

# UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA  
SALUD



## TESIS DOCTORAL

### **PAPEL DE MCJ (Methylation-Controlled J-Protein), REPRESOR ENDÓGENO DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL, EN EL DAÑO HEPÁTICO POR COLESTASIS**

Realizada por: PAULA IRUZUBIETA COZ

Dirigida por: DR. JAVIER CRESPO GARCÍA Y DRA. MARÍA LUZ MARTÍNEZ  
CHANTAR

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria  
Santander 2018





**Dr. Javier Crespo García**, con D.N.I. 13908214E, como Director y Tutor del trabajo de Tesis Doctoral **“Papel de MCJ (Methylation-Controlled J-protein), represor endógeno de la cadena respiratoria mitocondrial, en el daño hepático por colestasis”** realizado dentro del Programa de Doctorado de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Cantabria por la doctorando Dña. Paula Iruzubieta Coz, autorizo a que el mencionado trabajo sea depositado ya que se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa.

Santander, septiembre de 2018

EL DIRECTOR Y TUTOR DE LA TESIS

Fdo. Javier Crespo García





**Dra. María Luz Martínez Chantar**, con D.N.I. 50439787M, como Directora del trabajo de Tesis Doctoral **“Papel de MCJ (Methylation-Controlled J-protein), represor endógeno de la cadena respiratoria mitocondrial, en el daño hepático por colestasis”** realizado dentro del Programa de Doctorado de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Cantabria por la doctorando Dña. Paula Iruzubieta Coz, autorizo a que el mencionado trabajo sea depositado ya que se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa.

Santander, septiembre de 2018

LA DIRECTORA DE LA TESIS

Fdo. María Luz Martínez Chantar



## Agradecimientos

Tengo que agradecer a tantas personas que me tendréis que perdonar por no mencionar a todos.

En primer lugar, quisiera agradecer a todos mis compañeros de Digestivo, médicos y no médicos, por su apoyo, compañerismo y enseñanzas; y a mis compañeros en la Unidad de Metabólica del CIC BioGUNE, por hacerme sentir parte del equipo y por todo lo aprendido con ellos.

Quiero dar las gracias también a mis directores de tesis. A Malu, por la confianza depositada en mí a pesar de mis estudios en Medicina, y por nuestras “discusiones” de las que tanto he aprendido. A Crespo (imposible llamarle Javier), por su capacidad de trabajo y síntesis de las que he intentado e intento contagiarme, por su apoyo y confianza, y por no ser un jefe corriente.

A Lucía, mi gran apoyo en esta tesis tanto dentro como fuera del laboratorio. Sin ti todo esto no hubiese sido posible.

A Marta y Justyna, por su alegría, por su positividad, por los buffers ...por todo. Os echo de menos.

A Gotxi, Espe y Encarni, por sus risas y “escapadas” al café.

A todo el Servicio de Inmunología, con Marcos a la cabeza. Fue con ellos donde di mis primeros pasos en la investigación y me animé a continuar. Entre ellos conocí a Carol, una gran amiga de la que tanto aprendí y aprendo.

A Irene, Miguel, Ainhoa, Michelle, Blanca y Joaquín, mis “Rs” mayores, por ser mi segunda familia.

A Tatiana por sus ánimos, su ayuda y ganas de hacer bien las cosas.

A Susana, Asun, Paula y Mercedes, mis “cremis”, por su apoyo incondicional dentro y fuera del hospital. Por muchos años de “buen cutis”.

A Genaro, a sabiendas de su reprimenda. Gracias por dos motivos, el profesional y el afectivo, como tú bien dices. Gracias por enseñarme a “dar la manina”, gracias por tus llamadas de apoyo moral, gracias por tus consejos, gracias por hacer fácil lo imposible, gracias...

A María, una hermana para mí, a la que tanto quiero y admiro.

A mis tíos, Josefina y Paulino, y mis primas, Lore y Bea, por tener siempre un hueco disponible para mí en la mesa y en su casa.

A mis padres y mi hermana, por su apoyo, por su paciencia, y por estar ahí siempre a pesar de mis ausencias.

A ellos...



## ÍNDICE

---



ABREVIATURAS.....	13
1. RESUMEN .....	17
2. INTRODUCCIÓN .....	21
2.1 COLANGITIS BILIAR PRIMARIA Y COLANGITIS ESCLEROSANTE PRIMARIA .....	23
2.1.1 Epidemiología.....	23
2.1.2 Etiopatogenia .....	24
2.1.3 Historia natural y pronóstico.....	25
2.1.4 Tratamiento.....	27
2.2 PAPEL DE LOS ÁCIDOS BILIARES EN LAS ENFERMEDADES HEPÁTICAS COLESTÁSICAS .....	30
2.2.1 Importancia de los ácidos biliares .....	30
2.2.2 Citotoxicidad de los ácidos biliares .....	31
2.2.3 Alteración de la función mitocondrial por ácidos biliares.....	32
2.2.4 Estrés oxidativo en la colestasis .....	35
2.3 METHYLATION-CONTROLLED J PROTEIN (MCJ) .....	36
2.4 LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR, MODELO ANIMAL DE COLESTASIS OBSTRUCTIVA....	39
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	41
3.1 HIPÓTESIS .....	43
3.2 OBJETIVOS .....	43
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
4.1 MUESTRAS HUMANAS .....	47
4.1.1 Enfermedad hepática colestásica primaria en adultos .....	47
4.1.2 Controles sanos .....	47
4.1.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	48
4.2 MODELO ANIMAL.....	48
4.2.1 Silenciamiento de MCJ in vivo.....	49
4.3 EXPERIMENTACIÓN EN CÉLULAS HEPÁTICAS.....	49
4.3.1 Aislamiento y cultivo de hepatocitos primarios de ratón .....	49
4.3.2 Silenciamiento de MCJ in vitro.....	50
4.3.3 Sobreexpresión de MCJ.....	50
4.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y ANÁLISIS.....	51
4.4.1 Extracción de proteínas totales.....	51
4.4.2 Western blotting .....	51
4.5 EXTRACCIÓN DE ARN Y PROCESAMIENTO .....	52
4.5.1 Aislamiento de ARN.....	52
4.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) .....	53
4.6 MEDICIÓN DE ÁCIDOS BILIARES .....	54

4.6.1 Niveles de ácidos biliares totales .....	54
4.6.2 Niveles de los diferentes ácidos biliares .....	55
4.7 CUANTIFICACIÓN DE LA MUERTE CELULAR .....	56
4.7.1 Determinación de actividad caspasa-3 .....	56
4.7.2 Determinación de apoptosis por TUNEL .....	56
4.8 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) .....	57
4.8.1 Cuantificación del estrés oxidativo .....	57
4.8.2 Cuantificación del ROS mitocondrial .....	57
4.9 CUANTIFICACIÓN DE ATP .....	57
4.10 MEDICIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL .....	58
4.11 TINCIÓN DE MITOCONDRIAS ACTIVAS .....	58
4.12 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS .....	58
4.12.1 Tinción Hematoxilina-Eosina .....	58
4.12.2 Tinción Rojo Sirio .....	59
4.12.3 Inmunohistoquímica .....	59
4.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	60
5. RESULTADOS .....	61
5.1 EL DÉFICIT DE MCJ PROTEGE Y PREVIENE EL DAÑO HEPÁTICO POR COLESTASIS IN VIVO .....	63
5.1.1 Mayor supervivencia en ratones con pérdida de MCJ .....	63
5.1.2 Mayor expresión de MCJ conforme aumenta el grado de colestasis .....	64
5.1.3 Menor daño hepático por colestasis en ausencia de MCJ .....	64
5.1.4 Ausencia de modificación en la composición de la bilis por el déficit de MCJ .....	66
5.1.4 El tratamiento con siRNA frente a MCJ reduce el daño hepático por colestasis .....	67
5.2 LA PÉRDIDA DE MCJ PROTEGE A LOS HEPATOCITOS DE LA TOXICIDAD POR ACIDOS BILIARES .....	69
5.2.1 Menor apoptosis en hepatocitos con déficit de MCJ .....	69
5.2.2 Menor formación de ROS en hepatocitos con déficit de MCJ .....	72
5.2.3 Mayor actividad mitocondrial en los hepatocitos con déficit de MCJ .....	73
5.3 EXPRESIÓN DE MCJ EN PACIENTES CON ENFERMEDAD HEPÁTICA COLESTÁSICA .....	74
5.3.1 Niveles hepáticos de MCJ elevados en pacientes con una enfermedad hepática colestásica .....	74
5.3.2 Asociación entre la CBP avanzada y la presencia de anticuerpos anti-MCJ en suero .....	76
6. DISCUSIÓN .....	79
7. CONCLUSIONES .....	87
8. BIBLIOGRAFÍA .....	91

## ABREVIATURAS

---



<b>AB</b>	Ácidos biliares
<b>ADNmt</b>	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
<b>AMA</b>	Anticuerpo antimitocondrial
<b>ASBT</b>	Apical sodium dependent bile acid transporter
<b><math>\alpha</math>SMA</b>	Alpha smooth muscle actin
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>ATP</b>	Adenosine-5'-triphosphate
<b>BSEP</b>	Bile salt export pump
<b>cAMP</b>	Cyclic adenosine monophosphate
<b>CBP</b>	Colangitis biliar primaria
<b>CDCA</b>	Chenodeoxycholic acid
<b>CEP</b>	Colangitis esclerosante primaria
<b>CTE</b>	Cadena de transporte de electrones
<b>CYP</b>	Cytochrome P450
<b>CytC</b>	Citocromo C
<b>DAMP</b>	Damage associated molecular patterns
<b>DCA</b>	Deoxycholic acid
<b>DILI</b>	Drug-induced liver injury
<b>EII</b>	Enfermedad inflamatoria intestinal
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FGF-19</b>	Fibroblast growth factor 19
<b>FGFR4</b>	Fibroblast growth factor receptor 4
<b>FXR</b>	Farnesoid X receptor
<b>GCDA</b>	Cochenodeoxycholic acid
<b>GRIM-19</b>	Gene associated with retinoid-interferon-induced mortality 19
<b>GSH</b>	Glutation reducido
<b>GWAS</b>	Genome-wide association study
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen
<b>IL</b>	Interleucina
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinase
<b>KO</b>	Knockout
<b>LCA</b>	Lithocholic acid
<b>LCB</b>	Ligadura del conducto biliar
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MCJ</b>	Methylation-controlled J protein
<b>MDR2</b>	Multidrug resistant protein 2
<b>MEM</b>	Membrana externa mitocondrial
<b>MIM</b>	Membrana interna mitocondrial
<b>MPTP</b>	Mitochondrial permeability transition pore
<b>MRP</b>	Multidrug resistance-associated protein
<b>NAFLD</b>	Non-alcoholic fatty liver disease
<b>NRF-1</b>	Nuclear respiratory factor 1
<b>NRF-2</b>	Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2
<b>NTCP</b>	Sodium-taurocholate cotransporting polypeptide
<b>OATP</b>	Organic-anion-transporting polypeptide
<b>OCA</b>	Obeticholic acid

<b>OST</b>	Organic solute transporter
<b>p-ANCA</b>	Anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos perinucleares
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor
<b>PXR</b>	Pregnane X receptor
<b>Rcf1</b>	Respiratory supercomplex factor 1
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>SHP</b>	Small heterodimer partner
<b>ShRNA</b>	Small hairpin RNA
<b>siRNA</b>	Small interfering RNA
<b>STAT3</b>	Signal transducer and activator of transcription 3
<b>TCDCA</b>	Taurodeoxycholic acid
<b>Tfam</b>	Transcription factor A
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor beta
<b>TLR</b>	Toll like receptor
<b>TNFR</b>	Tumor necrosis factor receptor
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor alpha
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis inducing ligand
<b>UDCA</b>	Ursodeoxycholic acid
<b>VHC</b>	Virus de la hepatitis C
<b>WT</b>	Wild type

## 1. RESUMEN

---



La colangitis biliar primaria (CBP) y la colangitis esclerosante primaria (CEP) son las dos enfermedades colestásicas crónicas más prevalentes. Factores genéticos, ambientales y endógenos pueden contribuir al desarrollo de enfermedades hepáticas colestásicas crónicas, pero la patogenia exacta de la CBP y CEP no está aclarada. Varios estudios indican que el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial contribuyen a la patogenia de estas enfermedades, y es que los ácidos biliares son citotóxicos puesto que son capaces de alterar membranas lipídicas y entre ellas la membrana mitocondrial, disipando así el potencial de membrana mitocondrial lo que conduce a un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS -*Reactive Oxygen Species*-) y finalmente la muerte del hepatocito. El ácido ursodesoxicólico (UDCA -*Ursodeoxycholic acid*-) es el tratamiento estándar tanto de la CBP como de la CEP, pero no todos los pacientes responden adecuadamente a UDCA, por lo que son necesarias nuevas estrategias terapéuticas.

Methylation-controlled J protein (MCJ), también conocida como DnaJC15, es una proteína transmembrana localizada en la membrana interna mitocondrial, y uno de los primeros inhibidores naturales de la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial por su interacción proteína-proteína. Su ausencia ha demostrado un aumento en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, sin aumentar la producción de ROS. Bajo condiciones fisiológicas, la pérdida de expresión de MCJ en ratones no afecta a su supervivencia ni causa alteraciones en su fenotipo. Sin embargo, en condiciones metabólicas alteradas, la deficiencia de MCJ impide la acumulación de productos tóxicos a nivel hepático, lo que sugiere que podría modular la lesión hepática ante determinados hepatotóxicos como los ácidos biliares.

En este estudio, mostramos que el daño hepático por colestasis progresa a través de la participación esencial de MCJ tanto en los estudios *in vivo* como *in vitro*. La pérdida de MCJ protege a los hepatocitos de la despolarización de la membrana mitocondrial, la sobreproducción de ROS y de la depleción de ATP consecuencia de la toxicidad por ácidos biliares, lo que conduce a una menor muerte hepatocitaria. Además, la inhibición *in vivo* de la expresión de esta proteína mediante el tratamiento con el siRNA (small interfering RNA) específico de MCJ reduce el daño hepático por ácidos biliares. También mostramos niveles hepáticos altos de MCJ en pacientes con CBP y CEP comparados con tejido hepático normal. Por tanto, sugerimos que MCJ podría representar una diana terapéutica para prevenir y tratar el daño hepático causado por colestasis.



## 2. INTRODUCCIÓN

---



## 2.1 COLANGITIS BILIAR PRIMARIA Y COLANGITIS ESCLEROSANTE PRIMARIA

Las enfermedades colestásicas crónicas del adulto son enfermedades hepáticas raras caracterizadas por una inflamación crónica de las vías biliares intrahepáticas y extrahepáticas, y que progresan eventualmente hasta producir una cirrosis hepática, fallo hepático y muerte. Dentro de las enfermedades colestásicas crónicas las más frecuentes son la colangitis biliar primaria (CBP) y la colangitis esclerosante primaria (CEP). La CBP se caracteriza por una colangitis crónica alrededor de los conductos biliares de pequeño y mediano calibre; y la CEP por una inflamación y fibrosis concéntrica de las vías biliares intrahepáticas de mediano y gran calibre, y también de las vías extrahepáticas.

Tanto en la CBP como la CEP, la lesión de los conductos biliares es mediada por el sistema inmune provocando un daño necroinflamatorio, y evoluciona a una enfermedad con manifestaciones colestásicas consecuencia de la colestasis, ductopenia y la fibrosis biliar progresiva. Estas diferentes etapas de la enfermedad, una etapa inicial con inflamación y una etapa posterior con colestasis y fibrosis, podrían necesitar diferentes tratamientos médicos. Sin embargo, para poder aplicar este enfoque más personalizado, es necesario un mejor conocimiento de la patogenia y caracterización de la gravedad de la afectación hepática.

### 2.1.1 Epidemiología

La epidemiología de la CBP es difícil de establecer con precisión. La CBP es una enfermedad rara pero distribuida por todo el mundo y con una prevalencia variable según la geografía, sugiriendo un posible papel de desencadenantes ambientales en el desarrollo de la enfermedad. En Europa, la incidencia y prevalencia estimada de CBP es de 0,3-5,8 casos/100.000 habitantes por año y 1,9-40,2 casos/100.000 habitantes, respectivamente, y ambas han aumentado con el tiempo (1,2). La mayor prevalencia es probablemente atribuida a una mayor detección de casos silentes y asintomáticos como consecuencia del mayor reconocimiento de la patología y de la mejora de las técnicas diagnósticas, y a una mayor supervivencia después de la introducción del tratamiento con ácido ursodeoxicólico (UDCA). La enfermedad es predominantemente femenina, con un ratio mujer/hombre de 10/1, aunque datos recientes sugieren un incremento en la prevalencia masculina (3).

La CEP también se ajusta a la definición de enfermedad rara, afectando a menos de 200.000 personas en los Estados Unidos y menos 5 de cada 10.000 habitantes en Europa. Varios estudios epidemiológicos en Europa han mostrado una incidencia de 0,4-2 casos/100.000 habitantes por año y una prevalencia en torno a 10 casos/100.000 habitantes (4,5). Al igual que la CBP, la incidencia de CEP se está incrementando (6), aunque parece que no lo explica un diagnóstico más temprano puesto que las características clínicas de los pacientes recién diagnosticados parecen estables a lo largo

del tiempo, por lo que puede ser debido a una mayor exposición a factores desencadenantes. A diferencia de la CBP, es más frecuente en hombres, con un ratio hombre/mujer de aproximadamente 2/1. Además, un dato característico de la CEP es que hasta en un 70% de los pacientes presentan una enfermedad inflamatorio intestinal, que en la mayoría de los casos se trata de una colitis ulcerosa.

### 2.1.2 Etiopatogenia

Tanto en la CBP como en la CEP se produce una lesión necroinflamatoria de los conductos biliares, los conductos de pequeño y mediano calibre en la CBP y los conductos de mediano y gran calibre en la CEP. Esta lesión biliar continuada produce la interrupción de la secreción biliar y la destrucción de los conductos, con la acumulación progresiva en los hepatocitos de sustancias tóxicas, como ciertos ácidos biliares, que contribuyen a la lesión del parénquima hepático. Los mecanismos celulares y moleculares implicados en el desarrollo de las enfermedades hepáticas colestásicas no se conocen; sin embargo, la acumulación excesiva intrahepática de ácidos biliares juega un papel esencial en el daño hepático de estas patologías. De los mecanismos de toxicidad por ácidos biliares trataré más adelante, en este apartado me centraré en las causa o desencadenantes de la lesión inicial de los conductos biliares.

Se considera que la lesión inicial se produce por mecanismos inmunológicos debido a una pérdida de la inmunotolerancia (7), por lo que ambas enfermedades hepáticas son consideradas enfermedades de carácter autoinmune. Aunque sus etiologías siguen siendo en gran medida desconocidas, la exposición a factores ambientales, que podrían conducir a la descomposición de la tolerancia inmune, junto con una predisposición genética parece lo más plausible. Datos provenientes de estudios de asociación del genoma (GWAS) han observado una fuerte asociación de estas enfermedades con genes derivados de los antígenos del sistema de histocompatibilidad (HLA) y loci no-HLA que codifican citoquinas, interferón y vías de regulación inmune (8–11).

De las dos principales enfermedades hepáticas colestásicas, la CBP se clasifica mejor como una enfermedad autoinmune debido a su predominio en mujeres, la asociación con otras enfermedades de fondo autoinmune y por su relación con los anticuerpos antimitocondriales (AMA) M2. Estos AMA se dirigen contra una familia de enzimas mitocondriales, los complejos de 2-oxo-ácido deshidrogenasa, que incluyen piruvato deshidrogenasa, 2-oxo-ácido deshidrogenasa de cadena ramificada y ácido 2-oxo-glutámico deshidrogenasa, y podrían originarse por mimetismo molecular (12). La expresión de estas proteínas es particularmente alta en las células epiteliales biliares, lo que explica la predilección de los AMAs por los conductos biliares de pequeño y mediano calibre en la CBP. Los AMAs aparecen antes de producirse la enfermedad hepática, lo que indica que la pérdida de tolerancia al autoantígeno mitocondrial es un hecho

temprano y podría ser independiente del desarrollo de enfermedad hepática. El papel de los factores ambientales está ampliamente demostrado en el desarrollo de la autoinmunidad, y en el caso de la CBP se ha observado la presencia de reactividad cruzada entre AMA y ciertas bacterias gramnegativas y micobacterias (13). Otros factores descritos como posibles desencadenantes son los virus y compuestos químicos (14,15).

Por su parte, la CEP también apunta hacia la autoinmunidad consecuencia de su fuerte asociación genética con HLA observada en los análisis GWAS (16,17), así como por su asociación con otras enfermedades autoinmunes. Hasta la fecha, no se han identificado factores ambientales definitivos causantes de la enfermedad. Un mecanismo hipotético de desarrollo de CEP es la exposición microbiana en el árbol biliar ante una enfermedad infecciosa directa o por traslocación de la flora microbiana intestinal, con pérdida de la tolerancia inmune, que generaría una activación del sistema inmune desproporcionada y la inflamación del árbol biliar (18). El papel del microbioma intestinal en el desarrollo de CEP se pone de manifiesto por su fuerte asociación con la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), donde existe una disbiosis y alteración de la permeabilidad intestinal. Por lo tanto, el fracaso de la función de la barrera intestinal, que permite que productos bacterianos alcancen el hígado, puede vincular la EII y la CEP. Además, las células inmunes activas en el intestino podrían migrar a los conductos biliares y desencadenar o contribuir a la lesión de los conductos biliares (19).

### **2.1.3 Historia natural y pronóstico**

Aunque la CBP suele progresar de forma lenta y las manifestaciones clínicas pueden permanecer invariables durante años; la CBP se caracteriza por una heterogeneidad en cuanto a su presentación, sintomatología, progresión, y respuesta al tratamiento médico. La progresión de la enfermedad implica el desarrollo de fibrosis, ductopenia y hepatitis de la interfase, y es en las fases finales de la enfermedad cuando esta progresión se acelera y aparecen las manifestaciones de la hipertensión portal (20). Antes del uso del UDCA, la supervivencia a 10 años de aquellos pacientes asintomáticos era del 50 al 70% y ésta empeoraba en pacientes sintomáticos siendo su mediana de supervivencia era de 6 a 8 años. Desde la introducción del UDCA, la historia natural de la enfermedad ha cambiado sustancialmente. En una cohorte internacional de más de 4.000 pacientes, la probabilidad de supervivencia libre de trasplante hepático en los pacientes tratados con UDCA fue del 90% a los 5 años, 78% a los 10 años, y 66% a los 15 años, comparado con un 79% a los 5 años, 59% a los 10 años, y 32% a los 15 años en los pacientes no tratados (21). Pero, a pesar del tratamiento con UDCA, la CBP puede seguir siendo una enfermedad progresiva, con riesgo de desarrollo de complicaciones relacionadas con el hígado y muerte. Por ello, todo paciente diagnosticado de CBP debe ser evaluado para la estadificación del grado de afectación hepática y del riesgo de progresión de la enfermedad.

Los tres factores principales para determinar el grado de afectación hepática y el pronóstico de los pacientes son las características histológicas hepáticas, los niveles de bilirrubina y albúmina, y la respuesta bioquímica a la terapia con UDCA. En cuanto a la biopsia hepática, la presencia de un estadio histológico avanzado (la fibrosis en puentes y cirrosis) nos indica un peor pronóstico (22); pero dada sus limitaciones, por su carácter invasivo y la variabilidad de muestreo, y la alta sensibilidad de los marcadores serológicos para el diagnóstico de CBP, la biopsia hepática actualmente no es necesaria excepto en caso de duda diagnóstica o sospecha de solapamiento con hepatitis autoinmune. Los niveles de bilirrubina y albúmina se alteran en fases tardías de la CBP, por lo que no son marcadores realistas en estadificar el pronóstico en los pacientes en fases iniciales de la enfermedad, sino más bien en identificar a pacientes con una enfermedad avanzada (21). La respuesta bioquímica a UDCA es un predictor importante del pronóstico, pero existen varias definiciones de respuesta bioquímica basados en criterios dicotómicos (especialmente la fosfatasa alcalina y la bilirrubina) que no tienen en cuenta variables pronósticas importantes como los marcadores del estadio de la enfermedad (23–26). Consecuencia de los inconvenientes de estos factores, se han estudiado marcadores no invasivos para determinar el grado de fibrosis hepática y, por ende, el pronóstico de la enfermedad hepática. En esta línea, se han evaluado numerosos biomarcadores séricos, principalmente en la hepatitis crónica por VHC y en la esteatohepatitis no alcohólica, lo que nos indica que no hay uno ideal. La medida de la rigidez hepática mediante elastografía de transición (FibroScan®) ha demostrado ser uno de los mejores marcadores subrogados para la detección de fibrosis avanzada en pacientes con CBP, identificando con una sensibilidad y especificidad mayor del 90% a pacientes con una fibrosis avanzada ante un valor  $\geq 10,7$  kPa (27); no obstante, esta prueba puede ser menos precisa cuando hay una intensa colestasis, además de las limitaciones ocasionadas por ciertas características anatómicas de los sujetos.

