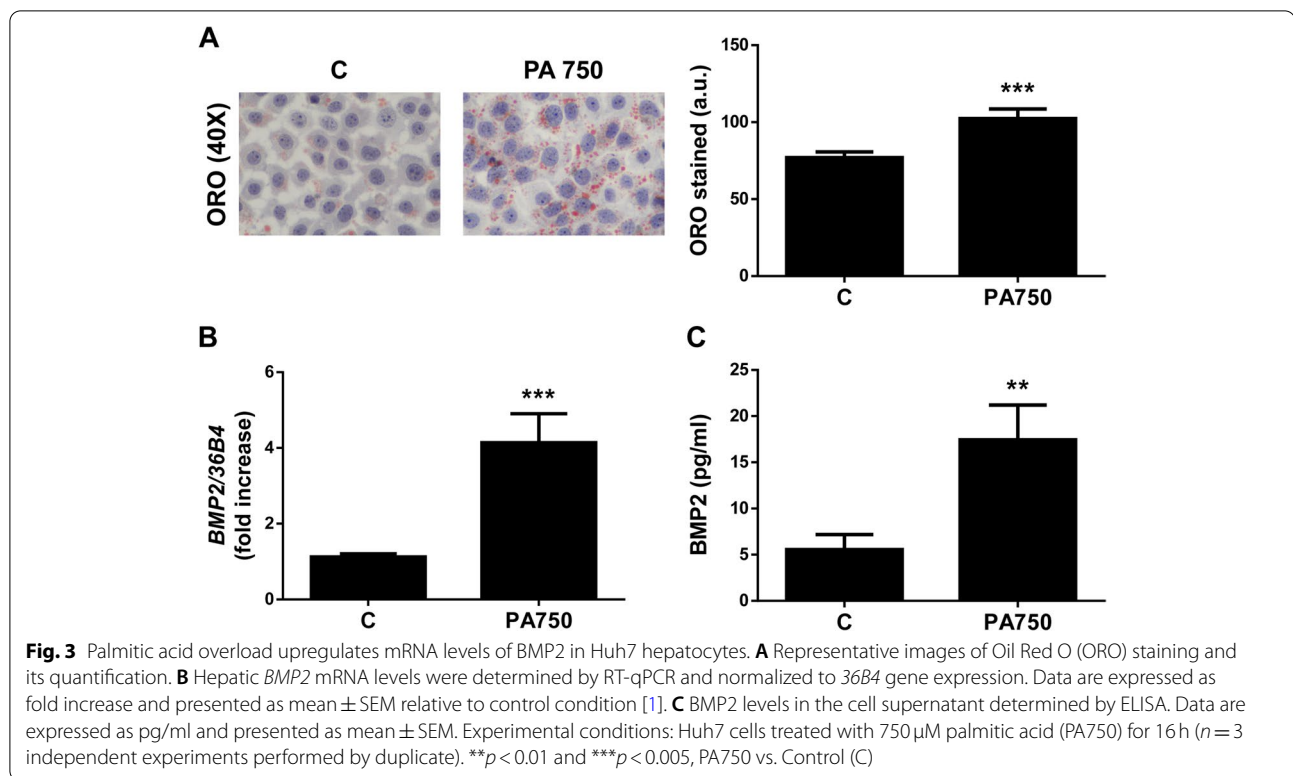
Discussion

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), is the major cause of chronic liver disease worldwide, with a diverse histopathological spectrum ranging from simple steatosis without significant inflammation, also termed fatty liver (NAFL), to steatohepatitis (NASH) with varying stages of fibrosis and, ultimately, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [24].