La historia natural de la CEP es progresiva y altamente variable al igual que la CBP. A diferencia de ésta, la fosfatasa alcalina y la bilirrubina en la CEP tienen un curso fluctuante impredecible donde las elevaciones transitorias pueden ser causadas por colangitis, cálculos biliares o estenosis dominantes, lo que dificulta la evaluación del estadio de la enfermedad, el pronóstico y la respuesta a UDCA. Además, para el diagnóstico de CEP no existen autoanticuerpos específicos. Los anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos perinucleares (p-ANCA) atípicos son positivos en el 26-94% de los pacientes con CEP, pero no son específicos ni reflejan el pronóstico de la enfermedad (28,29). Al igual que ocurre en la CBP, la biopsia hepática en la CEP se ha abandonado tanto por su naturaleza invasiva como por la variabilidad de muestreo; y la elastografía de transición ha demostrado una buena correlación con el grado de fibrosis hepática en la CEP (30), siendo la colestasis un factor de confusión en la medición de la rigidez hepática. En definitiva, tanto para la CBP como para la CEP, son necesarios nuevos marcadores no invasivos que nos ayuden a caracterizar adecuadamente a los pacientes.

## 2.1.4 Tratamiento

Como ya mencioné anteriormente, la inflamación de las vías biliares conduce a la colestasis, con la retención intracelular de ácidos biliares. Los ácidos biliares hidrofóbicos pueden ser dañinos especialmente cuando se encuentran en altas concentraciones; así, si dicha colestasis no se trata, puede provocar la destrucción del conducto biliar y dañar a los hepatocitos, dando lugar a fibrosis y, en última instancia, cirrosis e insuficiencia hepática. Por este motivo, los tratamientos específicos de estas enfermedades hepáticas están orientados a atenuar la inflamación de las vías biliares y, especialmente, a reducir la toxicidad de los ácidos biliares.

Sólo dos fármacos están aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la CBP: el ácido ursodeoxicólico (UDCA), como terapia de primera línea, y el ácido obeticólico (OCA), para pacientes intolerantes o no respondedores a UDCA. Aproximadamente un 40% de los pacientes con CBP no responden a UDCA, y sólo la mitad de éstos responden a OCA (31). Son estos pacientes no respondedores al tratamiento con UDCA y OCA los que están en riesgo de progresión a cirrosis. Cuando no se consigue detener el curso de la enfermedad, el tratamiento final es el trasplante hepático. Por otro lado, ningún fármaco ha demostrado prolongar la supervivencia libre de trasplante en la CEP, por lo que no hay una terapia médica aprobada para ella e invariablemente progresa a cirrosis biliar, siendo el trasplante hepático el único tratamiento definitivo. Además, los pacientes con CEP pueden desarrollar estenosis dominantes y colangitis bacterianas, además de tener un mayor riesgo de tumores malignos. Claramente es necesario la identificación de nuevas terapias efectivas que eviten la progresión de la enfermedad hepática colestásica y sus consecuencias. A continuación, resumiré las terapias médicas aprobadas para la CBP y las terapias nuevas bajo investigación.

### 2.1.4.1 Terapias aprobadas

#### a) Ácido Ursodeoxicólico (UDCA)

El UDCA es un ácido biliar hidrofílico componente fisiológico de la bilis, pero sólo forma el 4% del total de los ácidos biliares endógenos. Los beneficios del tratamiento con UDCA son debidos a los siguientes mecanismos: i) estimulación en los colangiocitos de la secreción de bicarbonato, aumentando el pH y desplazando a los ácidos biliares hacia una forma ionizada menos citotóxica (32); ii) reducción de la toxicidad biliar al aumentar el ratio hidrofílico de los ácidos biliares; iii) acción anti-inflamatoria relacionada con su actividad agonista del receptor de glucocorticoides, receptor nuclear que regula las respuestas inflamatorias e inmunes (33) ; y, iv) acción anti-apoptótico al reducir la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial y disminuir la liberación de citocromo c (34,35).

Este fármaco ha demostrado mejorar la bioquímica hepática, retrasar la progresión histológica, retrasar el desarrollo de varices esofágicas, y alargar la

supervivencia. A pesar de presentar un marcado impacto en los resultados clínicos, el tratamiento con UDCA tiene menor eficacia en pacientes con una enfermedad más avanzada, y hasta el 40% de los pacientes tienen una respuesta insuficiente.

### **b) Ácido obeticólico (OCA)**

Ácido biliar sintético derivado del ácido quenodesoxicólico, el ligando natural del receptor nuclear farnesoide X (FXR), con cien veces su potencia actuando como un fuerte agonista de FXR (36). FXR es un receptor nuclear de hormonas que se expresa en una amplia variedad de células, principalmente en los enterocitos, hepatocitos y epitelio biliar, y los ácidos biliares son sus ligandos endógenos, regulando su síntesis y almacenamiento. En el íleon terminal, los ácidos biliares se reabsorben y se unen a FXR, que tiene una serie de genes diana como el factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF-19). Esta hormona es secretada a la circulación portal y a nivel hepático se une a su receptor inhibiendo la expresión del citocromo P450 7A1-hidroxilasa (CYP7A1), enzima limitante de la velocidad para la conversión de colesterol en ácidos biliares (37). Además, la activación de FXR modula la expresión de transportadores específicos de ácidos biliares, disminuyendo el transportador intestinal de ácidos biliares ASBT, los transportadores de captación hepática NTCP y OATP, e induciendo la expresión de los transportadores de salida hepática BSEP (bile salt export pump), MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) y MDR3 (multidrug resistant protein 3) en la luz canalicular (38,39). FXR también regula el metabolismo lipídico y la gluconeogénesis, así como las vías de inflamación y fibrosis (40).

OCA ha demostrado efectos anticolestásicos, antiinflamatorios y antifibróticos en los estudios preclínicos y clínicos (36,41). Este agente, generalmente asociado al tratamiento con UDCA, tiene efectos favorables sobre los indicadores bioquímicos de colestasis, así como sobre otros de inflamación, pero todavía no hay evidencias sobre el efecto a largo plazo y sobre si reduce la progresión de la enfermedad en cuanto a la fibrosis (31,42). La monoterapia con OCA también ha mostrado resultados similares (43). No se han descrito efectos adversos graves, pero debe tenerse en cuenta que este tratamiento induce prurito e hiperlipidemia.

#### **2.1.4.2 Terapias en investigación**

##### **a) Agonistas FXR:**

Además de OCA, otros agonistas de FXR (LJN-452, GS-9674 y EDP-305) se están investigando como posibles terapias para las enfermedades colestásicas. Actualmente están en ensayos clínicos en fase II para CBP (44).

##### **b) Análogos FGF-19:**

FGF-19 es una hormona endocrina liberada en el íleon implicada en la regulación del metabolismo de ácidos biliares, lípidos y carbohidratos (45). Como mencioné antes,

la estimulación de la expresión de FGF-19 resulta directamente de la activación de FXR, y conduce a la disminución de CYP7A1. Un análogo sintético de FGF-19, NGM282, ha demostrado disminuir los parámetros bioquímicos de colestasis en un ensayo fase II (46).

### **c) Agonistas PPAR:**

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) son receptores nucleares con tres isoformas:  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . Estas tres isoformas presentan diferentes efectos. PPAR $\alpha$  juega un papel central en el metabolismo lipídico; PPAR $\gamma$  regula la diferenciación de adipocitos, el almacenamiento de ácidos grasos y el metabolismo glucídico; y, PPAR $\delta$  reduce la expresión de mediadores inflamatorios y moléculas de adhesión (47).

Los agonistas de PPARs presentan muchos efectos que podrían ser beneficiosos para las enfermedades colestásicas. Éstos inducen expresión de MDR3 (MDR2 en ratón) promoviendo la excreción de fosfatidilcolina en la bilis y reduciendo así la citotoxicidad de las sales biliares; disminuyen la expresión de los transportadores NTCP y ASBT; y suprimen la transcripción de NF- $\kappa$ B interfiriendo con las vías inflamatorias. Además, la actividad en PPAR $\delta$  activa PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), el cual aumenta la actividad de FXR (48). El bezafibrato (agonista PPAR $\alpha$ - $\gamma$ - $\delta$ ), fenofibrato (agonista PPAR $\alpha$ ), elafibranor (agonista PPAR $\alpha$ - $\gamma$ ) y seladelpar (agonista PPAR $\delta$ ) han mostrado mejoría en la bioquímica hepática y están actualmente en ensayos clínicos fases II-III (49–51).

### **d) Agonistas PXR:**

El receptor de pregnano X (PXR) es un receptor nuclear que regula la expresión de proteínas involucradas en la desintoxicación y el metabolismo de ácidos biliares y otras toxinas. PXR regula la expresión de CYP3A4, que juega un papel importante en la desintoxicación de los ácidos biliares, y disminuye la síntesis de ácidos biliares a través de CYP7A1 (48). Gran cantidad de ligandos endógenos y exógenos activan los PXR incluyendo los esteroides. Por este motivo los glucocorticoides podrían mejorar la bioquímica y la histología hepática pero no se recomiendan por sus efectos secundarios. Sin embargo, la budesonida, un esteroide sintético con un alto metabolismo hepático de primer paso, limita estos efectos secundarios sistémicos. Existen pocos estudios evaluando el uso de budesonida en CBP y no hay datos que sustenten un efecto claro sobre la progresión histológica de la enfermedad (52). En la CEP no se ha encontrado beneficio (53).

## 2.2 PAPEL DE LOS ÁCIDOS BILIARES EN LAS ENFERMEDADES HEPÁTICAS COLESTÁSICAS

La patogenia de la enfermedad hepática colestásica la podemos dividir en dos fases: a) fase inflamatoria temprana, caracterizada por inflamación de conductos biliares, y que es pobre en síntomas pudiendo pasar inadvertida; y, b) fase posterior de hepatotoxicidad por ácidos biliares, que contribuye a la lesión en el parénquima hepático (54). En este apartado trataré los mecanismos de esta segunda fase, la toxicidad de los ácidos biliares.

### 2.2.1 Importancia de los ácidos biliares

Los ácidos biliares son los principales solutos orgánicos de la bilis, y actúan como detergentes para facilitar la absorción intestinal de lípidos y la eliminación del exceso de colesterol y otros compuestos endógenos como la bilirrubina y hormonas. Por otra parte, la bilis es una ruta importante de eliminación de toxinas ambientales, carcinógenos y drogas.

Los ácidos biliares se sintetizan en el hepatocito, a través de una serie de reacciones llevadas a cabo por citocromos P450, siendo la enzima colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1) la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de ácidos biliares. A través de los conductos biliares, son secretados al intestino delgado durante la digestión. Alrededor del 95% de los ácidos biliares son posteriormente reabsorbidos por el epitelio intestinal y, a través de la circulación portal, llegan a los hepatocitos donde son re-conjugados y re-secretados al flujo biliar, completando así la circulación enterohepática (55). Dicha circulación enterohepática está regulada a diferentes niveles. Los receptores nucleares FXR son una parte clave del metabolismo de los ácidos biliares. De hecho, FXR actúa como un sensor de los niveles de ácidos biliares y controla su homeostasis regulando la expresión coordinada de genes claves en su metabolismo y transporte tanto en el hígado como en el intestino (**Fig. 2.1**). En el intestino, la unión de los ácidos biliares a FXR estimula la transcripción y la síntesis de FGF19 (FGF 15 en ratón), que a través de la circulación portal llega al hígado donde se une al fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) inhibiendo la biosíntesis de ácidos biliares mediante la supresión de la expresión de CYP7A1 a través de una vía dependiente de quinasas c-Jun N-terminal (JNKs). A nivel hepático, la activación de FXR por los ácidos biliares induce la transcripción de un receptor nuclear, small heterodimer partner (SHP), el cual produce la supresión transcripcional del gen CYP7A1 disminuyendo así la biosíntesis de ácidos biliares (48). Finalmente, los ácidos biliares monovalentes se excretan en el canalículo biliar a través de BSEP, mientras que los ácidos biliares divalentes y los conjugados aniónicos se excretan mediante MRP2, y los fosfolípidos por MDR3 (en ratones llamado MDR2); dichos transportadores del canalículo biliar se ven inducidos por FXR. En la colestasis, esta circulación enterohepática es interrumpida y los ácidos biliares se acumulan dentro del hígado. La acumulación de ácidos biliares tóxicos es un evento

importante en la patogenia de la enfermedad colestásica hepática y la principal causa de daño hepático en estas enfermedades (56).

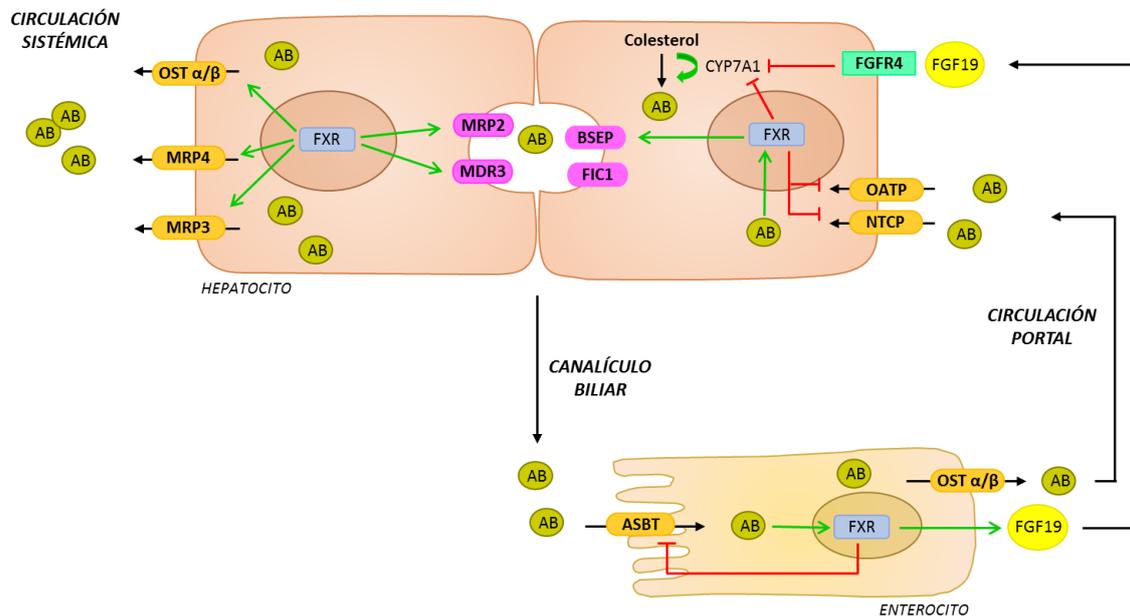


Figura 2.1 Regulación de la circulación enterohepática.

### 2.2.2 Citotoxicidad de los ácidos biliares

Los ácidos biliares son moléculas anfipáticas que se asocian en solución acuosa para formar micelas. Al igual que los detergentes clásicos, los ácidos biliares en forma micelar pueden alterar las membranas celulares. Del mismo modo, los ácidos biliares monoméricos no micelares pueden interactuar con las membranas y las partes hidrofóbicas de las proteínas interfiriendo en su función. Un efecto neutralizante de esta citotoxicidad inherente de los ácidos biliares es su conjugación con fosfolípidos y colesterol, los cuales son liberados a la luz canalicular, formando micelas mixtas y anulando así la acción detergente de estos ácidos (57,58). Pero en la colestasis este efecto se ve sobrepasado.

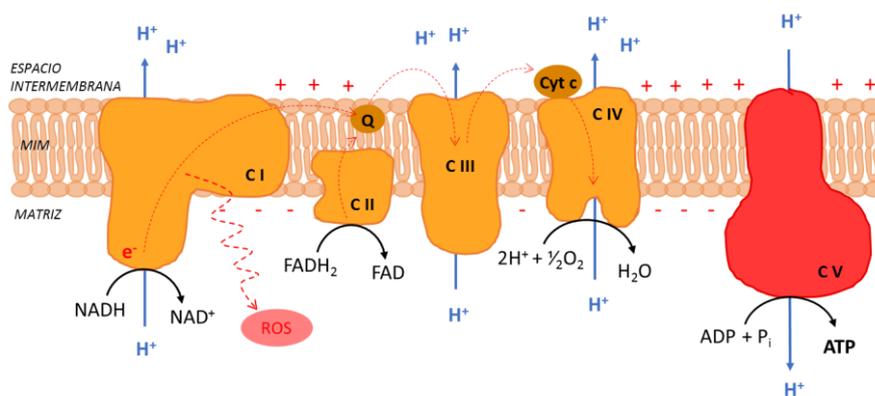
Después de la lesión inmunomediada de los conductos biliares, los ácidos biliares se filtran hacia el estroma circulante. Mientras que los ácidos biliares hidrofóbicos pueden inducir la apoptosis en los hepatocitos, los hidrófilos potencian el adenosín monofosfato cíclico (cAMP) activando así las rutas mitogen-activated protein kinase (MAPK) y phosphoinositide 3-kinase (PI3K) para proteger a los hepatocitos de la muerte celular (59). Particularmente, concentraciones altas de ácidos biliares como litocólico (LCA), desoxicólico (DCA), quenodesoxicólico (CDCA), glicoquenodesoxicólico (GCDCA) y tauroquenodesoxicólico (TCDCA) muestran efectos hepatotóxicos. Este efecto tóxico varía dependiendo de la concentración de ácidos biliares. A partir de experimentos in vitro se puede deducir que los ácidos biliares a concentraciones de 15-25  $\mu\text{M}$  actúan

como moléculas de señalización, a 50-200  $\mu\text{M}$  pueden causar apoptosis, a 200  $\mu\text{M}$  activan genes proinflamatorios, a 200-2000  $\mu\text{M}$  inducen necrosis, y por encima de 2000  $\mu\text{M}$  actúan como detergentes y causan necrosis (60–62). Por lo tanto, la necrosis es el principal mecanismo de muerte celular en la colestasis severa, y la apoptosis en la colestasis más leve.

Aunque se sabe que los ácidos biliares hidrofóbicos inducen lesiones en los hepatocitos, los mecanismos implicados en esta toxicidad no están claros. Diversos estudios indican que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo son los mecanismos principales del daño hepático por colestasis (63–65).

### 2.2.3 Alteración de la función mitocondrial por ácidos biliares

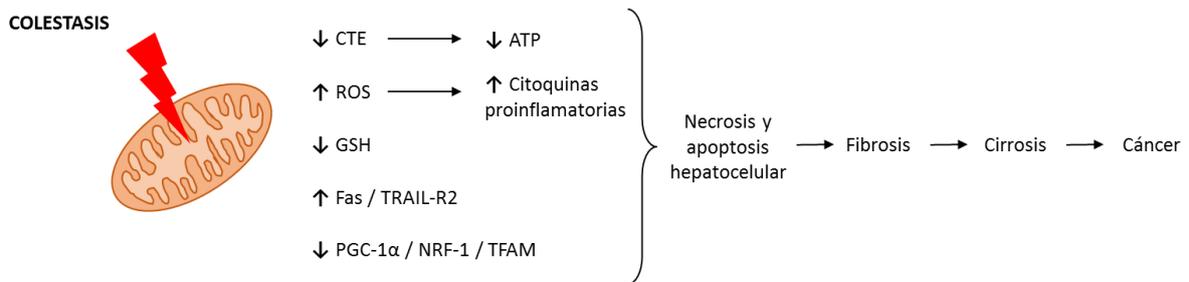
La mitocondria es la principal fuente de energía en los hepatocitos y desempeña un papel importante en el metabolismo oxidativo y el normal funcionamiento del hígado, incluyendo la oxidación de los ácidos grasos, la regulación de la viabilidad celular y la muerte, y la generación de ATP por la fosforilación oxidativa. El ATP producido en las mitocondrias se genera a través de la cadena de transporte de electrones (CTE), que está formada por subunidades de complejos (complejos I, II, III, IV y V -complejo ATP sintasa-) (Fig. 2.2). El transporte de electrones por los diferentes complejos y la generación del potencial de membrana mitocondrial son claves para la síntesis de ATP por la mitocondrial. Algunos electrones pueden escapar en este paso entre complejos y conducir a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como un subproducto. Los complejos I, III y IV de la CTE pueden asociarse dando lugar a supercomplejos respiratorios con una actividad intensificada del complejo I y un menor riesgo de pérdida de electrones y, por lo tanto, una menor producción ROS.



**Figura 2.3** Cadena de transporte de electrones mitocondrial. Se encuentra en la membrana interna mitocondrial y está formada por cinco complejos multienzimáticos y dos transportadores de electrones móviles (coenzima Q y citocromo C). El transporte de electrones genera energía que es utilizada para transportar protones de la matriz al espacio intermembrana, dando lugar a un gradiente de protones que es utilizado por el complejo V para generar ATP. Los electrones finalmente son aceptados por el oxígeno, que se combina con protones para formar agua.

Alteraciones en la función mitocondrial se han documentado en una gran variedad de enfermedades hepáticas como el daño hepático inducido por drogas (DILI) (66), la enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD) (67), la enfermedad hepática alcohólica (68) y las enfermedades hepáticas colestásicas (69). En cuanto a la colestasis hepática, varios estudios han demostrado que las mitocondrias son organelas relevantes en su fisiopatología, participando en varios pasos de la progresión de esta patología hepática (70–72). Se ha observado una reducción en la función mitocondrial general durante la colestasis experimental, lo que se asocia con una disminución del metabolismo oxidativo y de la síntesis de ATP y sobreproducción de ROS.

Los mecanismos específicos implicados en el inicio y desarrollo de la disfunción mitocondrial por la acumulación de ácidos biliares aún son controvertidos. A continuación, comentaré los principales mecanismos por los cuales los ácidos biliares causan disfunción mitocondrial (**Fig 2.3**).



**Figura 2.3** Mecanismos de disfunción mitocondrial en la colestasis.

### 2.2.3.1 Alteración de la actividad de la cadena de transporte de electrones

La acumulación de ácidos biliares afecta negativamente a la función mitocondrial al afectar directamente a la actividad de los diferentes complejos enzimáticos de la CTE. La actividad del complejo I y III en mitocondrias aisladas de ratas se vieron afectadas en presencia de menos de 100  $\mu$ M de DCA, CDCA o LCA, y el complejo IV también se inhibió por ácidos biliares pero con mayores concentraciones (63). También varios estudios han mostrado un descenso en el consumo de oxígeno y en la síntesis de ATP, parámetros respiratorios mitocondriales, en respuesta a la obstrucción biliar (73,74). Por el contrario, otro estudio no mostró cambios en la actividad del complejo IV y V en colestasis frente a ratas control (75). La inhibición de complejos de la CTE supondría, además de la depleción de ATP, la formación de radicales superóxidos y otros ROS debido a la fuga de electrones de la cadena.

### 2.2.3.2 Despolarización de la membrana mitocondrial

Parte de los efectos adversos de los ácidos biliares en la mitocondria pueden deberse a la perturbación de la composición de la membrana mitocondrial consecuencia

de su hidrofobicidad; de hecho, se ha observado que CDCA y LCA pueden incorporarse en la membrana mitocondrial y reducir su contenido en fosfolípidos alterando así su permeabilidad y el potencial de membrana (63). Además, se ha demostrado que CDCA produce directamente la apertura de poros de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP, mitochondrial permeability transition pore) lo que conlleva a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la reducción de la fosforilación oxidativa, la generación de ROS, y la liberación de factores proapoptóticos al citosol (76). Otros ácidos biliares hidrofóbicos son igualmente capaces de causar MPTP y despolarización de membrana mitocondrial en mitocondrias aisladas (64). Se crea así un vínculo directo entre los ácidos biliares y la apoptosis mediada por mitocondrias.

### **2.2.3.3 Disminución de la defensa antioxidante**

Acabamos de ver cómo los ácidos biliares promueven la generación de ROS a través de su efecto sobre los complejos de la CTE y la permeabilidad de la membrana mitocondrial, pero además los ácidos biliares estimulan el daño oxidativo al mermar las defensas antioxidantes.

El estrés oxidativo es el desequilibrio entre los agentes oxidantes y los agentes antioxidantes a favor de los formadores. El glutatión (GSH) es uno de los agentes antioxidantes más importantes que además de proteger frente al estrés oxidativo, regula la muerte celular y las respuestas inflamatorias y fibróticas (77). Se ha demostrado que la expresión hepática de enzimas de la biosíntesis del GSH y los niveles de GSH están disminuidos en ratones con ligadura del conducto biliar (78,79), lo que parece deberse a la inducción de proteínas Maf por ácidos biliares tóxicos que desplazan al factor de transcripción nuclear que regula la expresión de genes de las enzimas de biosíntesis del GSH, el factor nuclear erythroid derived 2 like 2 (Nrf2) (79).

### **2.2.3.4 Estimulación de receptores de muerte**

Una característica del daño hepático por colestasis es la apoptosis de hepatocitos y colangiocitos. Durante la progresión de la colestasis, probablemente múltiples mecanismos de apoptosis estén actuando de forma sincrónica para promover la muerte celular en el parénquima hepático. Altas concentraciones de ácidos biliares tóxicos en el hígado pueden inducir diversos mecanismos de necrosis y apoptosis tanto por su acción detergente, ya mencionado anteriormente, como con independencia a ella.

Los ácidos biliares son inductores directos de la apoptosis en hepatocitos a través de la activación de los receptores de muerte Fas y TRAIL-R2/DR5. Los ácidos biliares estimulan la expresión de Fas y TRAIL-R2 y su oligomerización independientemente de sus ligandos, provocando la activación de proteasas. Además, el aumento de expresión de Fas y TRAIL-R2 sensibiliza al hepatocito a sus ligandos, Fas-L y TRAIL (80,81). Otro mecanismo de apoptosis más allá de la lesión mediada por ácidos biliares es la sobreexpresión de TNF $\alpha$ , inducida por el estrés oxidativo, y su interconexión con los receptores TNFR1 y TNFR2 para activar la vía de las caspasas (82).

### 2.2.3.5 Alteración de la biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial implica la síntesis, importación e incorporación de proteínas y lípidos a las mitocondrias existentes, así como la replicación del ADN mitocondrial (ADNmt). Este proceso requiere una interacción compleja entre el genoma nuclear y el mitocondrial. Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1  $\alpha$ ) es uno de los reguladores clave del metabolismo energético celular que estimula la biogénesis mitocondrial a través de la activación del nuclear respiratory factor 1 (NRF-1). PGC-1  $\alpha$  y NRF-1 son los principales factores transcripcionales que regulan la expresión coordinada de proteínas mitocondriales codificadas en el ADN nuclear, tal como el mitochondrial transcription factor A (TFAM). TFAM es responsable del mantenimiento del número de copias del ADNmt y activa y regula la transcripción y replicación del ADNmt. Por lo tanto, la deficiencia energética debería activar la biogénesis mitocondrial a través de PGC-1  $\alpha$  y NRF-1.

En estudios con modelos animales de daño hepático por colestasis se ha observado un descenso en la biogénesis mitocondrial (71). PGC-1  $\alpha$  y NRF-1 descendieron en ratas con ligadura del conducto biliar y NRF-1 no se activó transcripcionalmente. En este mismo estudio los niveles de TFAM aumentaron transitoriamente en fases iniciales para descender posteriormente de manera marcada (72).

### 2.2.4 Estrés oxidativo en la colestasis

El estrés oxidativo es una característica común de la colestasis obstructiva y la colangitis biliar primaria, y se ha relacionado con la progresión de la lesión hepática por colestasis (83,84). Dado que la mitocondria es el lugar principal de formación de ROS en la célula y tras mencionar diferentes mecanismos por los cuales los ácidos biliares causan disfunción mitocondrial, podemos decir que las alteraciones oxidativas hepáticas durante la colestasis dependen estrechamente de la propia colestasis como consecuencia de la acumulación tóxica de ácidos biliares hidrofóbicos.

Durante la fosforilación oxidativa, algunos electrones pueden escapar en el paso entre complejos y conducir a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como un subproducto. Aunque la mayoría de estos electrones migran a la citocromo c oxidasa (complejo IV) donde reaccionan con protones y oxígeno para formar agua, algunos de estos electrones reaccionan directamente con el oxígeno para formar el radical anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y otros ROS. Ante la alteración de la función mitocondrial y la disminución de la defensa antioxidante se produce un aumento de ROS, los cuales dañan el ADN mitocondrial, proteínas y lípidos. Los ROS también son moléculas transductoras de señales en condiciones fisiológicas y patológicas, dependiendo de la intensidad y duración del estrés oxidativo. La producción de ROS en baja cantidad es importante para la adaptación metabólica, pero una mayor

producción induce la expresión y síntesis de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y la interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) causando apoptosis y necrosis de los hepatocitos, y activa vías de señalización de muerte (82,85). La liberación de TNF $\alpha$  mediada por ROS en hepatocitos y células de Kupffer puede inhibir complejos de la CTE y causar MPTP desacoplando la CTE de la fosforilación oxidativa (86), lo que hace aumentar aún más la producción de ROS creando así un círculo vicioso. Además, el ROS derivado de la mitocondria activa JNK, una proteína quinasa activada por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinases -MAPK-) cuyo sustrato fosforilado regula la expresión de genes relevantes en diversas rutas metabólicas y activa o inhibe directamente proteínas como proteínas quinasas. En el hígado, el JNK fosforilado (p-JNK) se traslada a la mitocondria donde se une a proteínas de la membrana mitocondrial para alterar la CTE, aumentando así la formación de ROS (87).

Las mitocondrias dañadas y la necrosis resultante de los hepatocitos dan lugar a patrones moleculares asociados al daño (DAMPs -damage associated molecular patterns), que se unen a receptores de reconocimiento de patrones como los Toll-like receptors (TLRs), estimulando así la respuesta inmune innata dando lugar a la expresión de citoquinas y quimiocinas que atraen células inflamatorias y activan células estrelladas promoviendo la inflamación crónica del hígado y la fibrogénesis (88). Por tanto, el desequilibrio energético y la producción de ROS debido a esta disfunción mitocondrial contribuyen en gran medida a la inflamación, así como a la fibrogénesis hepática y la carcinogénesis (89,90).

### 2.3 METHYLATION-CONTROLLED J PROTEIN (MCJ)

Methylation-controlled J protein (MCJ), también llamada DnaJC15, es una pequeña proteína perteneciente a la familia de cochaperonas DnaJ. A diferencia de otras proteínas DnaJ, MCJ no es soluble dado que contiene un dominio transmembrana y está localizada en la membrana interna mitocondrial. Mediante Western Blot en ratones se detectó la proteína MCJ en corazón, hígado y riñón especialmente, y también fue abundante en células de la inmunidad, concretamente en linfocitos CD8 y macrófagos. La distribución de la expresión de MCJ en tejidos humanos normales sigue siendo desconocida, aunque un análisis con Northern Blot de tejido humano no maligno mostró una distribución de la expresión del gen mcj humano similar a la del gen en ratón, es decir, abundante en corazón seguido de hígado y riñón (91). Su ausencia ha demostrado un aumento en la actividad del Complejo I de la CTE, del potencial de membrana mitocondrial y la respiración mitocondrial, sin aumentar la producción de ROS consecuencia a la mayor formación de supercomplejos respiratorios. Bajo condiciones fisiológicas, la pérdida de expresión de MCJ en ratones no afectó a su supervivencia ni causó alteraciones en su fenotipo. Sin embargo, en condiciones metabólicas alteradas, la deficiencia de MCJ impide la acumulación de productos tóxicos a nivel hepático, lo

que sugiere que podría modular la lesión hepática ante determinados hepatotóxicos (91).

Como ya mencioné anteriormente, la mitocondria es la principal organela generadora de ATP a través de la fosforilación oxidativa dentro de la cadena respiratoria. La respiración mitocondrial es regulada de acuerdo a las necesidades metabólicas de las células y puede ser modulada en respuesta a cambios metabólicos agudos o crónicos, pero poco se conoce acerca de los mecanismos que regulan este proceso. Varias proteínas han demostrado asociación y contribución a la actividad de diversos complejos de la CTE como por ejemplo GRIM-19, Rcf1 y STAT3 (92–94); menos se sabe sobre la presencia de mecanismos inhibitorios. Un regulador negativo del potencial de membrana mitocondrial y la producción de ATP recientemente identificado es MCJ. Se ha demostrado que uno de los mecanismos por el cual MCJ mantiene baja la respiración mitocondrial es a través de la regulación negativa del complejo I de la CTE, y que su ausencia, además de aumentar la actividad de este complejo, favorece la formación de supercomplejos respiratorios facilitando la transferencia de electrones entre complejos y minimizando el riesgo de liberación de éstos lo que conduce a una menor generación de ROS (91).

Varios estudios han mostrado que la presencia de altos niveles de metilación del gen *mcj*, asociado con pérdida de expresión, se correlaciona con menor respuesta a quimioterapia y pobre supervivencia en diversos tumores (95–98). Por otro lado, se ha observado que ratones WT tras un ayuno de 36 horas mostraron esteatosis hepática en comparación con ratones MCJ-KO que no la mostraron. El ayuno provoca drásticos cambios metabólicos mediante la activación de la hidrólisis de triglicéridos almacenados en el tejido adiposo, dando lugar a ácidos grasos libres que se movilizan y son transportados al hígado donde se someten a la oxidación mitocondrial. Esto indica que una oxidación mitocondrial sostenida de ácidos grasos libres en ratones MCJ-KO conduce a un rápido metabolismo de lípidos minimizando su acumulación a nivel hepático (91). Por lo tanto, en condiciones fisiológicas (dieta normal) MCJ parece ser prescindible, pero en respuesta al ayuno, la pérdida de MCJ facilita el metabolismo lipídico en el hígado consistente con su efecto negativo sobre la función mitocondrial. Además, se ha observado una mayor acumulación de colesterol en hígado en ratones WT que en ratones MCJ-KO tras una dieta rica en colesterol durante 4 semanas (91). Es decir, esto demuestra que ante la ausencia de la función reguladora negativa de MCJ en la mitocondria hay un mejor metabolismo de lípidos en el hígado que minimiza la acumulación patológica de éstos en respuesta a dos dietas alteradas, el ayuno y una dieta con alto contenido en colesterol.

También se ha investigado el papel de MCJ en el sistema inmune, demostrándose que MCJ está altamente expresado en células T CD8 y en menor medida en macrófagos, no estando presente en células T CD4 y células B (91). En los macrófagos, el regulador transcripcional Ikaros media su silenciamiento independientemente de la metilación del ADN (99). En este sentido, se ha publicado que las células T CD8 que carecen de MCJ

proporcionan una protección superior frente a la infección por el virus de la gripe debido a un aumento de la fosforilación oxidativa y producción de ATP que incrementa la secreción, pero no expresión, de interferón- $\gamma$  (100). Además, se ha observado que MCJ es esencial para la producción de TNF $\alpha$  por macrófagos en respuesta a una variedad de ligandos de los receptores Toll-like (TLRs). En particular, ratones deficientes en MCJ han mostrado resistencia al desarrollo de daño hepático fulminante ante la administración de lipopolisacárido (LPS) (101).

En nuestro grupo de investigación hemos estudiado el papel de esta proteína en dos patologías hepáticas de gran relevancia, el DILI (*drug-induced liver injury*) y NAFLD (*non-alcoholic fatty liver disease*). El acetaminofén (APAP, paracetamol) es la droga que con mayor frecuencia causa DILI, representando la principal causa de fallo hepático agudo en Estados Unidos y en la mayoría de los países europeos ya que su único antídoto disponible actualmente es el N-acetilcisteína, cuya eficacia se limita a las primeras 8 horas de la ingestión de APAP. En el estudio en modelos animales de daño hepático por APAP hemos observado que este tóxico interfiere con la formación de supercomplejos respiratorios mitocondrial a través de la proteína MCJ, conduciendo a un descenso en la producción de ATP e incremento en la generación de ROS, y que el tratamiento *in vivo* con un inhibidor de la expresión de MCJ a nivel hepático (siRNA específico) protege al hígado del daño provocado por APAP. Además, hemos observado un aumento marcado de los niveles de MCJ en el tejido hepático de pacientes diagnosticados de DILI en comparación con el tejido hepático de sujetos sanos (102). En cuanto a NAFLD, considerada actualmente como la primera causa de hepatopatía en el mundo occidental y de patogenia desconocida en gran parte, hemos apreciado una expresión aumentada de MCJ en el tejido hepático de ratones alimentados con una dieta deficiente en metionina-colina (modelo bien establecido de esteatohepatitis no alcohólica que desarrolla esteatosis, inflamación y fibrosis al producir una alteración de la beta-oxidación de los ácidos grasos y producción de ROS) y en las biopsias hepáticas de pacientes diagnosticados NAFLD. También hemos observado que el silenciamiento de MCJ protege frente a la acumulación de lípidos, la muerte celular y la inflamación en este modelo animal ya que la pérdida de MCJ potencia la beta-oxidación de los ácidos grasos y la glicolisis, combustibles ambos para el ciclo de Krebs y la respiración mitocondrial, consiguiendo así mantener la función mitocondrial y la producción de ATP. Por lo tanto, MCJ se establece como un regulador clave del desarrollo de DILI y NAFLD y potencial diana terapéutica en estas patologías.

Todos estos hallazgos muestran el importante papel de MCJ como regulador negativo esencial del metabolismo mitocondrial y proporcionan nuevas bases para el estudio y descubrimiento de nuevos mecanismos reguladores de las enfermedades hepáticas.

## 2.4 LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR, MODELO ANIMAL DE COLESTASIS OBSTRUCTIVA

Existen diferentes modelos animales de enfermedad hepática colestásica bien establecidos con los que estudiar nuevas vías patogénicas y probar nuevas estrategias terapéuticas. Entre los animales, son los ratones lo que han despertado más interés debido a su pequeño tamaño, vida corta, corto periodo de gestación y fácil cuidado (103). Además, la similitud genética con nosotros, junto con la posibilidad de la manipulación genética, nos brinda la posibilidad de estudiar la implicación de genes específicos y vías de señalización con las que identificar potenciales dianas terapéuticas (104). Por el contrario, existen múltiples diferencias entre humanos y ratones, incluida la morfología hepática, variaciones en las respuestas a agentes nocivos y tiempo de respuesta, por lo que ningún modelo murino puede reproducir estrictamente todas las características de las enfermedades hepáticas colestásicas del hombre.

La ligadura del conducto biliar (LCB) es el modelo experimental de colestasis más comúnmente empleado debido en parte a su alta reproducibilidad (105). Se han descrito diferentes técnicas quirúrgicas que permiten la reanastomosis después de la LCB, por ejemplo, la LCB parcial u otros métodos microquirúrgicos. Sin embargo, el modelo más usado es la obstrucción completa del conducto biliar común puesto que las técnicas basadas en una LCB parcial producen una menor necrosis consecuencia de la proliferación hepatocitaria (106). La LCB completa induce una fuerte respuesta fibrótica a los 21-28 días. Esta técnica requiere una laparotomía media y el aislamiento del conducto biliar común por encima del duodeno, posteriormente se realiza doble ligadura de este conducto y la disección entre las ligaduras, lo que genera un modelo de colestasis obstructiva (105).

Los cambios morfológicos inducidos por la LCB son comparables a los observados en la colangitis biliar en humanos. Tras la LCB, rápidamente se acumulan los ácidos biliares en el hígado produciendo una necrosis hepatocelular significativa e inflamación (infiltración de leucocitos y macrófagos) dentro de las primeras 24 horas post-LCB (107). La evidencia hasta ahora indica que el daño hepático tras la LCB implica principalmente la muerte celular por necrosis, a diferencia de lo que ocurre en los modelos in vitro donde las altas concentraciones de ácidos biliares hidrofóbicos en hepatocitos de ratón cultivados causan la muerte celular por apoptosis (108,109). Esto parece deberse a que los ácidos biliares hepatotóxicos en la LCB no alcanzan concentraciones suficientemente altas en el hígado como para activar las vías pro-apoptóticas, sino que desencadenan una respuesta inflamatoria y la muerte celular a través del estrés oxidativo (110).

Al igual que en los humanos, esta respuesta inflamatoria conduce a la activación de células estrelladas hepáticas y al depósito de matriz extracelular con el establecimiento de fibrosis biliar (111). Sin embargo, existen claras diferencias con la patología colestásica humana. El rápido desarrollo de cirrosis hepática tras sólo 30 días está en desacuerdo con la lenta progresión de la mayoría de las enfermedades hepáticas

crónicas. Además, este modelo reproduce lesiones biliares obstructivas agudas que raramente aparecen en la patología crónica humana (105,112,113). Finalmente, hay que tener en cuenta la mortalidad debido a la fuga biliar, ruptura de la vesícula biliar, otras complicaciones infecciosas o vasculares que pueden ocurrir al realizar el procedimiento quirúrgico (105). A pesar de todo esto, la LCB sigue siendo un excelente modelo animal para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a los eventos patológicos causados por un flujo biliar incorrecto.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---



### 3.1 HIPÓTESIS

Factores genéticos, ambientales y endógenos pueden contribuir al desarrollo de enfermedades hepáticas colestásicas crónicas, pero la patogenia exacta de CBP y CEP no está aclarada, de ahí que los tratamientos disponibles en la actualidad para estas patologías en muchas ocasiones son ineficaces o no son suficientes para detener y/o revertir la progresión de la enfermedad hepática. En los últimos años el papel de la mitocondria en el daño hepático se ha empezado a considerar como un mecanismo patogénico importante detectándose alteraciones en su función en gran variedad de enfermedades hepáticas agudas y crónicas, entre ellas la enfermedad hepática colestásica, y es que los ácidos biliares son citotóxicos puesto que son capaces de emulsionar membranas lipídicas y entre ellas la membrana mitocondrial.

La mitocondria es la principal fuente de energía en los hepatocitos y desempeña un papel importante en el metabolismo oxidativo y el normal funcionamiento del hígado, incluyendo la oxidación de los ácidos grasos, la regulación de la viabilidad celular y la muerte, y la generación de ATP por la fosforilación oxidativa. El transporte de electrones por los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y la generación del potencial de membrana mitocondrial son claves para la síntesis de ATP. Por lo tanto, alteraciones en la función mitocondrial van a conducir a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el hepatocito y a la disminución de ATP, y finalmente a la muerte del hepatocito. Esto nos hace pensar que es posible que restaurando la actividad de dicha cadena respiratoria en diversas patologías hepáticas se consiga mitigar el estrés oxidativo y, por ende, la muerte celular, la inflamación y la fibrosis hepática. Dicha actividad de la cadena respiratoria se ha visto intensificada ante la pérdida de una proteína mitocondrial, MCJ, puesto que regula negativamente el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Además, la ausencia de esta proteína favorecería la formación de supercomplejos respiratorios facilitando la transferencia de electrones y minimizando el riesgo de liberación de éstos lo que conduciría a una menor generación de ROS.

### 3.2 OBJETIVOS

MCJ es una proteína localizada en la membrana interna mitocondrial que actúa como un regulador negativo de la cadena respiratoria mitocondrial, por lo que su deficiencia o inhibición podría mitigar el estrés oxidativo causado por la colestasis.

Por tanto, los objetivos de este proyecto son:

1. Estudiar el papel de MCJ en la patogenia de las enfermedades colestásicas.
2. Investigar el efecto que tiene la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial por MCJ en los modelos animales de enfermedad colestásica.
3. Evaluar si tras producirse daño hepático la atenuación de la expresión génica de MCJ a nivel hepático en ratones disminuye dicho daño.
4. Establecer, en función de los hallazgos anteriores, un posible marcador de daño y progresión de enfermedad hepática, así como una posible diana terapéutica en la enfermedad colestásica primaria.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

---



## **4.1 MUESTRAS HUMANAS**

El estudio se desarrolló conforme a las guías éticas de la declaración de Helsinki y tras la aprobación del Comité Ético de Cantabria (CEIC). Todos los sujetos firmaron un consentimiento informado previo a su inclusión en el estudio.

### **4.1.1 Enfermedad hepática colestásica primaria en adultos**

Para el estudio se recopilaron de forma retrospectiva 54 muestras de suero de pacientes con CBP y 37 biopsias hepáticas de pacientes con CBP o CEP (35 pacientes con CBP y 2 con CEP).

Todos los pacientes de ambas cohortes disponían de una biopsia hepática que confirmaba su diagnóstico y clasificaba su enfermedad en cuatro estadios (estadio I-IV) en función del daño del conducto biliar, la inflamación y fibrosis. Fueron excluidos aquellos pacientes con antecedentes de hepatitis crónica víricas, autoinmunes, trastornos del metabolismo del hierro, enfermedad de Wilson, déficit de alfa-1 antitripsina y hepatotoxicidad mediada por drogas.

De estos pacientes se recopiló diferentes datos clínicos (edad, sexo, comorbilidades, tratamiento médico), analíticos (enzimas hepáticas, bilirrubina, albúmina, colesterol, triglicéridos, ferritina, calcio, plaquetas, actividad de protrombina, inmunoglobulinas, autoanticuerpos) e histológicos (afectación biliar, inflamación y fibrosis), y se realizó un seguimiento retrospectivo hasta la actualidad. Los pacientes fueron clasificados según la histología en enfermedad inicial (estadio I-II) y enfermedad avanzada (estadio III-IV).

### **4.1.2 Controles sanos**

Se emplearon como controles 30 biopsias hepáticas de donantes de hígado del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla cuya histología hepática fue normal, y 10 muestras de suero de sujetos procedentes del Biobanco Valdecilla-IDIVAL. Todos los sujetos presentaban unas enzimas hepáticas normales y ausencia de infección por virus hepatitis B o C o VIH.

### 4.1.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Se realiza el “cotting” con 100 µl del antígeno MCJ (péptido sintético de MCJ de la parte extracelular, proporcionado por la Dra. Mercedes Rincón -University of Vermont College of Medicine, Burlington, USA-) a una concentración de 5ng/ml en la placa de ELISA de 96 pocillos de poliestireno de fondo plano (Thermo Scientific) durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se lava la placa tres veces con PBS 1X y a continuación se realiza el bloqueo con 250 µl PBS-2% BSA (albúmina sérica bovina) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras ese periodo de tiempo, se desecha la solución de bloqueo y se añaden 100 µl de los sueros de los pacientes con CBP a una dilución 1/25. Se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente y transcurrido el tiempo se lava la placa posteriormente tres veces con PBS 1X. Seguidamente se añaden 100 µl del anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG humana conjugado a fosfatasa alcalina (Dako, Glostrup, Dinamarca). Tras 1 hora de incubación, se lava la placa tres veces con PBS 1X y se añade el sustrato de fosfatasa alcalina, incubándose en oscuridad durante 4 horas, con lecturas seriadas cada 4 horas.

Los resultados se obtienen en unidades de densidad óptica a 405 nm de longitud de onda y se expresan de forma cualitativa como positivos o negativos respecto al punto de corte obtenido con la lectura media + 3 desviaciones estándar de 10 sueros de sujetos controles sanos.

## 4.2 MODELO ANIMAL

Los procedimientos experimentales en animales se desarrollaron en el Centro de Cooperación en Biociencias (CIC bioGUNE) en Vizcaya, y fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales del CIC bioGUNE y la autoridad local (Diputación de Vizcaya) de acuerdo con los criterios establecidos por la Unión Europea. Los ratones fueron alojados en una instalación acreditada por la Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC).

Se recogió el tejido hepático y muestras séricas que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis. Los animales empleados para la experimentación fueron ratones MCJ-KO y WT (C57BL/6J).

El modelo animal de colestasis empleado fue la ligadura del conducto biliar (LCB). Los ratones WT y MCJ-KO se sometieron a LCB bajo anestesia con isoflurano (1,5% de isoflurano en oxígeno). Dicho procedimiento se lleva a cabo mediante laparotomía, identificándose el conducto biliar común y separándolo cuidadosamente de la vena porta y arteria hepática para, posteriormente, colocar una sutura alrededor de del conducto biliar. Finalmente se procede al cierre de la pared abdominal mediante grapas.