Given that NAFLD is usually asymptomatic at the time of diagnosis, the determination of the lipid content within the liver is an important clinical challenge in terms of early identification to allow appropriate therapeutic

interventions in order to prevent the progression of liver disease to more advanced fibrotic states or, even, to the end-stage liver disease. In the last decade, there has been an explosion in the discovery of biomarkers for NAFLD diagnosis and/or prognosis. Considering the wide range of their potential applications in clinical practice, the growing interest of the academic and industrial community in biomarkers is not surprising. Indeed, lack of awareness about risk factors for NAFLD and its progression, combined with insufficient or unreliable screening and surveillance modalities, may contribute to a delay in diagnosis and may explain why many patients are diagnosed in the later stages of the disease [7].

A novel finding of the present study is that BMP2 expression is increased in the liver from NAFLD

**Table 2** Univariate and multivariate analysis of the independent variables associated with NASH in the study population

Independent variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	OR	95% CI	<i>p</i> value	OR	95% CI	<i>p</i> value
BMP2 (pg/ml) Cut-off = 49.21	3.5	[1.47–8.37]	0.005	5.07	[1.55–16.6]	0.007
Gender (female/male)	2.77	[1.43–5.36]	0.002	2.96	[1.22–7.14]	0.016
Age (years)	1.04	[1.01–1.06]	0.004	1.03	[0.99–1.06]	0.06
BMI (kg/m ²)	1.22	[1.14–1.31]	<0.001	1.28	[1.16–1.41]	<0.001
Glucose (mg/dL)	1.03	[1.01–1.04]	<0.001	1.02	[1–1.04]	0.018
GGT (IU/L)	1.01	[1.01–1.02]	0.001	1.01	[1–1.02]	0.016

OR Odds ratio, CI Confidence interval, BMI Body mass index, GGT Gamma-glutamyltransferase

patients as well as that serum BMP2 levels were also higher in these patients than in subjects with histologically normal liver, positioning this protein as a new molecular target linked to NAFLD. One limitation of this study is the limited number of individuals taking into account that women were predominant in all the histological groups studied, especially within patients with histological NL, and NAFLD patients were significantly older than NL subjects. In fact, BMP2 expression might be affected by age and sex. However, no correlation was found between circulating BMP2 levels and age ($r = -0.05484$ $p = 0.4524$), and there were no differences when separating the population by sex

($p = 0.2035$). In addition, we have also shown herein that human hepatocytes are able to produce and secrete BMP2 upon stimuli with PA mimicking steatotic conditions [23], indicating that BMP2 might be involved in hepatosteatosis development, not only in the fibrogenic process as some studies have previously reported [25, 26].

Interestingly, there are only two studies so far showing that the expression of some BMPs, specifically BMP6 and BMP8B, is increased in the liver of NAFLD patients [13, 27]. These studies, along with our findings, indicate that BMPs might play a role in NAFLD pathophysiology. In this regard, it has been demonstrated that the

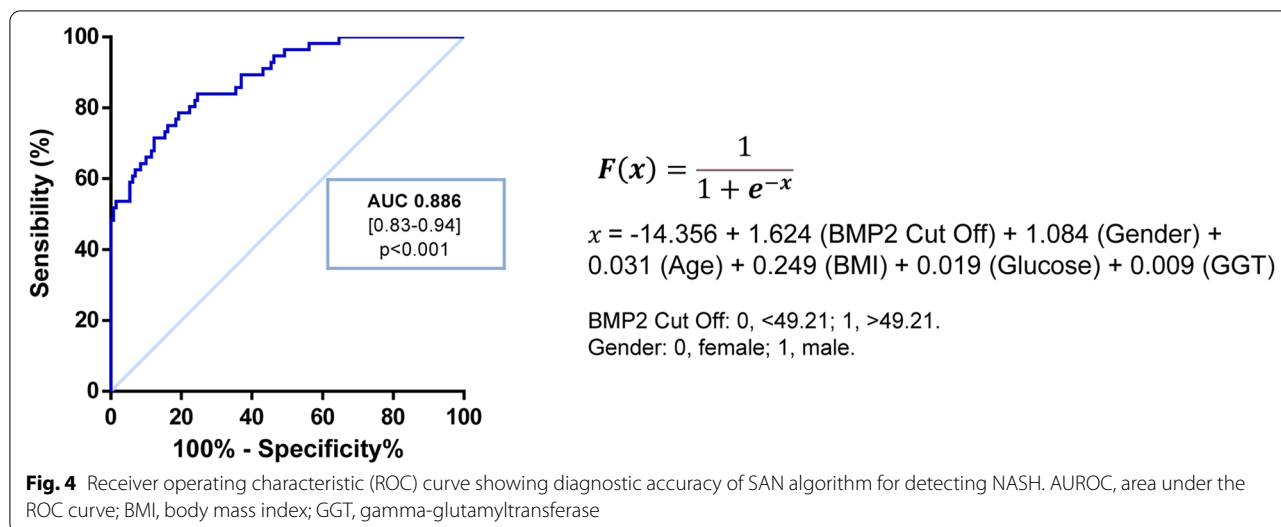


Table 3 Diagnostic accuracy of SAN

SAN cut point	Accuracy	%	SN	SP	PPV	NPV	LR+	LR-
≥ 0.10	0.66	60.2	0.93	0.54	0.46	0.95	2.02	0.13
≥ 0.20	0.71	48.9	0.84	0.66	0.52	0.90	2.47	0.24
≥ 0.30	0.80	36.6	0.77	0.81	0.63	0.89	4.05	0.28
≥ 0.40	0.81	32.8	0.73	0.85	0.67	0.88	4.87	0.32
≥ 0.50	0.83	24.2	0.62	0.92	0.78	0.85	7.75	0.41
≥ 0.60	0.83	18.8	0.54	0.96	0.86	0.83	13.5	0.48
≥ 0.70	0.84	15.1	0.48	0.99	0.96	0.82	48.0	0.53
≥ 0.80	0.82	12.4	0.41	1.00	1.00	0.80	N/A	0.59
≥ 0.90	0.78	8.1	0.27	1.00	1.00	0.76	N/A	0.73

SAN Screening Algorithm for NASH, SN Sensitivity, SP Specificity, PPV Positive predictive value, NPV Negative predictive value, LR+, positive likelihood ratio; LR-, negative likelihood ratio

pharmacological inhibition of BMP signaling reduced diet-induced hepatic steatosis in obese mice by targeting the production of triglycerides in the liver [18]; but also, this study has also shown that this effect is specific for the inhibition of BMP type I receptor ALK3, proposing a role of BMP2 and BMP4 in the establishment of NAFLD [18].

Going further, our study is the first which reports circulating BMP2 concentrations in NAFLD patients. Other authors have previously reported that serum levels of distinct BMPs varied widely in the context of other metabolic disorders. For instance, elevated serum BMP4 levels have been correlated with carotid atherosclerosis in T2D patients [28]. Conversely, various studies have associated BMP9 with glucose and lipid metabolism because a decrease in the circulating concentrations of BMP9 have been observed in patients who displayed features of metabolic syndrome such as insulin resistance, T2D or arterial hypertension [29–31]. BMP9 has also been related to other diseases, such as portopulmonary hypertension,

with lowered levels of this protein acting as a potential risk factor [32]. Regarding liver diseases, while BMP7 has been proposed as a marker for hepatic carcinogenesis because its serum levels were found to be decreased in patients with liver cancer [33], other authors have reported that circulating BMP7 levels are augmented in patients with viral chronic liver diseases [34]. Considering BMP2 reports, some studies have associated increased serum levels of this BMP with coronary artery disease in diabetic patients [35]. Moreover, an elevation of serum BMP2 concentrations was observed in overweight and obese middle-aged and elderly women [36], whereas in the present study, a correlation between circulating levels of BMP2 and BMI was not observed in agreement with results recently reported by Lopes et al. [37]. Nevertheless, further investigations are warranted to elucidate the role of BMP2 regulating glucose and lipid homeostasis and its impact in the pathogenesis of metabolic diseases such as obesity, diabetes and NAFLD.