#### 4.2.1 Silenciamiento de MCJ in vivo

Ratones WT de tres meses de edad recibieron por inyección en la vena de la cola 150  $\mu$ l de una solución 0,4  $\mu$ g/ $\mu$ l de control (SiControl) o del ARN de silenciamiento (*small interfering RNA*) específico de MCJ (SiMCJ) (cuya secuencia se muestra en la **tabla 4.1**) a los 3 días de la LCB y repitiendo a los 5 días usando el reactivo InvivoFectamine 3.0<sup>®</sup> (Invitrogen). Los ratones fueron sacrificados a los 7 días de la LCB y sus hígados se dividieron en varias piezas, algunas de las cuales fueron congeladas rápidamente para la posterior extracción de ARN y proteína, y otras se fijaron con formalina para el estudio histológico e inmunohistoquímico. Además, se recogieron muestras de sangre.

**Tabla 4.1** Secuencia siRNA utilizada para el silenciamiento

Nombre del gen	Especie	Secuencia	
SiMCJ	<i>Mus musculus</i>	Sense	5'-AAGCGAGAGGCUAGUCUUATT-3'
		Antisense	5'-UAAGACUAGCCUCUCGCUUAC-3'
SiControl	<i>Mus musculus</i>	Sense	5'-AAUUCUCCGAACGUGUCACGU-3'
		Antisense	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAUU-3'

### 4.3 EXPERIMENTACIÓN EN CÉLULAS HEPÁTICAS

#### 4.3.1 Aislamiento y cultivo de hepatocitos primarios de ratón

Todos los ratones utilizados para el aislamiento de hepatocitos primarios tenían 3 meses de edad. La obtención de hepatocitos primarios de ratones WT y MCJ-KO se realizó mediante digestión enzimática con colagenasa (Worthington). A los ratones bajo anestesia con isoflurano (1,5% isoflurano en oxígeno) se les realiza una laparotomía y se inserta un catéter en la vena porta. Se perfunde el hígado con buffer A (PBS 1X, 5 mM EGTA) oxigenado a 37°C y se secciona la vena porta. Posteriormente, se perfunde con buffer B (PBS 1X, 1mM CaCl<sub>2</sub>, colagenasa [Worthington]) oxigenado a 37°C. Tras la perfusión, el hígado se coloca en una placa Petri que contiene buffer C (PBS 1X, 2mM CaCl<sub>2</sub>, albúmina de suero bovino -BSA- al 0,6%) y se disgrega con fórceps. El hígado digerido se filtra a través de una gasa estéril, se recogen los hepatocitos y se lavan dos veces con buffer C (3 minutos a 300 rpm y a 4°C). El sobrenadante se deshecha y los hepatocitos se resuspenden en Minimun Essential Medium (MEM; Gibco) con 10% de suero bovino fetal (FBS) conteniendo penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 U/ml) y glutamina (2 mM) (PSG; Invitrogen). La viabilidad celular se valoró mediante la prueba de exclusión con azul tripán, considerando para los experimentos una viabilidad de más del 80%.

Los hepatocitos aislados se cultivan sobre placas de cultivo recubiertas de colágeno a una densidad de 7600 células/mm<sup>2</sup> en MEM al 10% FBS suplementado con

PSG al 1%, y se mantienen a 37°C en una incubadora de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Tras 2 horas de incubación, se retira el medio y se reemplaza por MEM al 0 o 5% de FBS. Se realizan los diferentes experimentos después de 2 horas adicionales de incubación o la incubación durante la noche.

#### **4.3.2 Silenciamiento de MCJ in vitro**

Los hepatocitos primarios fueron transfectados con el plásmido ShRNA específico de MCJ para el silenciamiento del gen *mcj* usando el reactivo jetPRIME® (Polyplus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El vector pCAGGS (Addgene, Cambridge, MA) se utilizó para clonar la secuencia diana frente a MCJ de ratón bajo la influencia del promotor H1.

Se diluyen 5 ul de jetPRIME y 10 ul de ShRNA 20 uM por separado en 200 ul del jetPRIME buffer, se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se mezclan ambas diluciones. La mezcla se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos shRNA-jetPRIME. Para cada transfección se añaden 200 ul de la mezcla a placas de cultivo de 60 mm que contienen 500.000 células en 2 ml de MEM al 10% con FBS suplementado con 1% de PSG. La concentración final del shRNA es de 100 nM. La mezcla se deja durante 7 horas y posteriormente se reemplaza por MEM al 0% de FBS y 1% de PSG. Finalmente se realizan los diferentes tratamientos celulares.

#### **4.3.3 Sobreexpresión de MCJ**

Hepatocitos primarios fueron transfectados con un plásmido de ADNc para producir la expresión génica, concretamente con HA-MCJ (suministrado por el Dr. Juan Anguita), usando el reactivo jetPRIME® (Polyplus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y como se describió anteriormente.

#### **4.3.4 Tratamiento con ácido desoxicólico (deoxycholic acid -DCA-)**

Tanto hepatocitos primarios provenientes de ratones WT y MCJ-KO como hepatocitos transfectados con ShMCJ y HA-MCJ, fueron tratados con un ácido biliar, el ácido desoxicólico (DCA).

En placas de 6 pocillos se sembraron 500.000 hepatocitos y se cultivaron durante la noche en MEM al 0% de FBS y 1% de PSG para iniciar el tratamiento con DCA al día siguiente. La dosis administrada de DCA (Sigma) fue de 100 uM usando como vehículo

etanol. Se recogieron los hepatocitos a diferentes tiempos de tratamiento (15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas y 6 horas de añadir el DCA).

## 4.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y ANÁLISIS

### 4.4.1 Extracción de proteínas totales

Las células fueron lavados dos veces con PBS y homogeneizadas en buffer de lisis (1,6mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,4mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1% Triton X-100, 0,1M NaCl, 0,1% SDS, 0,5% azida sódico) suplementado con proteasa y un cóctel inhibidor de fosfatasa (Roche). En el caso del tejido hepático, éste debe ser homogeneizado primero con el fin de separar el contenido celular del tejido conectivo, para ello utilizamos el homogeneizador Precellys®, donde introducimos aproximadamente 50 ug de tejido hepático congelado junto con 1 ml de buffer de lisis. Una vez con el buffer de lisis y homogeneizados tanto las células como el tejido hepático, se procedió a centrifugar a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante, que corresponde con el extracto proteína, y se cuantificó el contenido proteico mediante la técnica de Bradford (BIO RAD protein assay) o por el método del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce).

### 4.4.2 Western blotting

El extracto de proteínas se calentó a 95°C durante 5 minutos tras añadir el buffer de carga (500mM β-mercaptoetanol, 10% SDS). La cantidad apropiada de proteína (5 a 30ug), de acuerdo con la abundancia específica de proteína y la sensibilidad del anticuerpo, se separó mediante electroforesis con dodecilsulfato sódico en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), cuyo porcentaje de acrilamida dependió del peso molecular de la proteína de interés. Para la electroforesis se empleó el sistema Mini-PROTEAN (BIO RAD). Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa por electrotransferencia usando Mini Trans-Blot cell (BIO RAD). Las membranas se bloquearon con leche en polvo descremada al 5% en TBS a pH 8 conteniendo 0,1% Tween-20 (TBST-0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con TBST-0,1% y se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios de interés. Los anticuerpos empleados junto con las condiciones óptimas de incubación se detallan en la [Tabla 4.2](#). Posteriormente, se lavaron tres veces las membranas con TBST-0,1% y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con la solución de bloqueo que contenía el anticuerpo secundario.

Para la detección de nuestra proteína de interés se utilizó el sustrato quimioluminiscente Enhanced chemiluminescence (ECL, Perkin Elmer) cuya señal se

capturó en películas fotográficas (Amersham) en el revelador Curix 60 (AGFA). Las bandas fueron cuantificadas por densitometría utilizando el software de procesamiento de imágenes gratuito ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>). El control de carga en cada membrana se realizó utilizando el anticuerpo GAPDH o  $\beta$ -actina.

**Tabla 4.2** Anticuerpos empleados para Western blotting y sus condiciones.

ANTICUERPO	Proveedor	Dilución	Solución de incubación	Nº catálogo
<b>JNK</b>	Cell Signaling	1:1000	TBST 0,1%-leche 5%	9252S
<b>pJNK (Thr183/Tyr185)</b>	Invitrogen	1:1000	TBST 0,1%-leche 5%	44682G
<b>MCJ</b>	Dra. Mercedes Rincon	1:500	TBST 0,1%-leche 5%	-
<b>GAPDH</b>	Abcam	1:5000	TBST 0,1%-leche 5%	ab8245
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Sigma-Aldrich	1:5000	TBST 0,1%-leche 5%	A5441
<b>Tubulina</b>	Sigma-Aldrich	1:5000	TBST 0,1%-leche 5%	T9026
<b>Anti-rabbit IgG, HRP-linked</b>	Cell Signaling	1:5000	TBST 0,1%-leche 5%	7074
<b>Anti-mouse IgG, HRP-linked</b>	Cell Signaling	1:5000	TBST 0,1%-leche 5%	7076

## 4.5 EXTRACCIÓN DE ARN Y PROCESAMIENTO

### 4.5.1 Aislamiento de ARN

El ARN total fue aislado del tejido hepático de ratón y de hepatocitos primarios de ratón cultivados utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN se comprobó mediante espectrofotometría en el Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

#### 4.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

De cada muestra, 2ug del total de ARN fue tratada con DNase I (Invitrogen) y se realizó la transcripción inversa a ADNc utilizando M-MLV Reserve Transcriptase (Invitrogen) en presencia de cebadores (random primers) y RNaseOUT (Invitrogen). Para las qPCRs realizadas en el termociclador iCycler iQ™5 (BIO RAD) con el fluoróforo iQ™ SYBR® Green Super Mix (BIO RAD), se empleó 5ul de ADNc y los cebadores específicos en un volumen total de reacción de 20ul. Para las qPCR realizadas en Vii™ 7 System (Applied Biosystems) con SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems), se empleó 1,5ul de ADNc y los cebadores específicos en un volumen total de reacción de 6,5ul. Todas las reacciones se realizaron por triplicado, y los cebadores fueron diseñados con el software Primer3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y sintetizados por Sigma-Aldrich. Los cebadores usados para cada gen se muestran en la **Tabla 4.3**. Las condiciones de la PCR y de los cebadores fueron optimizados, usando 40 ciclos con una temperatura de fusión (melting temperature) de 60°C. Después de verificar la especificidad de la amplificación con la curva de disociación, los valores cycle threshold (Ct) se extrapolaron a una curva estándar realizada simultáneamente con las muestras, y los datos se normalizaron con la expresión del gen housekeeping (GAPDH y 9S).

**Tabla 4.3** Secuencia de los cebadores empleados en las qPCRs

GEN	Símbolo	Especie		Secuencia
<b>9S ribosomal RNA</b>	9S	Mus musculus	Forward	5'-GACTCCGGAACAAACGTGAGG-3'
			Reverse	5'-CTTCATCTTGCCCTCGTCCA-3'
<b>Bile salt export pump</b>	BSEP	Mus musculus	Forward	5'-ATCGCCGCATGTCACAAGG-3'
			Reverse	5'-CTCCTGTGCTTGGCACATCA-3'
<b>Farnesoid X Receptor</b>	FXR	Mus musculus	Forward	5'-GGCCTCTGGGTACCACTACA-3'
			Reverse	5'-AAGAAACATGGCCTCCACTG-3'
<b>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</b>	GAPDH	Mus musculus	Forward	5'-CGTCCCGTAGACAAAATGG-3'
			Reverse	5'-TTGATGGCAACAATCTCCAC-3'
<b>Interleukin 1β</b>	IL-1β	Mus musculus	Forward	5'-GCCACCTTTTGACAGTGATGAG-3'
			Reverse	5'-GACAGCCCAGGTCAAAGGTT-3'
<b>Interleukin 6</b>	IL-6	Mus musculus	Forward	5'-AAGTGAGCAGATAGCACAGTTGG-3'
			Reverse	5'-GCTATGAAGTTCCTCTCTGCAAGTA-3'
<b>Methylation J-Controlled</b>	MCJ	Mus musculus	Forward	5'-ACGCCGACATCGACCACACAG-3'
			Reverse	5'-AATCTTCCTTGCTGTTGCCGTC-3'

<b>Multidrug Resistance protein 2</b>	MDR2	Mus musculus	Forward	5'-GCCTGGTTGCTGATGCTGCC-3'
			Reverse	5'-GAGCCGCGGCGAGCAAAGT3'
<b>Nuclear Receptor Factor 1</b>	NRF1	Mus musculus	Forward	5'-CTTCATGGAGGAGCACGGAG-3'
			Reverse	5'-CGTGGAGTTGAGGATGTCCC-3'
<b>Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma Coactivator 1<math>\alpha</math></b>	PGC-1 $\alpha$	Mus musculus	Forward	5'-AGACAGGTGCCTTCAGTTCAC-3'
			Reverse	5'-ACCAGAGCAGCACACTCTATG-3'
<b>Transcription factor A, mitochondrial</b>	Tfam	Mus musculus	Forward	5'-CTGCCTTCCTCTAGCCCGGG-3'
			Reverse	5'-GTAACAGCAGACAACTTGTG-3'
<b>Tumor Necrosis Factor</b>	TNF	Mus musculus	Forward	5'-CGTCAGCCGATTTGCTATCT-3'
			Reverse	5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'

## 4.6 MEDICIÓN DE ÁCIDOS BILIARES

### 4.6.1 Niveles de ácidos biliares totales

Para medir la concentración de ácidos biliares totales se empleó el “Total Bile Acid Assay Kit” (Cell Biolabs) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de suero y tejido hepático estaban almacenadas a -80°C antes de llevar a cabo la determinación.

El tejido hepático fue primero homogeneizado con el homogeneizador Precellys®, donde introducimos aproximadamente 50  $\mu$ g de tejido hepático congelado junto con 1 ml de PBS frío. Tanto el homogeneizado hepático como el suero fueron diluidos en H<sub>2</sub>O destilada y se añadió 20  $\mu$ L de cada muestra por cuadruplicado en los pocillos de una microplaca de 96. Se añadió 150  $\mu$ L del reactivo thio-NAD<sup>+</sup> incubándose a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente, se añadió 50  $\mu$ L del reactivo NADH a la mitad de las muestras pareadas. Finalmente, se añadió el reactivo 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y se incubó a 37°C durante 30 minutos. La lectura de la microplaca se realizó en un espectrofotómetro a una absorbancia de 405 nm primero y de 630 nm posteriormente.

#### 4.6.2 Niveles de los diferentes ácidos biliares

La medición de los diferentes ácidos biliares se realizó por cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masa en tándem (HPLC-MS/MS) utilizando un método previamente descrito y modificado (114,115), y empleando el dispositivo 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Se cuantificó por este método veintitrés especies de ácidos biliares.

Para la separación cromatográfica se empleó una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) mantenida a 35°C. Se utilizó un método de elución en gradiente usando como fase móvil una mezcla de metanol y agua, conteniendo ambos 5 mM de acetato amónico y ácido fórmico al 0,01%, pH 4,6. Se comenzó a trabajar con 80:20 de metanol/agua y se fue incrementando la concentración de metanol en la mezcla hasta el 97%, de manera lineal durante 9 min, para retornar a la proporción inicial en 1 minuto y mantenerla durante los últimos 5 minutos del análisis. El flujo de trabajo fue de 0,5 ml/min.

La determinación de los ácidos biliares en el triple cuadrupolo se llevó a cabo utilizando ionización negativa para obtener los aniones moleculares de cada una de las especies moleculares analizadas. Las condiciones de trabajo para la fuente iónica fueron las siguientes: temperatura del gas ( $N_2$ ) 350°C, flujo del gas 8 ml/min, presión del nebulizador 10 psi, voltaje 2500 V. La adquisición MS/MS se realizó en modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) siguiendo la transición específica de cada uno de los iones precursores (ion molecular -  $H^+$ ) a los respectivos iones producto resultantes. En el caso de los ácidos biliares tauroconjugados se monitorizó el ion producto 80,2 m/z, correspondiente al grupo  $SO_3^-$  de la taurina; para los glicoconjugados se siguió el ion 74 m/z, correspondiente a la glicina desprendida en su fragmentación.

Se construyeron rectas patrón para cada una de las especies moleculares de ácidos biliares mediante inyección de soluciones metanólicas con concentraciones de cada ácido biliar entre 0,1 y 25  $\mu$ M. En el caso de las muestras, tras llevar a cabo el procesamiento, se mezclaron 100  $\mu$ l del lisado celular con 50  $\mu$ l de norADC 3  $\mu$ M y se centrifugaron durante 2 minutos a 20.000 xg antes de su inyección en el cromatógrafo. El volumen de inyección fue de 2  $\mu$ l. Se corrigió la concentración de cada ácido biliar, calculada a partir de su recta patrón, por la recuperación obtenida para el estándar interno norADC, que se detectó siguiendo la transición específica de 377 m/z a 331,3 m/z.

## 4.7 CUANTIFICACIÓN DE LA MUERTE CELULAR

### 4.7.1 Determinación de actividad caspasa-3

Se cuantificó la muerte celular programada o apoptosis por espectrofluorimetría usando el sustrato fluorogénico para caspasa-3, Ac-DEVD-AFC (ALX-260-032-M001 Enzo). El tejido hepático congelado y las células cultivadas se homogeneizaron en buffer de lisis frío sin inhibidores de proteasa (HEPES 10mM pH 7,4, EDTA 2mM, Chaps 0,1 % y DTT 5mM) y se procedió a centrifugar para eliminar los detritos. Cada muestra consistía en una mezcla de 500ul de volumen total con 10 a 15 µg de proteína, 20ul de buffer reacción 25X (Pipes 250mM pH 7,4, EDTA 50mM, Chaps 2,5% y DTT 125mM) y 2,5ul de Ac-DEVD-AMC. Esta mezcla de reacción se dividió en dos duplicados de 200ul añadiéndose a una microplaca de 96 pocillos con fondo plano (Thermo). La cinético de la actividad enzimática se cuantificó a las 0, 1, 2 y 4 horas en un espectrofotómetro Spectramax M3 (Molecular Devices) a una excitación de longitud de onda de 390 nm y emisión de 510 nm. Las microplacas con las muestras se mantuvieron a 37°C protegidas de la luz y con agitación durante el ensayo.

### 4.7.2 Determinación de apoptosis por TUNEL

Otro método empleado para evaluar el índice de apoptosis fue el ensayo enzimático TUNEL (deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick-end-labeling) mediante microscopía de fluorescencia con la utilización del In situ Cell Death detection Kit (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los hepatocitos primarios pegados en cubres recubiertos de colágeno se fijaron con paraformaldehído al 4% frío durante 10 minutos, se lavaron dos veces con PBS, se incubaron con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) / MeOH (3%) durante 5 minutos, posteriormente se incubaron con citrato sódico durante 2-4 minutos, y finalmente con una mezcla que contiene la enzima TUNEL y el buffer diluyente (dilución 1/50) durante la noche a 4°C o 1 hora a 37°C. Se usó una solución de montaje que contenía 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para teñir los núcleos de los hepatocitos. Se obtuvieron al menos 5 fotos de cada cubre y se cuantificaron los núcleos, tanto los positivos para TUNEL como los negativos, usando el software ImageJ64 (NIH).

## 4.8 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

### 4.8.1 Cuantificación del estrés oxidativo

El estrés oxidativo en hepatocitos primarios fue medido usando el reactivo *CellROX™ Deep Red* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los hepatocitos se incubaron en 1ml de medio de crecimiento que contenía *CellROX™ Deep Red* 5uM en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 30 minutos. Tras dicha incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS y se despegaron de la superficie de la placa de cultivo mediante el uso de tripsina. La detección de fluorescencia se realizó por citometría de flujo con una excitación de 640 nm y una emisión de 665 nm.

### 4.8.2 Cuantificación del ROS mitocondrial

La producción de ROS mitocondrial en hepatocitos primarios se midió usando el indicador *MitoSOX Red mitochondrial superoxide* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los hepatocitos primarios pegados en cubres recubiertos de colágeno se incubaron en medio de crecimiento que contenía 1,5 µM de este indicador en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 10 minutos, posteriormente se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% frío durante 10 minutos. Se usó la solución de montaje que contenía DAPI para teñir los núcleos de los hepatocitos. La fluorescencia se visualizó por microscopía de fluorescencia con una excitación de 510 nm y una emisión de 595 nm. Finalmente, la fluorescencia fue cuantificada usando el software Frida (<http://tmaj.pathology.ihmi.edu/frida/>) (Johns Hopkins University), y se cuantificaron los núcleos usando el software ImageJ64 (NIH).

## 4.9 CUANTIFICACIÓN DE ATP

Los niveles de ATP en hepatocitos primarios fueron medidos usando el kit específico *ATPlite™ luminescence ATP detection assay system* (Perkin Elmer) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadió 50 µl del buffer de lisis (mammalian cell lysis solution) a 100ul de hepatocitos primarios dentro de una microplaca de 96 pocillos y se incubó durante 5 minutos con agitación circular a 700 rpm. Posteriormente, se añadió 50ul de la solución sustrato (lyophilized substrate solution reconstituido con substrate buffer solution) incubándose durante 5 minutos con agitación circular a 700 rpm, y se mantuvo la microplaca en oscuridad durante 10 minutos. Finalmente, se midió la luminiscencia. Los valores finales se normalizaron con la concentración de proteína total.

#### 4.10 MEDICIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Para la medición del potencial de membrana mitocondrial se empleó el colorante catiónico JC-1 (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los hepatocitos primarios se incubaron en 1 ml de MEM con el colorante JC-1 a 10 µg/µl durante 10 minutos a 37°C protegidos de la luz. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS 1X, se tripsinizaron y se procesaron en un citómetro de flujo para el análisis de fluorescencia a una excitación de 514 nm y una emisión de 529/590 nm. La emisión de fluorescencia cambia de verde (529 nm) a rojo (590 nm) cuando JC-1 exhibe una acumulación dependiente del potencial de membrana en las mitocondrias. Es decir, a bajas concentraciones de JC-1 (bajo potencial de membrana) es monómero y produce fluorescencia verde, y a altas concentraciones (alto potencial de membrana) se agrega y da fluorescencia roja. Por lo tanto, la despolarización de membrana está indicada por una disminución en la relación de intensidad del ratio rojo/verde.

#### 4.11 TINCIÓN DE MITOCONDRIAS ACTIVAS

El colorante empleado para la tinción de las mitocondrias con independencia del potencial de membrana mitocondrial fue el MitoTracker Green (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los hepatocitos primarios se incubaron con MitoTracker Green diluido en MEM a una concentración de 100 nM durante 15 minutos a 37°C protegidos de la luz. Tras la tinción, las células se lavaron dos veces con MEM y se fijaron con paraformaldehído al 4% frío durante 10 minutos. Se usó la solución de montaje que contenía DAPI para teñir los núcleos de los hepatocitos. La fluorescencia se visualizó por microscopía de fluorescencia con una excitación de 490 nm y una emisión de 530 nm. Finalmente, la fluorescencia fue cuantificada usando el software Frida (<http://tmaj.pathology.jhmi.edu/frida/>) (Johns Hopkins University), y se cuantificaron los núcleos usando el software ImageJ64 (NIH).

#### 4.12 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

##### 4.12.1 Tinción Hematoxilina-Eosina

Cortes de tejido hepático (5µm de grosor) fijados e incluidos en parafina se desparafinaron con Histo-Clear y rehidrataron con soluciones graduales decrecientes de alcohol. Una vez hidratados, los cortes se colocaron en una solución de hematoxilina durante 5 minutos, y posteriormente en una de eosina durante 15 minutos. Los cortes se lavaron con agua corriente durante 3 minutos, se deshidrataron con soluciones

graduales crecientes de alcohol, se limpiaron con Histo-Clear y se montaron usando medio de montaje DPX.

#### 4.12.2 Tinción Rojo Sirio

Cortes de tejido hepático (5µm de grosor) fijados e incluidos en parafina se desparafinaron con xileno y se rehidrataron con soluciones graduales decrecientes de alcohol. Una vez hidratados, los cortes se colocaron en una solución de ácido pícrico-Fast Green FCF al 0,01% durante 15 minutos, y de Fast Green FCF al 0,04% / ácido pícrico-rojo sirio al 0,1% durante otros 15 minutos. Posteriormente se deshidrataron y se montaron usando el medio de montaje DPX.