One of the most striking findings of the present study is that serum BMP2 levels were significantly associated with biopsy-proven NASH in multivariate logistic regression model, suggesting that BMP2 might have utility as biomarker to screen NASH in different clinical settings. Using serum BMP2 levels combined with age, gender, BMI, glucose and GGT, an algorithm termed SAN (Screening Algorithm for NASH) was derived from a logistic regression model which discriminated NASH patients from subjects with histologically normal liver or NAFL. This is a breakthrough because there are no validated non-invasive tools for predicting NASH so far, the most clinically relevant form of NAFLD which can only be diagnosed by liver biopsy. In our population, a value of $SAN \geq 0.6$ indicated a high risk for biopsy-proven NASH with a good accuracy (AUROC, 0.86; SP, 0.96) showing that SAN may be useful to screen populations at risk for NAFLD.

Conclusion

In conclusion, this proof-of-concept study provides the first scientific evidence that hepatic and serum levels of BMP2 are abnormally elevated in NAFLD patients, indicating that BMP2 is a new molecular target linked to human NAFLD. In addition, we describe a simple and efficient algorithm termed SAN which was able to discriminate NASH with a good accuracy in our study population. Further studies, however, in distinct and larger cohorts of NAFLD patients are needed to validate the potential utility of SAN as a non-invasive algorithm for NAFLD evaluation.

Acknowledgements

We thankfully acknowledge Elvira del Pozo for helpful clinical assistance.

Authors' contributions

AGR conceived and supervised the study. CGM, JRdC, JA and MRG carried out and analyzed the clinical parameters. PM, ER, RGD and RMV were involved in data generation. PM, CEFG, CGM and AGR analyzed and discussed data. PM, AGR and CGM prepared the manuscript. All authors critically revised and approved the manuscript.

Funding

This work was supported by grants PI20/00837 from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Spain) and Fondo Europeo para el Desarrollo Regional (FEDER), GLD18/00151 from Gilead Science and CIBEREHD (ISCIII) to CGM, and contracts CP14/00181 and CP19/00032, and grants PI16/00853 and PI19/00123 from ISCIII/FEDER/FEDER and CIBERDEM (ISCIII) to AGR.

Availability of data and materials

Authors declared that all and the other data supporting the findings of this study are available within the paper. The raw data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was performed in agreement with the Declaration of Helsinki, and with local and national laws. The Human Ethics Committee of the Hospital

Universitario Santa Cristina (reference, PI-688A) and Hospital Universitario Virgen del Rocío (reference, C.I. 0359-N-15) approved the study procedures, and all participants signed an informed written consent before inclusion in the study.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

All authors have declared that no competing interest exists.

Author details

¹Metabolic Syndrome and Vascular Risk Laboratory, Hospital Universitario Santa Cristina, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario de La Princesa, C/Maestro Vives 2, 28009 Madrid, Spain. ²SeLiver Group, Instituto de Biomedicina de Sevilla/CSIC/Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain. ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Madrid, Spain. ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Madrid, Spain. ⁵Present address: Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (Centro Mixto CSIC-UAM), 28029 Madrid, Spain.