#### 4.12.3 Inmunohistoquímica

Los cortes de tejido hepático se desenmascararon en función del anticuerpo primario que se empleará, y se sometieron a un bloqueo con peróxido (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS 1X) durante 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar la actividad de las peroxidases endógenas. Para las tinciones con anticuerpos primarios de ratón en tejido de ratón, las muestras se bloquearon con Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) (dilución 1:10) durante 1 hora a temperatura ambiente, antes de ser bloqueadas con suero (suero de cabra al 5% en PBS 1X) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes se delinearon con un lápiz hidrófobo y se incubaron con el anticuerpo primario diluido en el diluyente de anticuerpo DAKO (DAKO) en una cámara húmeda en la oscuridad. Las condiciones de desenmascaramiento e incubación para cada anticuerpo empleado se muestran en la **Tabla 4.4**. Se lavó tres veces con PBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario Envision anti-rabbit o anti-mouse (DAKO) o ImmPRESS anti-rat (Vector) conjugados con HRP durante 30 minutos a temperatura ambiente. La detección colorimétrica se realizó con el cromógeno Vector VIP (púrpura) (Vector Laboratories) y los cortes se contratiñeron con hematoxilina. Las muestras se deshidrataron con soluciones graduales de alcohol e Histo-Clear, y se montaron usando el medio de montaje DPX. Para el análisis, se obtuvieron 10 imágenes por muestra con un objetivo 40X en un microscopio de luz vertical (Carl Zeiss AG). La suma promedio de las intensidades y el porcentaje de área teñida de cada muestra se calculó mediante el software Frida (<http://tmaj.pathology.jhmi.edu/frida/>) (Johns Hopkins University).

**Tabla 4.4** Condiciones de desenmascaramiento, incubación, dilución, proveedor y número de catálogo de los anticuerpos empleados en inmunohistoquímica

ANTICUERPO	Desenmascaramiento	Incubación	Proveedor	Nº catálogo
<i>F4/80</i>	Proteinasa K (15 min a temperatura ambiente)	1:50, 1h a temperatura ambiente	Bio RAD	MCA497BB
<i>αSMA</i>	Buffer citrato pH 6 (20 min a 97°C)	1:200, toda la noche a 4°C	Sigma	C6198
<i>MCJ</i>	Buffer citrato pH 6 (20 min a 97°C)	1:100, toda la noche a 4°C	BioMosaics	B0027R

#### 4.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se empleó el paquete estadístico SPSS v19.0 (IBM. USA). Todos los experimentos con hepatocitos se realizaron por triplicado, y los datos se expresan como media ± SEM (error estándar de la media). El test de Kolmogorov-Smirnov se empleó para comprobar la distribución normal de las variables. Para el análisis estadístico de las variables con distribución normal se utilizó el test t de Student o ANOVA, mientras que para las variables con distribución no normal se empleó el test U de Mann-Whitney. Las variables categóricas se compararon mediante el test Chi cuadrado o test exacto de Fisher. El análisis de supervivencia se realizó con el método de Kaplan-Meier. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró significativo.

## 5. RESULTADOS

---



## 5.1 EL DÉFICIT DE MCJ PROTEGE Y PREVIENE EL DAÑO HEPÁTICO POR COLESTASIS IN VIVO

Varios estudios indican que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo contribuyen a la patogenia de las enfermedades hepáticas colestásicas crónicas. Dado el papel de MCJ en la regulación de la actividad mitocondrial a través de su acción en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, hemos investigado la posible implicación de MCJ en el daño hepático por colestasis. Para ello, lo primero fue estudiar el papel de esta proteína en el modelo animal más frecuente de colestasis hepática, la ligadura del conducto biliar.

Realizamos diversos experimentos in vivo donde ratones WT y MCJ-KO fueron sometidos a LCB. Este modelo animal experimental es el más utilizado para inducir lesiones colestásicas y fibrosis hepática y para estudiar los eventos moleculares y celulares subyacentes a los mecanismos fisiopatológicos inducidos por el flujo biliar inapropiado.

### 5.1.1 Mayor supervivencia en ratones con pérdida de MCJ

La acumulación de ácidos biliares es responsable de la apoptosis hepatocelular, lo que da lugar a la inflamación y fibrosis hepática. Si el proceso obstructivo del conducto biliar no se revierte, las lesiones a nivel hepático son irreversibles y se produce la muerte del animal. La ligadura del conducto biliar se realizó en 30 ratones WT y 25 ratones MCJ-KO de tres meses de edad para analizar la supervivencia de ambos grupos de ratones. Tras 14 días del procedimiento quirúrgico, 5 ratones MCJ-KO (20%) y sólo 2 ratones WT (6,7%) habían sobrevivido, resultando una supervivencia media significativamente mayor en los ratones MCJ-KO que en los WT ( $6,36 \pm 0,98$  vs  $3,37 \pm 0,6$ ;  $p = 0,015$ ) (Fig. 5.1). Ningún animal presentó datos de complicación por el procedimiento quirúrgico, pero si relacionamos la mortalidad de los dos primeros días con complicaciones postquirúrgicas, la supervivencia media continúa siendo mayor en los ratones MCJ-KO ( $9,06 \pm 1,03$  vs  $5,79 \pm 0,93$ ;  $p = 0,04$ ).

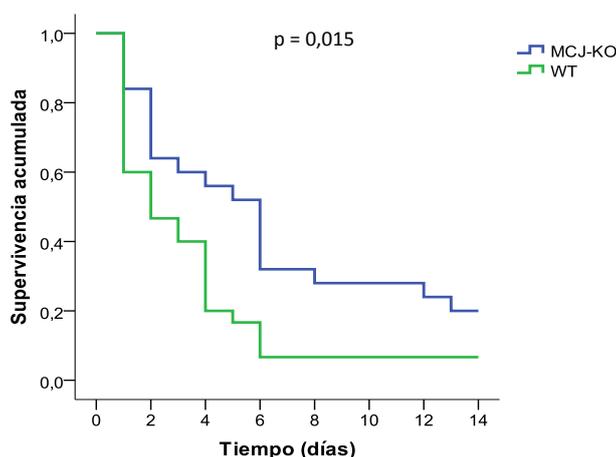
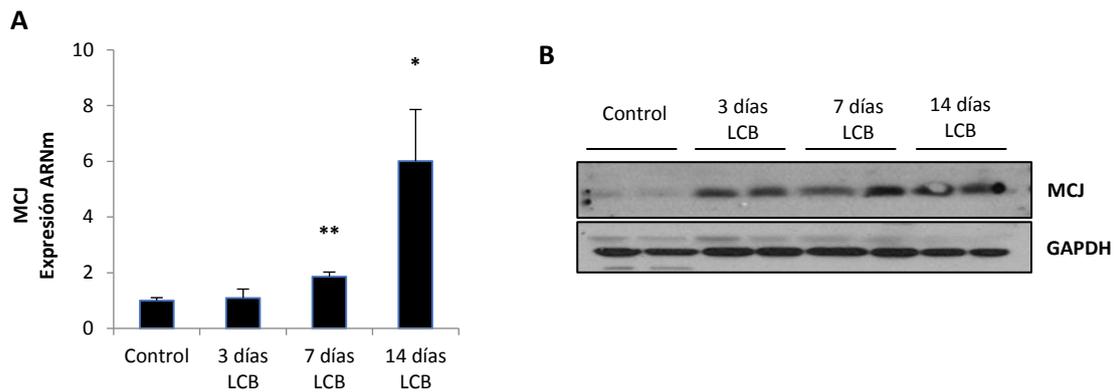


Fig 5.1 Curvas de supervivencia de ratones WT (n=30) y MCJ-KO (n=25)

### 5.1.2 Mayor expresión de MCJ conforme aumenta el grado de colestasis

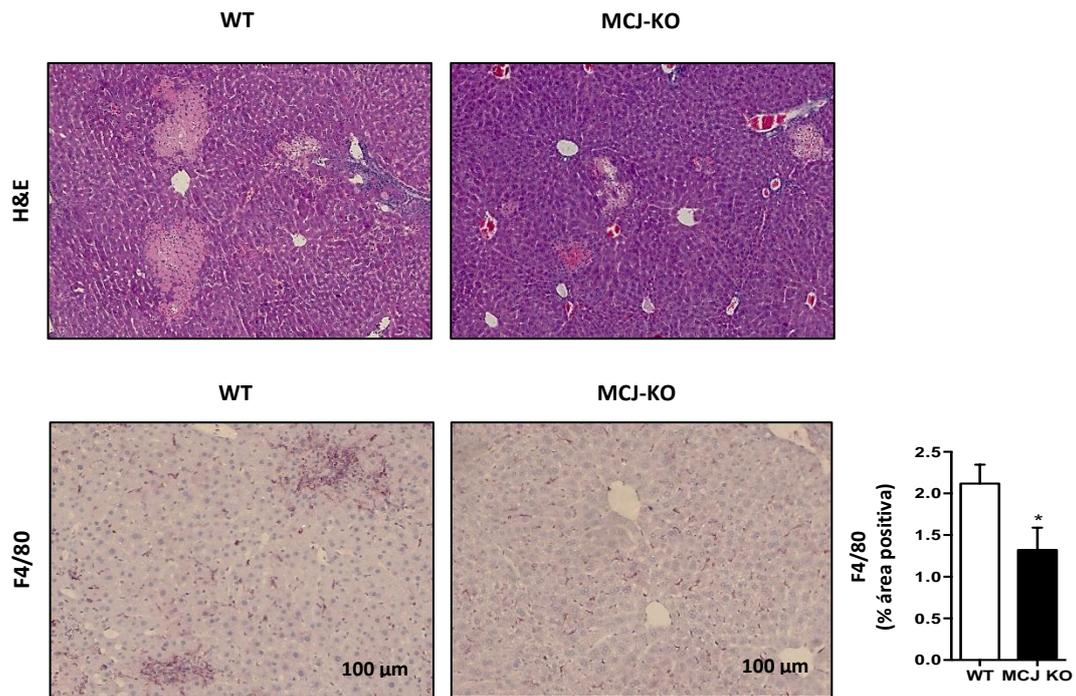
Para investigar una posible regulación de MCJ con el daño hepático por colestasis determinamos la expresión de MCJ en el tejido hepático de ratones WT tras la LCB a diferentes tiempos. Encontramos que los niveles de ARNm de MCJ se iban incrementando con el paso de los días y por lo tanto con el daño hepático (Fig. 5.2 A), lo que también se tradujo en mayores niveles proteicos de MCJ a nivel hepático (Fig. 5.2 B). Esta regulación de MCJ con el daño hepático por ácidos biliares pone de manifiesto la relevancia de MCJ en la patogenia de la enfermedad hepática colestásica.



**Fig 5.2** Niveles de MCJ en tejido hepático de ratones WT tras LCB. (A) Expresión de ARNm de MCJ. Cuatro ratones de cada tiempo, representado como media y error estándar de la media. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ . (B) Niveles de MCJ por western blotting.

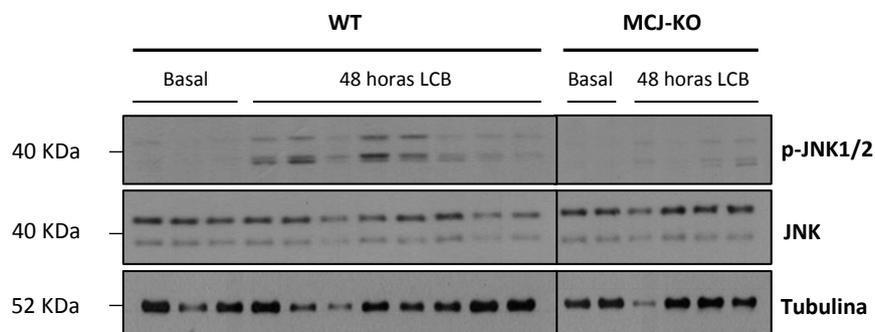
### 5.1.3 Menor daño hepático por colestasis en ausencia de MCJ

Para determinar el papel de MCJ, ratones WT y MCJ-KO fueron sacrificados a las 48 horas de la realización de la LCB. A este tiempo, a nivel hepático se pudo ver infiltración de células inflamatorias, necrosis hepatocelular y proliferación ductal. La afectación hepática fue más llamativa en el grupo de ratones WT (Fig 5.3 A), lo que se pudo comprobar con la evaluación de la inflamación hepática determinada por la presencia de células positivas para F4/80 (macrófagos). Los ratones MCJ-KO presentaron de media un menor infiltrado inflamatorio, lo que fue estadísticamente significativo (Fig 5.3 B). Esto nos indica que la ausencia de MCJ protege al hepatocito del daño por colestasis.

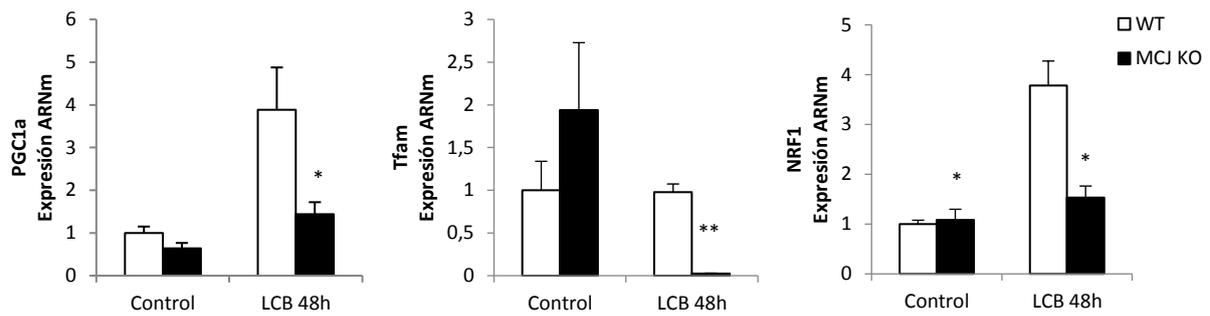


**Fig. 5.3** Análisis histológico del tejido hepático de ratones WT (n = 8) y MCJ-KO (n = 4) tras 48 horas de la LCB. (A) Daño hepático por tinción con H&E. (B) Inflamación hepática evaluada por tinción F4/80. \* $p < 0,05$ .

Estos resultados en la histología se correlacionaron con la reducción en los niveles de c-Jun N-terminal fosforilado (p-JNK) en el hígado de los ratones MCJ-KO (Fig. 5.4), quinasa de estrés que promueve el daño y apoptosis celular. La activación de JNK puede provocar una alteración en la membrana mitocondrial haciéndola disfuncionante. Esto explica que, junto con los menores niveles proteicos de p-JNK observados en ratones MJC-KO, obtengamos una menor expresión de genes relacionados con la biogénesis mitocondrial (PGC1 $\alpha$ , Tfam, NRF1) en el tejido hepático de estos ratones (Fig. 5.5), indicándonos un menor daño mitocondrial con menor necesidad de recuperaciones en los ratones MCJ-KO.



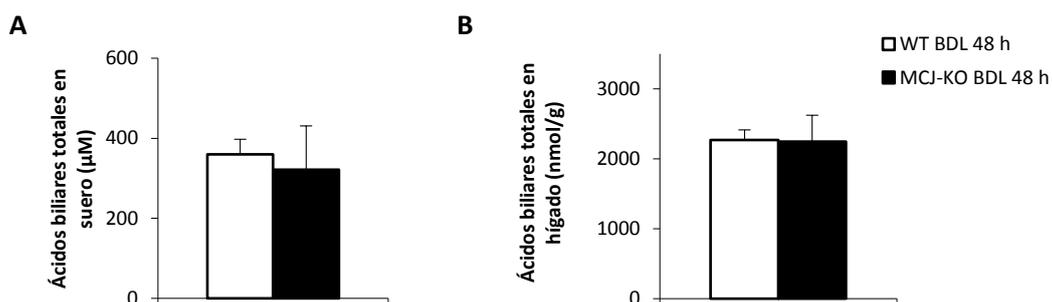
**Fig.5.4** Activación de JNK evaluada por western blotting en tejido hepático de ratones WT y MCJ-KO a tiempo cero (basal) y tras 48 horas de la LCB.



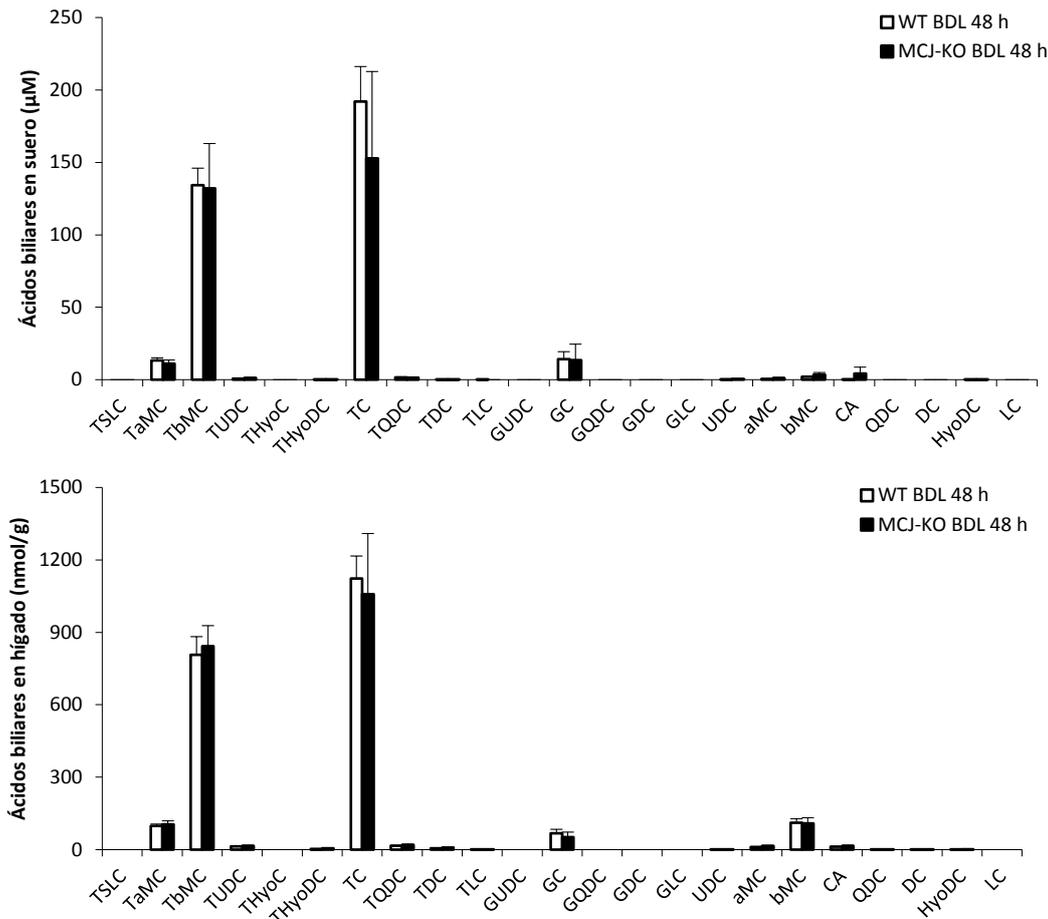
**Fig. 5.5** Expresión de ARNm en tejido hepático de genes relacionados con biogénesis mitocondrial en tejido hepático de ratones WT y MCJ-KO a tiempo cero (control) (n = 5 para WT, n = 4 para MCJ-KO) y tras 48 horas de la LCB (n = 8 para WT, n = 4 para MCJ-KO). Representado como media y error estándar de la media. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

#### 5.1.4 Ausencia de modificación en la composición de la bilis por el déficit de MCJ

Un menor daño hepático en los ratones MCJ-KO se podría explicar por una mayor concentración de ácidos biliares hidrofílicos en la composición de la bilis de estos ratones, los cuales son menos citotóxicos. Por este motivo medimos la cantidad de los diferentes ácidos biliares en suero y en tejido hepático de los ratones WT y MCJ-KO a las 48 horas de la LCB. La cantidad de ácidos biliares totales tanto en suero como en tejido hepático no mostró diferencias (Fig. 5.6). Además, se cuantificó cada ácido biliar por separado, tanto a nivel sérico como en tejido hepático. No encontramos diferencias significativas en ninguno de los ácidos biliares, ni a nivel sérico ni hepático (Fig. 5.7).



**Fig. 5.6** Cantidad de ácidos biliares totales en suero (A) y en tejido hepático (B) en ratones WT (n = 7) y MCJ-KO (n = 4). Representado como media y error estándar de la media.



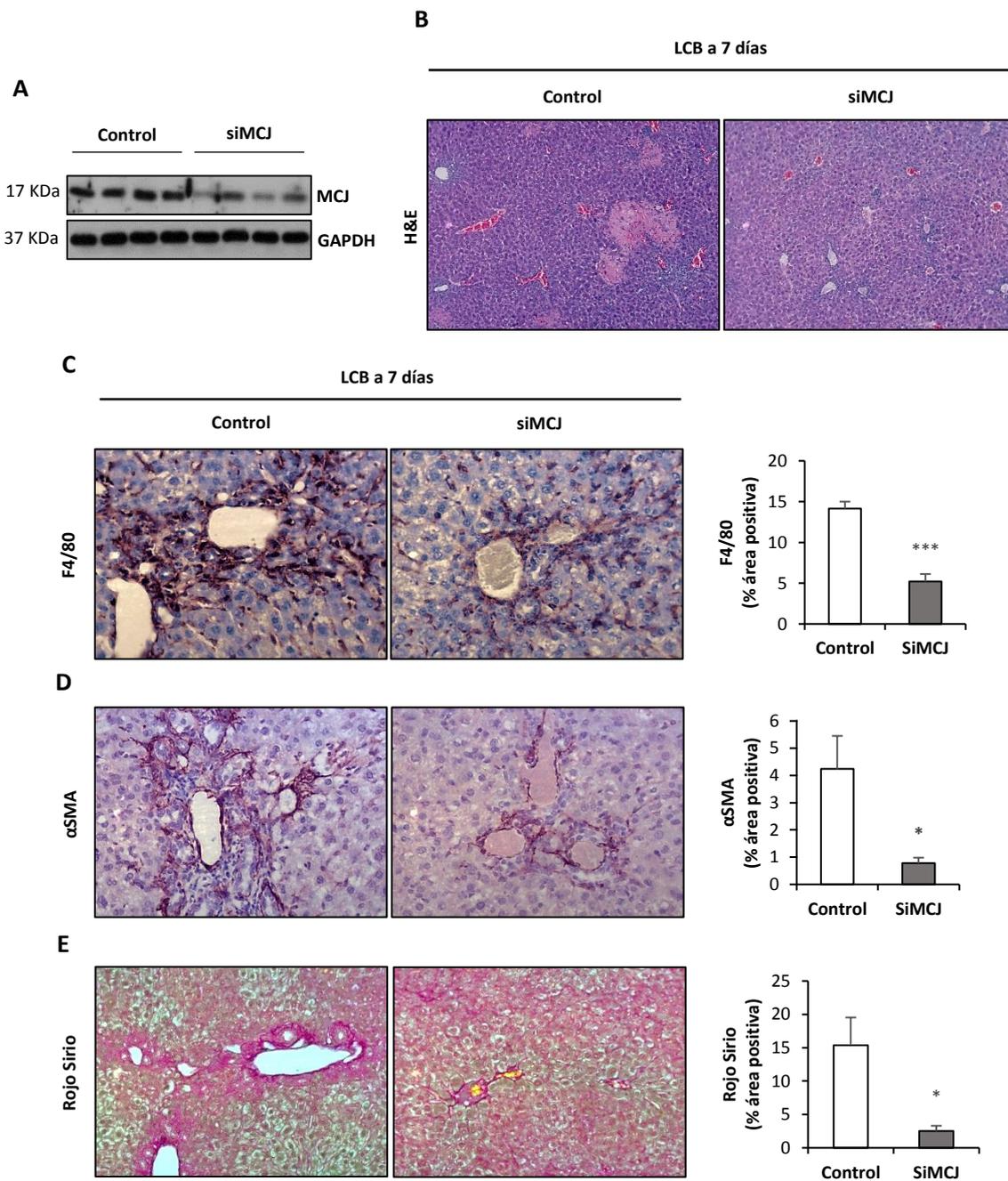
**Fig. 5.7** Cantidad de cada ácido biliar en suero (A) y en tejido hepático (B) en ratones WT (n = 7) y MCJ-KO (n = 4).

#### 5.1.4 El tratamiento con siRNA frente a MCJ reduce el daño hepático por colestasis

Para evaluar el empleo de MCJ como diana terapéutica en el tratamiento del daño hepático por colestasis, examinamos el efecto del silenciamiento de MCJ mediante el uso de siRNA específico de MCJ (siMCJ) en ratones WT tras ser sometidos a LCB. Para ello realizamos este procedimiento quirúrgico a 10 ratones WT, de los cuales sobrevivieron 8 a los 3 días, momento en el que los separamos en dos grupos. A un grupo (n = 4) se le inyectó por la vena de la cola el control (siControl) y al otro grupo (n = 4) el siMCJ, repitiendo dicha inyección a los 5 días de la LCB. Todos los ratones fueron sacrificados a los 7 días de la LCB. Los niveles de MCJ se midieron por inmunoblot, observando una reducción de la expresión de esta proteína con el tratamiento de siMCJ (Fig. 5.7A). El análisis del daño hepático por histología mostró mínimas áreas necróticas en los hígados de los ratones tratados con siMCJ en comparación con los controles (Fig. 5.7B). Además, el análisis de la inflamación hepática mostró un menor número de macrófagos en el hígado de los ratones tratados con siMCJ (Fig. 5.7C).

La inflamación es la que contribuye en gran medida al desarrollo de fibrosis. A los 7 días de la LCB no es frecuente ver una fibrosis llamativa, pero a este tiempo la

fibrogénesis está en curso (105). Para analizar esta fibrogénesis empleamos la expresión de Alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) y la tinción Rojo Sirio.  $\alpha$ SMA es un marcador de células estrelladas hepáticas activadas, miofibroblastos e hidroxiprolina, aminoácido presente principalmente en el colágeno; y el Rojo Sirio tiñe el tejido conectivo de rojo intenso. Observamos que tanto la expresión de  $\alpha$ SMA como la tinción con Rojo Sirio era menor en los ratones tratados con siMCJ (Fig. 5.7D y E). Estos resultados demuestran que la inhibición de la expresión de MCJ puede revertir el daño hepático por colestasis.



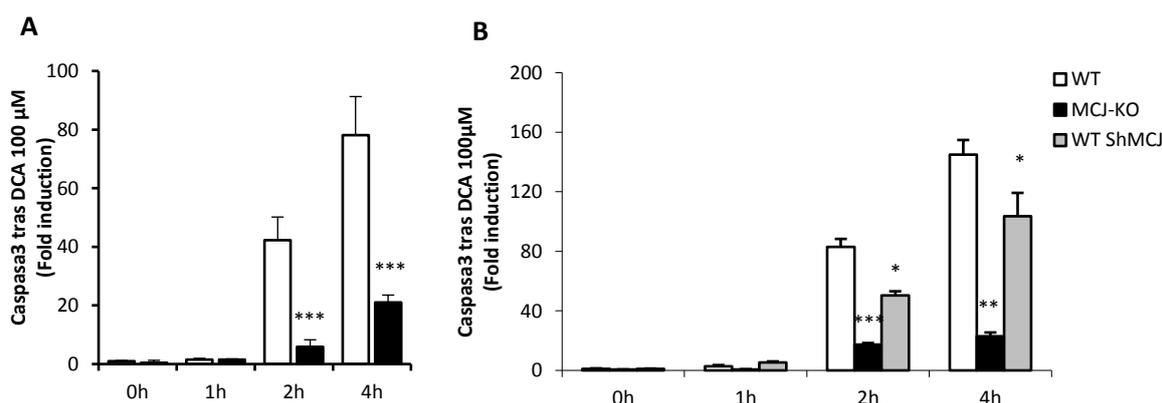
**Fig. 5. 7** Silenciamiento específico de MCJ en ratones WT tras LCB. (A) Silenciamiento de MCJ evaluado por inmunoblot. (B) Áreas necróticas observadas mediante tinción de H&E, 10X. (C) Inflamación hepática evaluada por tinción con F4/80, 40X. (D) Tinción  $\alpha$ SMA en tejido hepático. (E) Tinción Rojo Sirio en ratones tras 7 días de BDL sin y con silenciamiento de MCJ. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . De cada grupo se empleó 4 ratones. Representación como media y error estándar de la media.

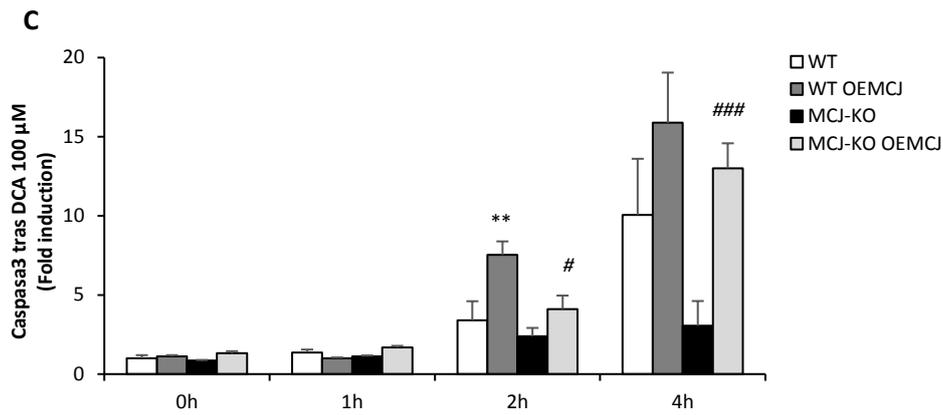
## 5.2 LA PÉRDIDA DE MCJ PROTEGE A LOS HEPATOCITOS DE LA TOXICIDAD POR ACIDOS BILIARES

La ausencia de MCJ facilitaría la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial en el hígado. Para estudiar si MCJ modula el daño hepático inducido por ácidos biliares, aislamos hepatocitos primarios de ratones WT y MCJ-KO y los tratamos con altas concentraciones de ácido desoxicólico (DCA).

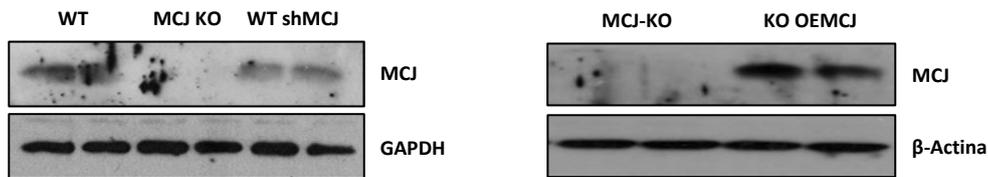
### 5.2.1 Menor apoptosis en hepatocitos con déficit de MCJ

A las 2 horas de la administración de DCA, se observó una marcada toxicidad de los hepatocitos primarios de WT, mientras que los hepatocitos MCJ-KO estaban significativamente protegidos, como se puede observar en la determinación de la actividad de la caspasa-3 (Fig. 5.8 A). Además, para demostrar que la resistencia contra la toxicidad por ácidos biliares era consecuencia de la ausencia de MCJ, reprimimos transitoriamente su expresión en hepatocitos WT con un shRNA (ShMCJ) para reducir los niveles de MCJ, reduciéndose la muerte hepatocitaria en los ShMCJ (Fig. 5.8 B). De forma similar, restauramos la expresión proteica de MCJ en hepatocitos MCJ-KO transfectando el plásmido HA-MCJ, así como, sobreexpresamos MCJ en los hepatocitos WT, y evaluamos nuevamente las respuestas a DCA. La expresión de MCJ generada en los hepatocitos MCJ-KO reinstauró la sensibilidad de estas células a la apoptosis inducida por DCA, y la mayor expresión de MCJ en los hepatocitos WT aumento la muerte celular (Fig. 5.8 C). La comprobación de la eficacia en el silenciamiento y la sobreexpresión de MCJ se muestra en la Fig. 5.9.



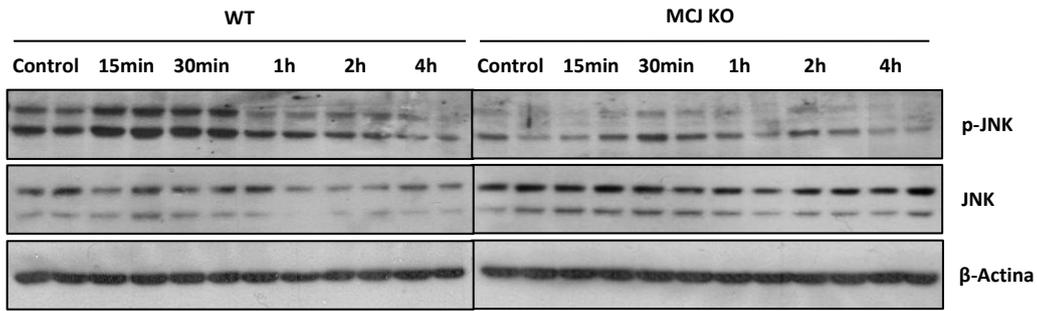


**Fig. 5.8** Determinación de la muerte hepatocitaria a diferentes tiempos tras tratamiento con DCA medidos por la actividad de la caspasa 3. (A) Muerte celular en hepatocitos WT y MCJ-KO. \*\*\* $p < 0,001$ . (B) Muerte celular en hepatocitos WT y ShMCJ. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  WT vs MCJ-KO o WT shMCJ. (C) Muerte celular en hepatocitos WT y MCJ-KO con sobreexpresión de MCJ. \*\* $p < 0,01$  WT vs WT OEMCJ; # $p < 0,05$  ### $p < 0,001$  MCJ-KO vs MCJ-KO OEMCJ. Cada condición se hizo por triplicado, y está representado como la media y el error estándar de la media.

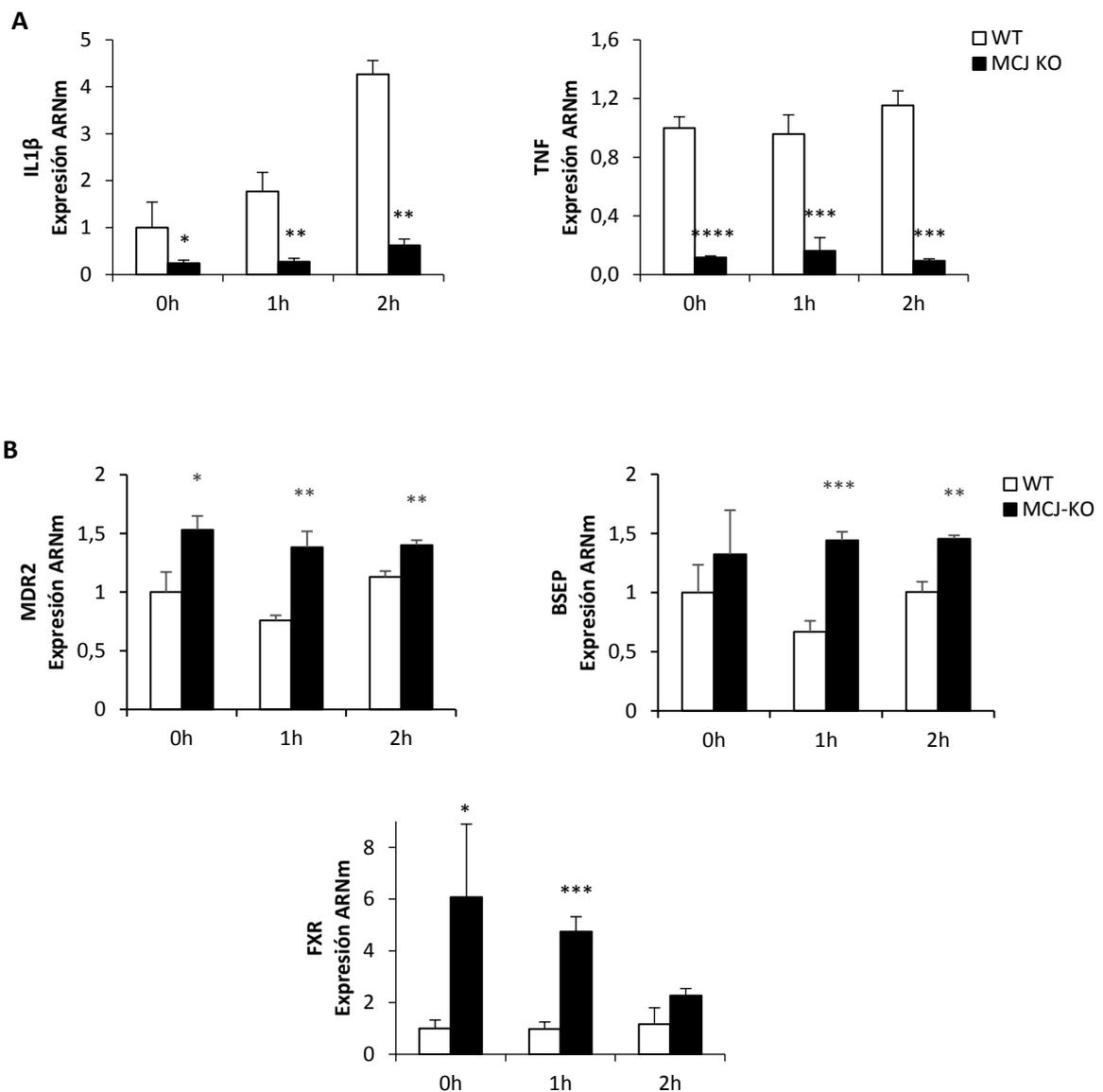


**Fig. 5.9** Expresión de MCJ por Western blotting en hepatocitos WT, MCJ-KO, ShMCJ y MCJ-KO sobreexpresado MCJ.

Al igual que ocurría en el tejido hepático de los ratones, la activación de JNK en los hepatocitos se correlacionó con la muerte celular. Los hepatocitos MCJ-KO presentaron una menor activación de JNK (p-JNK) comparados con los WT, especialmente en los primeros minutos tras el tratamiento con DCA (Fig. 5.10). El descenso en el daño hepatocelular en MCJ-KO fue respaldado por unos niveles de ARNm menores de citoquinas inflamatorias (Fig. 5.11 A). Además, también a nivel génico se observó una mayor expresión del principal receptor nuclear para los ácidos biliares, FXR, y de importantes transportadores de ácidos biliares (Fig. 5.11 B). Por lo tanto, estos datos muestran que la pérdida de MCJ confiere resistencia a la toxicidad por ácidos biliares en hepatocitos.



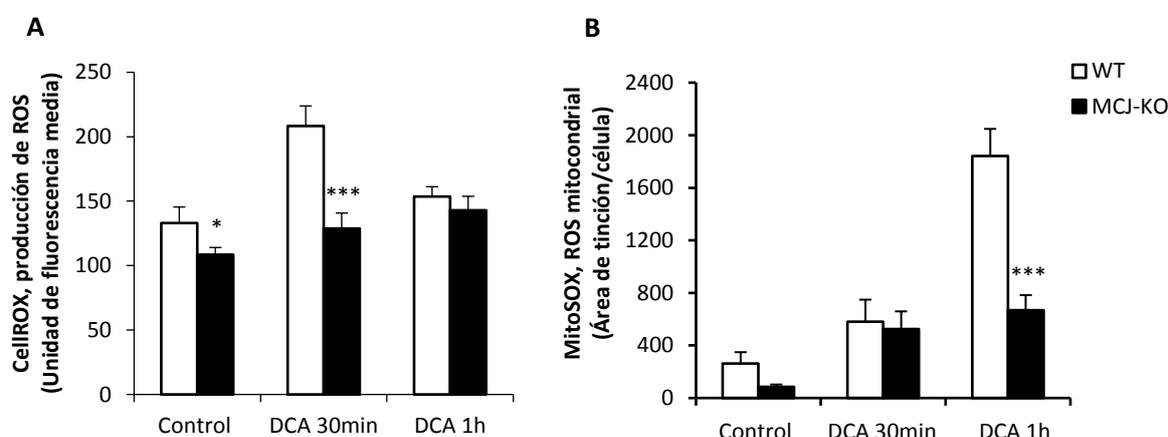
**Fig 5.10** Activación de JNK evaluada por Western blotting en hepatocitos WT y MCJ-KO tras el tratamiento con dosis tóxicas de DCA.



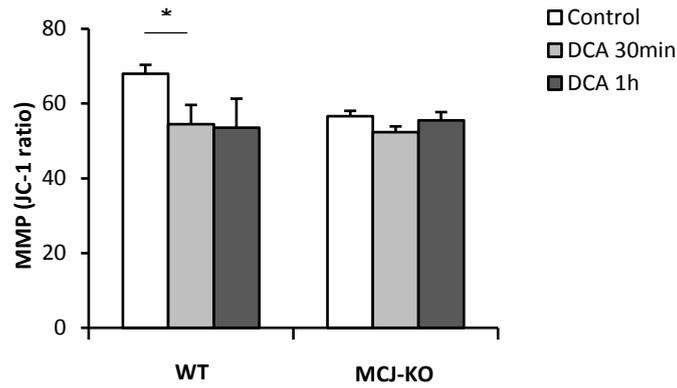
**Fig. 5.11** Expresión relativa de ARNm en hepatocitos de diferentes genes inflamatorios (A) y de transportadores de ácidos biliares y FXR (B). Cada condición se hizo por triplicado. Representado como media y desviación estándar. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 5.2.2 Menor formación de ROS en hepatocitos con déficit de MCJ

El estrés oxidativo es un mecanismo crucial causante del daño hepático por colestasis. Los ácidos biliares promueven la formación de ROS, los cuales oxidan y modifican proteínas, lípidos y ADN, y producen la activación de JNK, lo que conduce todo ello a la muerte del hepatocito. Por ello analizamos la producción de ROS total en hepatocitos WT y MCJ-KO tras el tratamiento con DCA, observando que la dosis tóxica del ácido biliar incrementaba la producción de ROS en los hepatocitos WT, sin afectar a los niveles de ROS en los hepatocitos MCJ-KO (Fig. 5.12 A). Como la mitocondria es una fuente importante de producción de ROS, analizamos además el ROS específico mitocondrial, el superóxido ( $O_2^-$ ), con resultados similares. Encontramos altos niveles de ROS mitocondrial en hepatocitos WT, pero no en hepatocitos MCJ-KO tras DCA (Fig. 5.12 B). Esta producción de ROS mitocondrial puede ser debida a la inhibición de diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial por parte de los ácidos biliares que provoca la fuga de electrones de dicha cadena. Además, se atribuye a los ácidos biliares una acción directa sobre la membrana mitocondrial que reduciría su potencial de membrana al producirse en ella poros. Para evaluar este hecho, examinamos el potencial de membrana mitocondrial en hepatocitos WT y MCJ-KO sin y con DCA fijándonos en los cambios que la administración de este ácido biliar provocaba en la membrana mitocondrial. De acuerdo con los resultados anteriores, la ausencia de MCJ protegió de la despolarización de la membrana mitocondrial, es decir, de la pérdida del gradiente eléctrico y químico (Fig. 5.13).



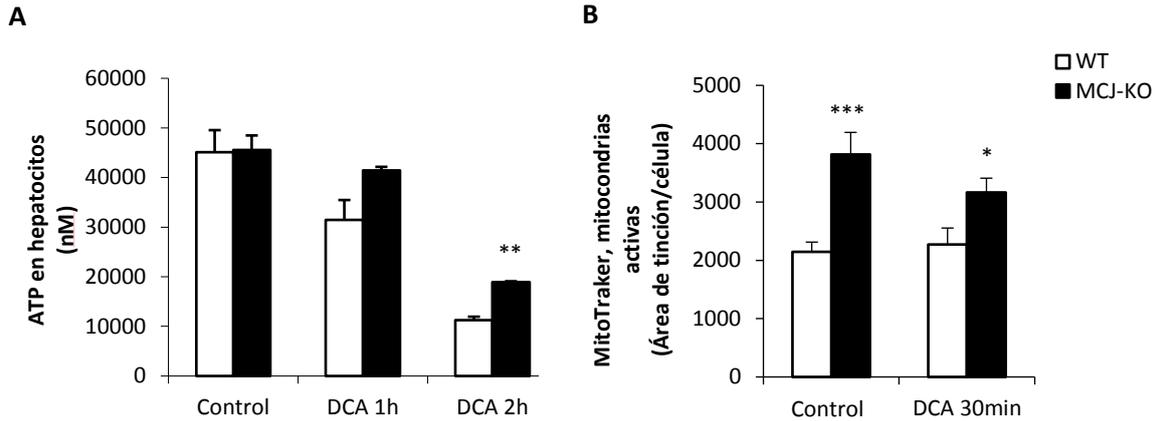
**Fig. 5.12** Medición de la producción de ROS en hepatocitos WT y MCJ-KO con DCA. (A) Producción de ROS total. (B) Producción de ROS mitocondrial. Cada condición se hizo por cuadruplicado, y está representado como media y error estándar de la media. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Fig. 5.13** Potencial de membrana mitocondrial en hepatocitos WT y MCJ-KO tras dosis tóxicas de DCA, calculado mediante el ratio Red/Green con el colorante JC-1 por citometría de flujo. Cada condición se hizo por cuadruplicado, y está representado como media y error estándar de la media. \* $p < 0,05$ .

### 5.2.3 Mayor actividad mitocondrial en los hepatocitos con déficit de MCJ

La principal función de la mitocondrial es proveer de energía (ATP) a través de la fosforilación oxidativa. La despolarización de membrana, además de conducir a una producción excesiva de ROS como hemos visto en los hepatocitos WT con DCA, también genera menor producción de ATP. Por tanto, analizamos el efecto del DCA en los niveles de ATP en hepatocitos WT y MCJ-KO, y observamos que el DCA causó una reducción más marcada de ATP en los hepatocitos WT que en los MCJ-KO (Fig. 5.14 A). Esta menor depleción de ATP en hepatocitos MCJ-KO puede traducir un mayor número de mitocondrias que no se ven afectadas por la toxicidad del ácido biliar. Para valorar la actividad mitocondrial utilizamos un colorante específico para el marcaje de mitocondrias activas. Tanto sin DCA como tras DCA, los hepatocitos MCJ-KO presentan mayor número de mitocondrias activas (Fig. 5.14 B). Por lo tanto, la presencia en los hepatocitos MCJ-KO de una menor despolarización de membrana mitocondrial, menor producción de ROS, mayor producción de ATP y un mayor número de mitocondrias funcionantes, nos indica que la ausencia de MCJ mejora la función mitocondrial al intensificar la respiración mitocondrial, lo que es capaz de proteger al hepatocito de la toxicidad por ácidos biliares.



**Fig. 5.14** Actividad mitocondrial en hepatocitos WT y MCJ-KO. (A) Producción de ATP total en hepatocitos tras administración de DCA. (B) Mitocondrias activas tras administración de DCA. Cada condición se hizo por triplicado, y está representado como media y error estándar de la media. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.3 EXPRESIÓN DE MCJ EN PACIENTES CON ENFERMEDAD HEPÁTICA COLESTÁSICA

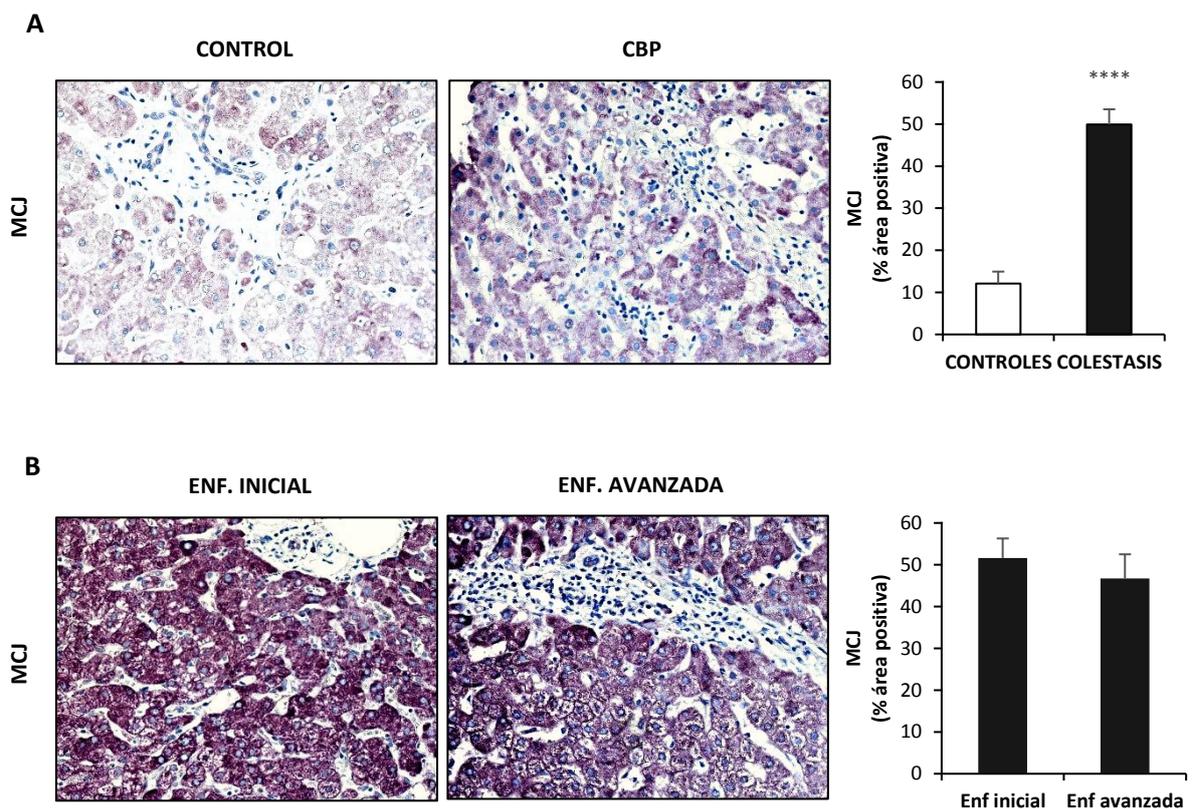
Por último, determinamos si la proteína MCJ está regulada en pacientes diagnosticados de las dos enfermedades colestásicas crónicas del adulto más frecuentes, la colangitis biliar primaria y la colangitis esclerosante primaria.