Received: 13 April 2022 Accepted: 10 May 2022

Published online: 25 May 2022

References

- Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038–48 PubMed PMID: 26823198.
- Goh GB, McCullough AJ. Natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2016;61(5):1226–33 PubMed PMID: 27003142.
- Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73–84 PubMed PMID: 26707365.
- Younossi ZM, Stepanova M, Younossi Y, Golabi P, Mishra A, Rafiq N, et al. Epidemiology of chronic liver diseases in the USA in the past three decades. *Gut*. 2020;69(3):564–8 PubMed PMID: 31366455.
- Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Casini A, Marucci L, Gaggiotti G, et al. Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology*. 1999;29(6):1743–51 PubMed PMID: 10347117. Epub 1999/05/29. eng.
- Sokol RJ, McKim JM Jr, Goff MC, Ruyle SZ, Devereaux MW, Han D, et al. Vitamin E reduces oxidant injury to mitochondria and the hepatotoxicity of taurochenodeoxycholic acid in the rat. *Gastroenterology*. 1998;114(1):164–74 PubMed PMID: 9428230.
- Lindenmeyer CC, McCullough AJ. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease—an evolving view. *Clin Liver Dis*. 2018;22(1):11–21 PubMed PMID: 29128051. Pubmed Central PMCID: PMC6130315.
- Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Noninvasive assessment of liver disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2019;156(5):1264–81 e4 PubMed PMID: 30660725. Pubmed Central PMCID: 7505052.
- Arthur MJ, Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(2):G245–9 PubMed PMID: 10915630.
- Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:64–73 PubMed PMID: 25043976.
- Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*. 2010;147(1):35–51 PubMed PMID: 19762341.
- Herrera B, Sanchez A, Fabregat I. BMPs and liver: more questions than answers. *Curr Pharm Des*. 2012;18(27):4114–25 PubMed PMID: 22630083.
- Arndt S, Wacker E, Dorn C, Koch A, Saugspier M, Thasler WE, et al. Enhanced expression of BMP6 inhibits hepatic fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2015;64(6):973–81 PubMed PMID: 25011936.