#### 5.3.1 Niveles hepáticos de MCJ elevados en pacientes con una enfermedad hepática colestásica

Evaluamos la expresión de MCJ por inmunohistoquímica en biopsias hepáticas de una cohorte de pacientes diagnosticados de CBP y CEP ( $n = 37$ ) y lo comparamos con la expresión de dicha proteína en biopsias de tejido hepático sin alteraciones provenientes de donantes de hígado ( $n = 18$ ) (50% mujeres y 50% hombres, con una edad media de 61,9 años, mínimo de 29 y máximo de 81 años). Las características basales de los pacientes se muestran en la [Tabla 5.1](#). La cuantificación de MCJ reveló unos niveles significativamente mayores en pacientes con CBP y CEP que en los sujetos sin daño hepático ([Fig. 5.15 A](#)). Dado que la cohorte de pacientes con enfermedad colestásica incluía pacientes con diferentes grados de afectación hepática, analizamos los niveles de MCJ en función de la presencia de una enfermedad inicial (estadio I y II de Ludwig y Scheuer) o avanzada (estadio III y IV de Ludwig y Scheuer), no encontrando diferencias significativas ([Fig. 5.15 B](#)). Estos datos sugieren un papel de MCJ en el desarrollo de la enfermedad hepática colestásica crónica.

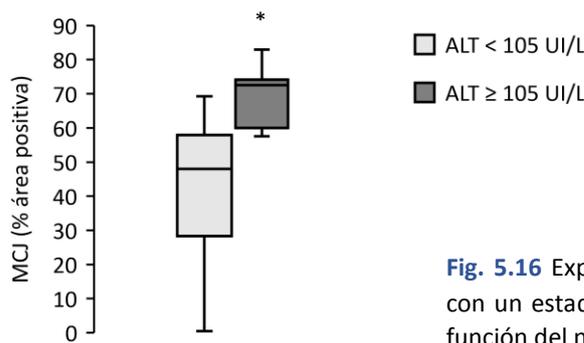
	Todos los pacientes n = 37	Enfermedad inicial n = 24	Enfermedad avanzada n = 13	p*
Género (M/H)	32 / 5	21 / 3	11 / 2	0,99
Etiología (CBP/CEP)	34 / 3	23 / 1	11 / 2	0,28
AMA + (%)	82,6	88,9	60	0,19
ANA + (%)	17,4	11,1	40	0,19
AST (U/L)	73,61 ± 49,30	57,21 ± 24,20	151,50 ± 67,21	0,07
ALT (U/L)	87,04 ± 43,59	85,68 ± 45,68	93,50 ± 36,70	0,75
GGT (U/L)	224,22 ± 188,46	224,37 ± 189,46	223,50 ± 212,28	0,99
FA (U/L)	251,57 ± 219,24	213,05 ± 143,72	434,5 ± 417,79	0,37
Bi total (mg/dL)	2,04 ± 3,10	1,14 ± 2,04	6,32 ± 4,03	0,08
Albúmina (g/dl)	4,08 ± 0,62	4,29 ± 0,35	3,1 ± 0,73	<b>0,04</b>
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /L)	234,13 ± 77,62	246,79 ± 66,99	174,00 ± 106,90	0,09
MCJ (% área positiva)	49,91 ± 21,97	51,64 ± 22,81	46,73 ± 20,81	0,52

**Tabla 5.1** Características basales de los pacientes con enfermedad hepática colestásica crónica. Los datos cuantitativos están expresados como media ± desviación estándar. \*Enfermedad inicial vs enfermedad avanzada.



**Fig. 5.15** Inmunohistoquímica de MCJ en tejido hepático humano. (A) Expresión de MCJ en tejido hepático sin alteraciones y afecto por CBP. (B) Expresión de MCJ en pacientes con enfermedad hepática colestásica crónica en estadio inicial y avanzado. \*\*\*\*p<0,0001. Expresado como media y error estándar de la media.

Si excluimos del análisis a los pacientes con enfermedad avanzada, en los que los niveles de MCJ por inmunohistoquímica pueden estar infraestimados debido a la destrucción hepatocitaria existente, observamos que los niveles de esta proteína se correlacionan con los niveles de ALT en suero ( $r = 0,47$ ;  $p = 0,04$ ), es decir, con el daño hepatocelular. De acuerdo con este resultado, si analizamos con detenimiento aquellos pacientes con enfermedad inicial y niveles de ALT superiores a tres veces el límite alto de la normalidad (105 UI/ml), vemos que presentan una mayor expresión de MCJ en tejido hepática ( $70,26 \pm 10,16$  vs  $41,88 \pm 21,79$ ;  $p = 0,01$ ) (Fig. 5.16).



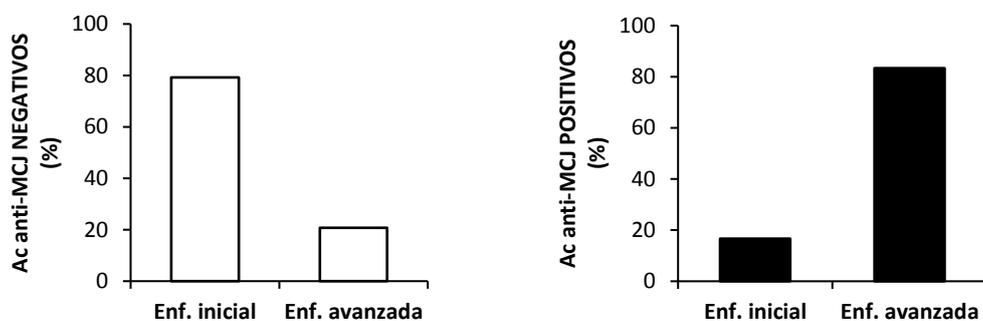
**Fig. 5.16** Expresión de MCJ en tejido hepático de pacientes con un estadio inicial de enfermedad colestásica crónica en función del nivel en suero de ALT. \* $p < 0,05$ .

### 5.3.2 Asociación entre la CBP avanzada y la presencia de anticuerpos anti-MCJ en suero

Dado el carácter autoinmune de la CBP y su relación con los anticuerpos antimitocondriales, quisimos ver si pacientes con CBP expresaban en suero anticuerpos frente a la proteína MCJ y su relación con la afectación hepática. De una cohorte de 54 pacientes diagnosticados de CBP con biopsia hepática apreciamos una positividad para estos anticuerpos en el 11,11% de los casos. Las características de dichos pacientes en función de la presencia de anticuerpos anti-MCJ se muestran en la tabla 5.2. A pesar de ser una cohorte pequeña y con escasos pacientes con una enfermedad avanzada, observamos que todos los sujetos con anticuerpos anti-MCJ, excepto uno, presentan una CBP con un estadio de fibrosis avanzada (Fig. 5.17). Además, estos pacientes con anticuerpos anti-MCJ presentan una peor función hepática como refleja la presencia de una mayor bilirrubina y menor concentración de albúmina. Por estos motivos podemos estar ante un posible biomarcador de enfermedad colestásica avanzada.

	Anti-MCJ negativo (n=48)	Anti-MCJ positivo (n=6)	p
Edad (años)	58,9 ± 13,7	64 ± 17	0,41
AST (U/L)	57,3 ± 43,6	76 ± 19,1	0,36
ALT (U/L)	65 ± 53,4	55,6 ± 35,6	0,71
GGT (U/L)	152,6 ± 147	186,4 ± 229,8	0,66
FA (U/L)	179,4 ± 92,7	251,2 ± 159,8	0,38
Bi total (mg/dL)	0,9 ± 0,5	1,8 ± 0,9	<b>0,007</b>
Albúmina (g/dl)	4,1 ± 0,5	3,2 ± 0,7	<b>0,002</b>
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /L)	250,1 ± 88,2	80,5 ± 41,5	<b>0,001</b>
<b>Estadio de enfermedad, n (%)</b>			
Inicial	38 (79,2)	1 (16,7)	<b>0,005</b>
Avanzada	10 (20,8)	5 (83,3)	

**Tabla 5.2** Características de los pacientes con colangitis biliar primaria en función de la positividad frente a anticuerpos anti-MCJ. Los datos cuantitativos están expresados como media ± desviación estándar.



**Fig. 5.17** Ausencia o presencia de anticuerpos anti-MCJ en suero de pacientes con CBP (n = 54) en función del estadio de enfermedad.



## 6. DISCUSIÓN

---



Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la producción de energía, la termogénesis, la homeostasis del calcio y hierro, la respuesta inmune innata, la producción de ROS y en la muerte celular programada (apoptosis) (116). Mutaciones en cualquier gen que codifique una proteína mitocondrial puede conducir a una disfunción mitocondrial dando lugar a los trastornos primarios mitocondriales, los cuales suelen afectar a varios órganos (116,117). Pero la disfunción mitocondrial también se puede producir por toxinas endógenas y exógenas. Los hepatocitos son uno de los tipos celulares con mayor densidad de mitocondrias dada su alta actividad metabólica que requiere la síntesis continua de ATP, por este motivo son más susceptibles a aquellos factores que afectan a la función mitocondrial como el alcohol, drogas, sobrecarga de cobre y hierro, y la colestasis (118).

Tanto en estudio en modelos animales como en humanos se han documentado alteraciones mitocondriales en diversas enfermedades hepáticas como en el daño hepático inducido por drogas (66), la enfermedad hepática grasa no alcohólica (67), la enfermedad hepática alcohólica (119), hepatitis virales (120) y colestasis (121), y se ha propuesto a la disfunción mitocondrial como un mecanismo común en sus patogenias y en la progresión del daño hepático. Por lo tanto, el estudio del papel de la mitocondria en estas hepatopatías puede mejorar el conocimiento de los mecanismos patogénicos y permitir el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos.

La colestasis, definida como cualquier condición que causa retención y acumulación de ácidos biliares potencialmente tóxicos en el hígado, puede ser desencadenada por diferentes causas, como la inflamación, infección viral, tóxicos, enfermedades autoinmunes u obstrucción del árbol biliar, e induce muerte celular, inflamación y fibrosis hepática (122). Varios estudios sugieren un papel primordial de la mitocondria en la fisiopatología de la colestasis hepática, participando en varios pasos relacionados con la progresión de la enfermedad (71,72,78). Se ha observado una reducción de la función mitocondrial durante la colestasis experimental, pero los mecanismos específicos causantes de esta disfunción en la colestasis hepática son aún controvertidos. Por este motivo en nuestro trabajo hemos estudiado el papel de la mitocondria en la colestasis hepática, centrándonos en la proteína mitocondrial MCJ, inhibidor endógeno de la función mitocondrial. Para ello hemos empleado como modelos la adición de altas concentraciones de un ácido biliar a hepatocitos cultivados in vitro, y la LCB in vivo; ambos modelos bien establecidos de toxicidad a hepatocitos (123,124).

La CBP y la CEP son las dos enfermedades colestásicas crónicas del adulto más frecuentes cuya etiopatogenia es desconocida. Cada año se diagnostica un mayor número de casos nuevos debido, probablemente, a la mayor detección de casos silentes y asintomáticos como consecuencia del mayor conocimiento de la patología y de la mejora de las técnicas diagnósticas. La CBP generalmente tiene un curso evolutivo lento, pero hasta un 30% de los pacientes pueden desarrollar tempranamente fibrosis y fallo hepático (125). La respuesta al tratamiento con UDCA en la CBP ha demostrado aumentar la supervivencia en estos pacientes; no obstante, se ha determinado que

alrededor del 35-40% de los pacientes presentan una respuesta insuficiente a UDCA y el 5% son intolerantes, estando estos pacientes en riesgo de progresión a cirrosis (126). Además, no existe un tratamiento médico eficaz para la CEP, por lo que invariablemente esta patología progresa a cirrosis. Nuestro estudio puede allanar el camino para el desarrollo de biomarcadores pronósticos y de nuevos enfoques terapéuticos en estas patologías hepáticas tan relevante.

MCJ es una proteína de la membrana mitocondrial interna identificada como un inhibidor endógeno de la respiración mitocondrial en el corazón, en células T y en macrófagos (91,100,101), y recientemente en hígado por nuestro grupo (102). Parece que interactúa con el complejo I de la CTE inhibiendo su actividad. Este hallazgo novedoso ha dado a conocer uno de los pocos inhibidores endógenos de la función mitocondrial en mamíferos y ha abierto una nueva área de investigación para las enfermedades asociadas a la disfunción mitocondrial como las enfermedades hepáticas. El modelo de ratón MCJ-KO nos ha permitido estudiar el papel de la mitocondria en la toxicidad por ácidos biliares.

Dado el efecto regulador de MCJ sobre la actividad mitocondrial, investigamos si dicha proteína puede modular el daño hepático causado por colestasis. Lo primero que apreciamos fue una mayor supervivencia de ratones MJC-KO tras la LCB frente a los ratones WT, que se tradujo en un menor daño a nivel hepático. Los ratones WT presentaron a nivel hepático un daño histológico más severo, detectando mayor infiltración de macrófagos y más áreas necróticas, aunque esto último no fue significativo probablemente por el corto periodo de tiempo de evaluación (48 horas). Acorde con estos resultados, encontramos una mayor activación de JNK (p-JNK) en los ratones WT. JNK pertenece a la familia de las MAPKs cuya activación sostenida contribuye al desarrollo de inflamación, fibrosis, e incluso a la carcinogénesis (87). El menor daño a nivel hepático de los ratones MCJ-KO con LCB explica la baja expresión de genes relacionados con la biogénesis mitocondrial; en el caso de los ratones WT esta expresión aumenta como mecanismo compensador al daño mitocondrial para, probablemente, descender con el avance del daño hepático y la disfunción mitocondrial.

La propia colestasis da lugar a cambios en la expresión de genes y enzimas relacionados con la formación de bilis y de los sistemas de transporte hepatobiliares como mecanismo adaptativo. El principal regulador de todo esto es FXR, cuya activación por la acumulación de ácidos biliares reduce la concentración hepatocelular de ácidos biliares y su citotoxicidad al regular la expresión de transportadores de los componentes biliares (122). Por este motivo, cabe pensar que el menor daño hepático en los ratones MCJ-KO sea consecuencia de una mayor regulación de estos mecanismos, y por ello medimos la cantidad de ácidos biliares totales y sus tipos en suero y a nivel hepático en los ratones tras la LCB. No encontramos diferencias a ningún nivel, indicándonos una escasa acción de MCJ sobre la síntesis de ácidos biliares, pero no podemos descartar una acción sobre el transporte biliar. Es posible que a las 48 horas de la LCB aún no se aprecien los cambios en la composición biliar. De hecho, en los estudios in vitro, a nivel del hepatocito, observamos una mayor expresión génica de MDR2, BSEP y del inductor

transcripcional de ambos, FXR, en los hepatocitos deficientes en MCJ. MDR2 (homólogo murino de MDR3 humano) es el transportador de fosfolípidos de la membrana canalicular, los cuales son necesarios en la bilis para la formación de micelas mixtas y de este modo proteger al epitelio del ducto biliar de las propiedades detergentes de los ácidos biliares. BSEP es la principal bomba de exportación de ácidos biliares monovalentes y su expresión o función deficiente es causa de colestasis (122). Estos resultados nos sugieren una modulación de la expresión del gen de FXR y/o de los exportadores canaliculares dependiente de MCJ, aunque los mecanismos precisos quedan por determinar.

Al igual que lo observado en los estudios *in vivo*, la administración de DCA a hepatocitos WT y MCJ-KO mostró un claro efecto protector de la ausencia de MCJ al detectar menor apoptosis en estos últimos. De manera interesante, encontramos que el silenciamiento de MCJ en hepatocitos WT contrarrestó la toxicidad por ácidos biliares, mientras que la restauración de la expresión de MCJ en hepatocitos MCJ-KO revirtió completamente la protección que les confería la ausencia de MCJ.

La mitocondria es la principal fuente de energía de los hepatocitos ya que se encargan de generar ATP. Los carbohidratos (glucosa), los lípidos (ácidos grasos) y las proteínas (aminoácidos) convertidos en Acetil-CoA se oxidan en una serie de reacciones químicas que en su conjunto se denominan el ciclo de Krebs, generando ATP y agentes reductores, nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y flavín adenín dinucleótido (FADH<sub>2</sub>), que serán utilizados en numerosas reacciones bioquímicas. Estas moléculas reductoras se oxidan aún más a través de la fosforilación oxidativa por la cadena transportadora de electrones mitocondrial para producir más ATP (127). Este proceso metabólico de la fosforilación oxidativa juega un papel clave en la iniciación y progresión de las enfermedades hepáticas ya que es fuente de ROS, los cuales inducen la expresión de citoquinas proinflamatorias y desencadenan señales de muerte (128). De hecho, estudios previos han mostrado que el estrés oxidativo y la influencia de la mitocondria es el elemento más importante durante las primeras fases de la colestasis (121). En nuestro estudio vemos que ya a los 30 minutos de la administración de DCA a los hepatocitos WT aumenta la producción de ROS. Este resultado por una parte corrobora la importancia del estrés oxidativo en el daño hepático por colestasis, y por otra nos indica una acción directa de los ácidos biliares sobre componentes de la cadena respiratoria mitocondrial y/o sobre la membrana mitocondrial.

Los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial se pueden unir formando supercomplejos respiratorios o respirasomas. Estas formaciones reúnen al complejo I, III y IV facilitando el transporte de electrones y minimizando su fuga y, por lo tanto, la producción de ROS (129). Se sabe que MCJ interfiere con la formación de supercomplejos en el corazón y células T (91,100), pero se desconocía su acción a nivel hepático. En un estudio reciente de nuestro grupo examinamos si MCJ podía regular la agregación de supercomplejos en condiciones metabólicas alteradas como la hepatotoxicidad por acetaminofén (APAP) (102). En él demostramos que el APAP a dosis tóxicas interrumpe la formación de estos supercomplejos tanto en hepatocitos como en

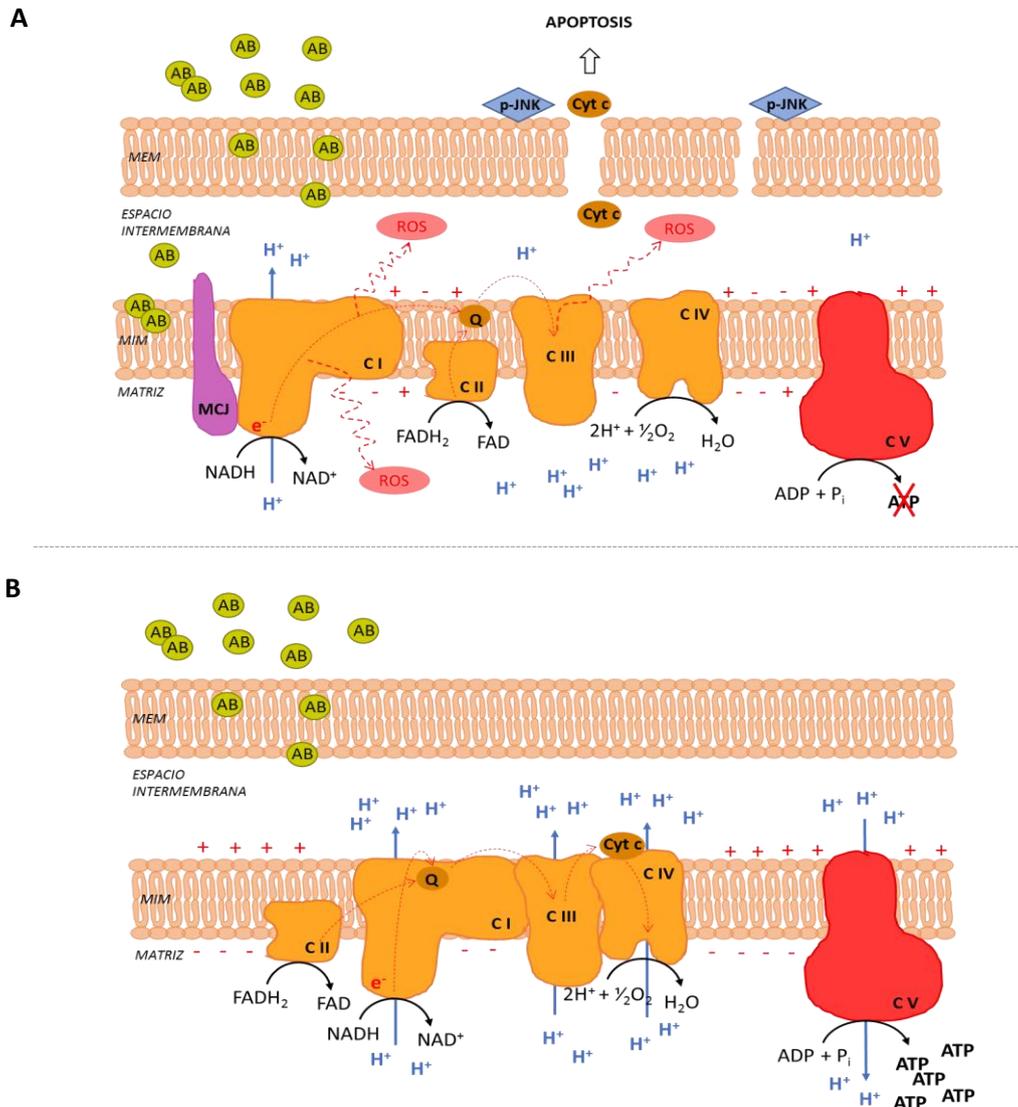
el hígado de ratones WT conduciendo a una mayor producción de ROS debido a la elevada fuga de electrones. Además, mostramos que, en ausencia de MCJ, los supercomplejos son resistentes a la acción del APAP en las mitocondrias hepáticas, por lo que la desagregación de los supercomplejos mediada por APAP depende de MCJ. En este sentido, en nuestro estudio actual podemos inferir conclusiones similares. Los ácidos biliares tóxicos pueden interferir en la formación de supercomplejos, lo que explicaría el aumento de ROS. Como en el caso de la hepatotoxicidad por APAP, la administración tóxica de ácidos biliares en hepatocitos deficientes en MCJ no provocó cambios en la producción de ROS, por lo que es posible que los ácidos biliares tóxicos promuevan la interacción de MCJ con el complejo I interfiriendo en su asociación al complejo III (Fig. 6.1). Por lo tanto, unos niveles altos de MCJ pueden predecir una mayor susceptibilidad a la colestasis.

Otro mecanismo por el cual los ácidos biliares pueden desencadenar el aumento en la producción de ROS puede ser mediante su interacción directa con la membrana mitocondrial. Aquí mostramos que el potencial de membrana mitocondrial en hepatocitos WT desciende con la administración de DCA lo que indica una pérdida del gradiente eléctrico y químico que conlleva a una producción excesiva de ROS. Por lo tanto, los ácidos biliares pueden incorporarse a la membrana mitocondrial alterando su permeabilidad y el potencial de membrana. Además, vemos que ante la ausencia de MCJ, los hepatocitos son más resistentes a esta despolarización. Tal vez la presencia de MCJ favorezca la incorporación de los ácidos biliares a la membrana mitocondrial y la modificación de su composición, o sea consecuencia de una mayor activación de JNK.