14. Mahli A, Seitz T, Beckroge T, Freese K, Thasler WE, Benkert M, et al. Bone morphogenetic protein-8B expression is induced in Steatotic hepatocytes and promotes hepatic steatosis and inflammation in vitro. *Cells*. 2019;8(5):457. PubMed PMID: 31096638. Pubmed Central PMCID: 6562647.
15. Peng Q, Chen B, Wang H, Zhu Y, Wu J, Luo Y, et al. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) alleviates hepatic steatosis by increasing hepatic lipid turnover and inhibiting the mTORC1 signaling axis in hepatocytes. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(23):11520–40 PubMed PMID: 31831718. Pubmed Central PMCID: 6932923.
16. Platko K, Lebeau PF, Byun JH, Poon SV, Day EA, MacDonald ME, et al. GDF10 blocks hepatic PPARgamma activation to protect against diet-induced liver injury. *Mol Metab*. 2019;27:62–74 PubMed PMID: 31288993. Pubmed Central PMCID: 6717799.
17. Yang M, Liang Z, Yang M, Jia Y, Yang G, He Y, et al. Role of bone morphogenetic protein-9 in the regulation of glucose and lipid metabolism. *FASEB J*. 2019;33(9):10077–88 PubMed PMID: 31237775.
18. Thayer TE, Lino Cardenas CL, Martyn T, Nicholson CJ, Traeger L, Wunderer F, et al. The role of bone morphogenetic protein signaling in non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*. 2020;10(1):9831 PubMed PMID: 32561790. Pubmed Central PMCID: 7305229.
19. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412–9 PubMed PMID: 3899825. eng.
20. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999;94(9):2467–74 PubMed PMID: 10484010. Epub 1999/09/14. eng.
21. 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(6):1313–21 PubMed PMID: 15915461. Epub 2005/05/26. eng.
22. Miquilena-Colina ME, Lima-Cabello E, Sanchez-Campos S, Garcia-Mediavilla MV, Fernandez-Bermejo M, Lozano-Rodríguez T, et al. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*. 2011;60(10):1394–402 PubMed PMID: 21270117. Epub 2011/01/29.
23. Gonzalez-Rodriguez A, Mayoral R, Agra N, Valdecantos MP, Pardo V, Miquilena-Colina ME, et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1179 PubMed PMID: 24743734. Pubmed Central PMCID: 4001315. Epub 2014/04/20. eng.
24. Brunt EM, Kleiner DE, Carpenter DH, Rinella M, Harrison SA, Loomba R, et al. NAFLD: reporting histologic findings in clinical practice. *Hepatology*. 2021;73(5):2028–38 PubMed PMID: 33111374.
25. Chung YH, Huang YH, Chu TH, Chen CL, Lin PR, Huang SC, et al. BMP-2 restoration aids in recovery from liver fibrosis by attenuating TGF-beta1 signaling. *Lab Invest*. 2018;98(8):999–1013 PubMed PMID: 29789683.
26. Shen H, Huang GJ, Gong YW. Effect of transforming growth factor beta and bone morphogenetic proteins on rat hepatic stellate cell proliferation and trans-differentiation. *World J Gastroenterol*. 2003;9(4):784–7 PubMed PMID: 12679932. Pubmed Central PMCID: PMC4611450. Epub 2003/04/08.
27. Sanz S, Pucilowska JB, Liu S, Rodriguez-Ortigosa CM, Lund PK, Brenner DA, et al. Expression of insulin-like growth factor I by activated hepatic stellate cells reduces fibrogenesis and enhances regeneration after liver injury. *Gut*. 2005;54(1):134–41 PubMed PMID: 15591519. Pubmed Central PMCID: 1774353.
28. Son JW, Jang EH, Kim MK, Baek KH, Song KH, Yoon KH, et al. Serum BMP-4 levels in relation to arterial stiffness and carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Biomark Med*. 2011;5(6):827–35 PubMed PMID: 22103619.
29. Huang H, Wang W, Yang G, Zhang Y, Li X, Liu H, et al. Circulating bone morphogenetic protein-9 levels are associated with hypertension and insulin resistance in humans. *J Am Soc Hypertens*. 2018;12(5):372–80 PubMed PMID: 29550458.
30. Luo Y, Li L, Xu X, Wu T, Yang M, Zhang C, et al. Decreased circulating BMP-9 levels in patients with type 2 diabetes is a signature of insulin resistance. *Clin Sci*. 2017;131(3):239–46 PubMed PMID: 27940998.
31. Xu X, Li X, Yang G, Li L, Hu W, Zhang L, et al. Circulating bone morphogenetic protein-9 in relation to metabolic syndrome and insulin resistance. *Sci Rep*. 2017;7(1):17529 PubMed PMID: 29235531. Pubmed Central PMCID: 5727514.
32. Nikolic I, Yung LM, Yang P, Malhotra R, Paskin-Flerlage SD, Dinter T, et al. Bone morphogenetic protein 9 is a mechanistic biomarker of Portopulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;199(7):891–902 PubMed PMID: 30312106. Pubmed Central PMCID: 6444661.
33. Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(12):970–82 PubMed PMID: 18000526.
34. Tacke F, Gabele E, Bataille F, Schwabe RF, Hellerbrand C, Klebl F, et al. Bone morphogenetic protein 7 is elevated in patients with chronic liver disease and exerts fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. *Dig Dis Sci*. 2007;52(12):3404–15 PubMed PMID: 17415633.
35. Zhang M, Sara JD, Wang FL, Liu LP, Su LX, Zhe J, et al. Increased plasma BMP-2 levels are associated with atherosclerosis burden and coronary calcification in type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14:64 PubMed PMID: 26003174. Pubmed Central PMCID: 4450848.
36. Ribeiro S, Lopes LR, Paula Costa G, Figueiredo VP, Shrestha D, Batista AP, et al. CXCL-16, IL-17, and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) are associated with overweight and obesity conditions in middle-aged and elderly women. *Immun Ageing*. 2017;14:6 PubMed PMID: 28293269. Pubmed Central PMCID: PMC5346187. Epub 2017/03/16.
37. Lopes LR, Ribeiro S, Figueiredo VP, Leite ALJ, Nicolato RLC, Gomes JAE, et al. The overweight increases circulating inflammatory mediators commonly associated with obesity in young individuals. *Cytokine*. 2018;110:169–73 PubMed PMID: 29763838. Epub 2018/05/16.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