Los ROS actúan como agentes oxidantes generando daño a diversas estructuras celulares, incluyendo DNA, proteínas y membranas lipídicas como la mitocondrial conduciendo a la disfunción mitocondrial y a la generación perpetua de ROS (130). Además, ROS induce la expresión de citoquinas inflamatorias y la activación de JNK. Acorde con esto, junto con la menor producción de ROS, encontramos una menor expresión génica de varias citoquinas inflamatorias y una menor activación de JNK (p-JNK) en los hepatocitos deficientes en MCJ. Como mencioné anteriormente, JNK pertenece a la familia de las MAPK, y en el hígado es el efector de las MAPK dominante que cataliza la fosforilación de numerosas proteínas (87). JNK activado se transloca a la mitocondria donde se une a una proteína de la membrana externa mitocondrial desencadenando una permeabilidad transitoria mitocondrial que disipa el gradiente necesario para la fosforilación oxidativa y permite la salida de factores apoptóticos como el citocromo c, lo que conduce finalmente a la muerte del hepatocito (Fig. 6.1). De hecho, la inhibición de la interacción entre p-JNK y la mitocondria y la reducción de la producción de ROS mitocondrial, reduce la lesión hepática en modelos murinos (87). Por lo que la inhibición de MCJ puede reducir la afectación hepática por colestasis al bloquear la sobreproducción de ROS y la activación de JNK.

La presencia de mayor número de mitocondrias metabólicamente activas y mayor producción de ATP en los hepatocitos MCJ-KO tratados con DCA va a favor de la interacción de los ácidos biliares tanto con la CTE como con la membrana mitocondrial,

así como de la importancia de MCJ en el daño por colestasis. Podemos decir que esta interacción de los ácidos biliares con la mitocondria es dependiente de la expresión de MCJ, y que bloqueando MCJ protegemos a los hepatocitos de la toxicidad de los ácidos biliares.



**Fig. 6.1** Representación del daño mitocondrial por ácidos biliares con la presencia (A) y la ausencia (B) de MCJ.

Centrándonos en un posible enfoque terapéutico, observamos un menor daño hepático en los ratones WT con LCB a los que se les había disminuido la expresión de MCJ, lo que hace aún más destacar el papel de MCJ en la patogenia de la colestasis. La menor expresión de la proteína MCJ se logró con la transfección de moléculas de ARN interferente dirigidas a suprimir la expresión del gen de MCJ (siMCJ); y la administración de este siMCJ se llevó a cabo una vez que iniciada la respuesta inflamatoria y fibrótica. Varios ensayos clínicos con este tipo de secuencias de ARN han demostrado una disminución genética eficiente y duradera en el hígado, con resultados clínicos

prometedores y con poca toxicidad (131). Este concepto de MCJ como diana terapéutica es apoyado por la presencia de altos niveles de esta proteína a nivel hepático de pacientes con una enfermedad colestásica crónica, CBP y CEP.

De manera interesante, encontramos que un porcentaje nada despreciable de pacientes con CBP presentaban en suero anticuerpos frente a la proteína MCJ. La mayoría de estos pacientes presentan una enfermedad hepática más avanzada en su histología, por lo que la presencia de estos anticuerpos podría identificar a pacientes con peor pronóstico de una forma no invasiva, pero es necesario comprobar este resultado en cohortes más amplias de pacientes y con mayor número de sujetos con enfermedad colestásica avanzada. Desconocemos el mecanismo que desencadena la formación de estos anticuerpos y si tienen algún papel directo en la patogenia de la enfermedad, pero la más plausible es que su aparición sea consecuencia de un mayor daño celular junto con la pérdida de la inmunotolerancia existente en la CBP.

En resumen, la deficiencia en MCJ protege a los hepatocitos frente a la despolarización de la membrana mitocondrial, la formación de ROS, la activación de JNK y la depleción de ATP consecuencia de la toxicidad por ácidos biliares, lo que conduce a una menor muerte hepatocitaria. Dado nuestros resultados, este estudio demuestra que la proteína MCJ es un importante regulador de la función mitocondrial y del daño hepático asociado a la disfunción mitocondrial que tiene lugar en las enfermedades hepáticas colestásicas, así como en otras patologías como el DILI, donde también hemos demostramos la importancia de esta proteína mitocondrial. Por tanto, MCJ puede ser una diana terapéutica para atenuar la lesión hepática y ralentizar la progresión de las enfermedades colestásicas crónicas que no responden a las terapias actualmente disponibles; así como, un posible biomarcador de mal pronóstico.

## 7. CONCLUSIONES

---



**1. El déficit de MCJ protege y previene el daño hepático por colestasis en el modelo animal de LCB.**

- a) Los ratones con pérdida de MCJ presentan una mayor supervivencia tras la ligadura del conducto biliar.
- b) La expresión de MCJ está regulada por el daño hepático por colestasis.
- c) La ausencia de MCJ protege al tejido hepático de la infiltración inflamatoria y de la activación de JNK, sin afectar a la síntesis de ácidos biliares.
- d) El silenciamiento in vivo de MCJ atenúa la inflamación y la fibrosis hepática producida por la colestasis.

**2. La pérdida de MCJ protege a los hepatocitos de la toxicidad por ácidos biliares.**

- a) El déficit de MCJ previene la formación de ROS, la activación de JNK, la expresión de citoquinas proinflamatorias, y, por tanto, la apoptosis hepatocelular inducido todo ello por la toxicidad de ácidos biliares.
- b) El silenciamiento de MCJ en los hepatocitos disminuye la apoptosis, enfatizando el efecto deletéreo de esta proteína en la colestasis.
- c) La ausencia de MCJ se asocia a una mayor expresión de transportadores hepatobiliares que disminuyen la capacidad citotóxica de los ácidos biliares, indicando una posible modulación de estos mecanismos de transporte biliar por MCJ.
- d) Existe una mayor actividad mitocondrial en los hepatocitos deficientes en MCJ que se traduce en una mayor estabilidad de la membrana mitocondrial y una mayor producción de ATP.

**3. Mayor expresión de MCJ en pacientes con enfermedad hepática colestásica.**

- a) La expresión de MCJ en tejido hepático está incrementada en pacientes diagnosticados de CBP y CEP.
- b) Se detectan anticuerpos anti-MCJ en suero de pacientes con CBP cuya presencia se asocia con una fase avanzada de la enfermedad hepática.

En conjunto, y como conclusiones finales, podemos decir que uno de los mecanismos clave del daño hepático por colestasis es la disfunción mitocondrial, la cual es menor ante la ausencia de la proteína mitocondrial MCJ. Este inhibidor endógeno de la cadena respiratoria mitocondrial emerge como potencial diana terapéutica para mitigar el daño hepático en las enfermedades colestásicas, así como un posible biomarcador de enfermedad hepática avanzada.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**

---



1. Boonstra K, Kunst AE, Stadhouders PH, Tuynman HA, Poen AC, van Nieuwkerk KMJ, et al. Rising incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis: a large population-based study. *Liver Int.* 2014 Jul;34(6):e31–8.
2. Griffiths L, Dyson J, Jones D. The New Epidemiology of Primary Biliary Cirrhosis. *Semin Liver Dis.* 2014 Jul 24;34(03):318–28.
3. Lleo A, Jepsen P, Morengi E, Carbone M, Moroni L, Battezzati PM, et al. Evolving Trends in Female to Male Incidence and Male Mortality of Primary Biliary Cholangitis. *Sci Rep.* 2016 Sep 19;6(1):25906.
4. Molodecky NA, Kareemi H, Parab R, Barkema HW, Quan H, Myers RP, et al. Incidence of primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology.* 2011 May;53(5):1590–9.
5. Jepsen P, Grønbaek L, Vilstrup H. Worldwide Incidence of Autoimmune Liver Disease. *Dig Dis.* 2015;33(2):2–12.
6. Boonstra K, Weersma RK, van Erpecum KJ, Rauws EA, Spanier BWM, Poen AC, et al. Population-based epidemiology, malignancy risk, and outcome of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology.* 2013 Dec;58(6):2045–55.
7. Jones DEJ. Pathogenesis of Primary Biliary Cirrhosis. *Clin Liver Dis.* 2008 May;12(2):305–21.
8. Invernizzi P, Ransom M, Raychaudhuri S, Kosoy R, Lleo A, Shigeta R, et al. Classical HLA-DRB1 and DPB1 alleles account for HLA associations with primary biliary cirrhosis. *Genes Immun.* 2012 Sep 10;13(6):461–8.
9. Liu JZ, Almarri MA, Gaffney DJ, Mells GF, Jostins L, Cordell HJ, et al. Dense fine-mapping study identifies new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nat Genet.* 2012 Oct 9;44(10):1137–41.
10. Mells GF, Floyd JAB, Morley KI, Cordell HJ, Franklin CS, Shin S-Y, et al. Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nat Genet.* 2011 Mar 13;43(4):329–32.
11. Karlsen TH, Franke A, Melum E, Kaser A, Hov JR, Balschun T, et al. Genome-Wide Association Analysis in Primary Sclerosing Cholangitis. *Gastroenterology.* 2010 Mar;138(3):1102–11.
12. Mutimer DJ, Fussey SP, Yeaman SJ, Kelly PJ, James OF, Bassendine MF. Frequency of IgG and IgM autoantibodies to four specific M2 mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1989 Oct;10(4):403–7.
13. Vilagut L, Vila J, Viñas O, Parés A, Ginés A, Jiménez de Anta MT, et al. Cross-reactivity of anti-*Mycobacterium gordonae* antibodies with the major mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 1994 Oct;21(4):673–7.
14. Xu L, Shen Z, Guo L, Fodera B, Keogh A, Joplin R, et al. Does a betaretrovirus infection trigger primary biliary cirrhosis? *Proc Natl Acad Sci.* 2003 Jul 8;100(14):8454–9.
15. Bruggraber SFA, Leung PSC, Amano K, Quan C, Kurth MJ, Nantz MH, et al. Autoreactivity to lipoate and a conjugated form of lipoate in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology.* 2003 Dec;125(6):1705–13.
16. Farh KK-H, Marson A, Zhu J, Kleinewietfeld M, Housley WJ, Beik S, et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature.* 2015

Feb;518(7539):337–43.

17. Liu JZ, Hov JR, Folseraas T, Ellinghaus E, Rushbrook SM, Doncheva NT, et al. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies nine new risk loci for primary sclerosing cholangitis. *Nat Genet.* 2013 Jun 21;45(6):670–5.
18. Dyson JK, Beuers U, Jones DEJ, Lohse AW, Hudson M. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet.* 2018 Feb 13;
19. Liaskou E, Jeffery LE, Trivedi PJ, Reynolds GM, Suresh S, Bruns T, et al. Loss of CD28 expression by liver-infiltrating T cells contributes to pathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology.* 2014 Jul;147(1):221–232.e7.
20. Parés A, Rodés J. Natural history of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis.* 2003 Nov;7(4):779–94.
21. Lammers WJ, van Buuren HR, Hirschfield GM, Janssen HLA, Invernizzi P, Mason AL, et al. Levels of alkaline phosphatase and bilirubin are surrogate end points of outcomes of patients with primary biliary cirrhosis: an international follow-up study. *Gastroenterology.* 2014 Dec;147(6):1338–49.e5; quiz e15.
22. Roll J, Boyer JL, Barry D, Klatskin G. The prognostic importance of clinical and histologic features in asymptomatic and symptomatic primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med.* 1983 Jan 6;308(1):1–7.
23. Corpechot C, Abenavoli L, Rabahi N, Chrétien Y, Andréani T, Johanet C, et al. Biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2008 Sep;48(3):871–7.
24. Kuiper EMM, Hansen BE, de Vries RA, den Ouden–Muller JW, van Ditzhuijsen TJM, Haagsma EB, et al. Improved Prognosis of Patients With Primary Biliary Cirrhosis That Have a Biochemical Response to Ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology.* 2009 Apr;136(4):1281–7.
25. Kumagi T, Guindi M, Fischer SE, Arenovich T, Abdalian R, Coltescu C, et al. Baseline ductopenia and treatment response predict long-term histological progression in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2010 Oct 25;105(10):2186–94.
26. Corpechot C, Chazouillères O, Poupon R. Early primary biliary cirrhosis: biochemical response to treatment and prediction of long-term outcome. *J Hepatol.* 2011 Dec;55(6):1361–7.
27. Corpechot C, Carrat F, Poujol-Robert A, Gaouar F, Wendum D, Chazouillères O, et al. Noninvasive elastography-based assessment of liver fibrosis progression and prognosis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2012 Jul;56(1):198–208.
28. Lo SK, Fleming KA, Chapman RW. A 2-year follow-up study of anti-neutrophil antibody in primary sclerosing cholangitis: relationship to clinical activity, liver biochemistry and ursodeoxycholic acid treatment. *J Hepatol.* 1994 Dec;21(6):974–8.
29. Terjung B, Spengler U. Role of auto-antibodies for the diagnosis of chronic cholestatic liver diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2005 Apr;28(2):115–33.
30. Corpechot C, Gaouar F, El Naggar A, Kemgang A, Wendum D, Poupon R, et al. Baseline values and changes in liver stiffness measured by transient elastography are associated with severity of fibrosis and outcomes of patients with primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology.* 2014 Apr;146(4):970-9; quiz e15-6.

31. Nevens F, Andreone P, Mazzella G, Strasser SI, Bowlus C, Invernizzi P, et al. A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis. *N Engl J Med*. 2016 Aug 18;375(7):631–43.
32. Beuers U, Hohenester S, de Buy Wenniger LJM, Kremer AE, Jansen PLM, Elferink RPJO. The biliary HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies. *Hepatology*. 2010 Oct 18;52(4):1489–96.
33. Takigawa T, Miyazaki H, Kinoshita M, Kawarabayashi N, Nishiyama K, Hatsuse K, et al. Glucocorticoid receptor-dependent immunomodulatory effect of ursodeoxycholic acid on liver lymphocytes in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013 Sep 15;305(6):G427–38.
34. Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest*. 1998 Jun 15;101(12):2790–9.
35. Beuers U. Drug insight: Mechanisms and sites of action of ursodeoxycholic acid in cholestasis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006 Jun 1;3(6):318–28.
36. Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, Clerici C, Costantino G, Maloney PR, et al. 6 $\alpha$ -Ethyl-Chenodeoxycholic Acid (6-ECDCA), a Potent and Selective FXR Agonist Endowed with Anticholestatic Activity. *J Med Chem*. 2002 Aug;45(17):3569–72.
37. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell*. 2000 Sep;6(3):507–15.
38. Plass JRM, Mol O, Heegsma J, Geuken M, Faber KN, Jansen PLM, et al. Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology*. 2002 Mar;35(3):589–96.
39. Huang L, Zhao A, Lew J-L, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, et al. Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *J Biol Chem*. 2003 Dec 19;278(51):51085–90.
40. Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway. *Dig Dis*. 2015 May 27;33(3):327–31.
41. Mudaliar S, Henry RR, Sanyal AJ, Morrow L, Marschall H, Kipnes M, et al. Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2013 Sep;145(3):574–582.e1.
42. Hirschfield GM, Mason A, Luketic V, Lindor K, Gordon SC, Mayo M, et al. Efficacy of Obeticholic Acid in Patients With Primary Biliary Cirrhosis and Inadequate Response to Ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology*. 2015 Apr;148(4):751–761.e8.
43. Kowdley K V., Luketic V, Chapman R, Hirschfield GM, Poupon R, Schramm C, et al. A randomized trial of obeticholic acid monotherapy in patients with primary biliary cholangitis. *Hepatology*. 2018 May;67(5):1890–902.
44. Silveira MG, Lindor KD. Investigational drugs in phase II clinical trials for primary biliary cholangitis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2017 Oct 3;26(10):1115–21.
45. Luo J, Ko B, Elliott M, Zhou M, Lindhout DA, Phung V, et al. A nontumorigenic variant of FGF19 treats cholestatic liver diseases. *Sci Transl Med*. 2014 Jul 30;6(247):247ra100.

46. Floreani A, Mangini C. Primary biliary cholangitis: Old and novel therapy. *Eur J Intern Med.* 2018 Jan;47:1–5.
47. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res.* 2011 Oct;2(4):236–40.
48. Beuers U, Trauner M, Jansen P, Poupon R. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: from UDCA to FXR, PXR and beyond. *J Hepatol.* 2015 Apr;62(1 Suppl):S25-37.
49. Lens S, Leoz M, Nazal L, Bruguera M, Parés A. Bezafibrate normalizes alkaline phosphatase in primary biliary cirrhosis patients with incomplete response to ursodeoxycholic acid. *Liver Int.* 2014 Feb;34(2):197–203.
50. Levy C, Peter JA, Nelson DR, Keach J, Petz J, Cabrera R, et al. Pilot study: fenofibrate for patients with primary biliary cirrhosis and an incomplete response to ursodeoxycholic acid. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Jan;33(2):235–42.
51. Goldstein J, Levy C. Novel and emerging therapies for cholestatic liver diseases. *Liver Int.* 2018 May 14;
52. Angulo P, Jorgensen RA, Keach JC, Dickson ER, Smith C, Lindor KD. Oral budesonide in the treatment of patients with primary biliary cirrhosis with a suboptimal response to ursodeoxycholic acid. *Hepatology.* 2000 Feb;31(2):318–23.
53. Angulo P, Batts KP, Jorgensen RA, LaRusso NA, Lindor KD. Oral budesonide in the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol.* 2000 Sep;95(9):2333–7.
54. Jansen PLM, Ghallab A, Vartak N, Reif R, Schaap FG, Hampe J, et al. The ascending pathophysiology of cholestatic liver disease. *Hepatology.* 2017 Feb;65(2):722–38.
55. Chiang JYL. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res.* 2009 Oct;50(10):1955–66.
56. Maillette de Buy Wenniger L, Beuers U. Bile salts and cholestasis. *Dig Liver Dis.* 2010 Jun;42(6):409–18.
57. Coleman R, Iqbal S, Godfrey PP, Billington D. Membranes and bile formation. Composition of several mammalian biles and their membrane-damaging properties. *Biochem J.* 1979 Jan 15;178(1):201–8.
58. Puglielli L, Amigo L, Arrese M, Núñez L, Rigotti A, Garrido J, et al. Protective role of biliary cholesterol and phospholipid lamellae against bile acid-induced cell damage. *Gastroenterology.* 1994 Jul;107(1):244–54.
59. Anwer MS. Intracellular Signaling by Bile Acids. *J Bio-Science.* 2014 Jan 13;20(0):1–23.
60. Chen W, Owsley E, Yang Y, Stroup D, Chiang JY. Nuclear receptor-mediated repression of human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene transcription by bile acids. *J Lipid Res.* 2001 Sep;42(9):1402–12.
61. Allen K, Jaeschke H, Copple BL. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *Am J Pathol.* 2011 Jan;178(1):175–86.
62. Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Buist-Homan M, Vrenken TE, Havinga R, Poelstra K, et al. Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. *Hepatology.* 2004 Jun;39(6):1563–73.
63. Krähenbühl S, Talos C, Fischer S, Reichen J. Toxicity of bile acids on the electron transport

- chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology*. 1994 Feb;19(2):471–9.
64. Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJ, Palmeira CM. Bile acids affect liver mitochondrial bioenergetics: possible relevance for cholestasis therapy. *Toxicol Sci*. 2000 Sep;57(1):177–85.
  65. Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJ, Palmeira CM. Chenodeoxycholate induction of mitochondrial permeability transition pore is associated with increased membrane fluidity and cytochrome c release: protective role of carvedilol. *Mitochondrion*. 2003 Mar;2(4):305–11.
  66. McGill MR, Sharpe MR, Williams CD, Taha M, Curry SC, Jaeschke H. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *J Clin Invest*. 2012 Apr 2;122(4):1574–83.
  67. Nassir F, Ibdah JA. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):8713–42.
  68. Nassir F, Ibdah JA. Role of mitochondria in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Mar 7;20(9):2136.
  69. Arduini A, Serviddio G, Tormos AM, Monsalve M, Sastre J. Mitochondrial dysfunction in cholestatic liver diseases. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012 Jan 1;4:2233–52.
  70. Krähenbühl S. Alterations in mitochondrial function and morphology in chronic liver disease: pathogenesis and potential for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther*. 1993 Oct;60(1):1–38.
  71. Tiao M-M, Lin T-K, Liou C-W, Wang P-W, Chen J-B, Kuo F-Y, et al. Early transcriptional deregulation of hepatic mitochondrial biogenesis and its consequent effects on murine cholestatic liver injury. *Apoptosis*. 2009 Jul 22;14(7):890–9.
  72. Arduini A, Serviddio G, Escobar J, Tormos AM, Bellanti F, Viña J, et al. Mitochondrial biogenesis fails in secondary biliary cirrhosis in rats leading to mitochondrial DNA depletion and deletions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 Jul;301(1):G119–27.
  73. Koyama K, Ito K, Ouchi K, Sato T. Mitochondrial function of rat liver in biliary obstruction. *Tohoku J Exp Med*. 1980 May;131(1):59–69.
  74. Younes RN, Poggetti RS, Fontes B, Itinoshe MM, Yoshida VM, Carvalho MEA, et al. Obstructive jaundice induces early depression of mitochondrial respiration in rat hepatocytes. *Acta Cir Bras*. 22(4):251–4.
  75. Krähenbühl S, Stucki J, Reichen J. Reduced activity of the electron transport chain in liver mitochondria isolated from rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1992 Jun;15(6):1160–6.
  76. Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJ, Palmeira CM. Chenodeoxycholate is a potent inducer of the permeability transition pore in rat liver mitochondria. *Biosci Rep*. 2001 Feb;21(1):73–80.
  77. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*. 2009 Feb;30(1–2):42–59.
  78. Serviddio G, Pereda J, Pallardó F V, Carretero J, Borrás C, Cutrin J, et al. Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology*. 2004 Mar;39(3):711–20.

79. Yang H, Ko K, Xia M, Li TWH, Oh P, Li J, et al. Induction of avian musculoaponeurotic fibrosarcoma proteins by toxic bile acid inhibits expression of glutathione synthetic enzymes and contributes to cholestatic liver injury in mice. *Hepatology*. 2010 Apr;51(4):1291–301.
80. Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, et al. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest*. 1999 Jan 1;103(1):137–45.
81. Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Canbay A, Gores GJ. Cholestasis increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-R2/DR5 expression and sensitizes the liver to TRAIL-mediated cytotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Nov 1;303(2):461–7.
82. Gäbele E, Froh M, Arteel GE, Uesugi T, Hellerbrand C, Schölmerich J, et al. TNFalpha is required for cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Jan 16;378(3):348–53.
83. Vendemiale G, Grattagliano I, Lupo L, Memeo V, Altomare E. Hepatic oxidative alterations in patients with extra-hepatic cholestasis. Effect of surgical drainage. *J Hepatol*. 2002 Nov;37(5):601–5.
84. Aboutwerat A, Pemberton PW, Smith A, Burrows PC, McMahon RFT, Jain SK, et al. Oxidant stress is a significant feature of primary biliary cirrhosis. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Mar 20;1637(2):142–50.
85. Higuchi H, Gores GJ. IV. Bile acids and death receptors. *Am J Physiol Liver Physiol*. 2003 May;284(5):G734–8.
86. Higuchi M, Proske RJ, Yeh ET. Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition and apoptosis. *Oncogene*. 1998 Nov 12;17(19):2515–24.
87. Win S, Than TA, Zhang J, Oo C, Min RWM, Kaplowitz N. New insights into the role and mechanism of c-Jun-N-terminal kinase signaling in the pathobiology of liver diseases. *Hepatology*. 2018 May;67(5):2013–24.
88. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010 Mar 4;464(7285):104–7.
89. Mitchell C, Robin M-A, Mayeuf A, Mahrouf-Yorgov M, Mansouri A, Hamard M, et al. Protection against Hepatocyte Mitochondrial Dysfunction Delays Fibrosis Progression in Mice. *Am J Pathol*. 2009 Nov;175(5):1929–37.
90. Hsu C-C, Lee H-C, Wei Y-H. Mitochondrial DNA alterations and mitochondrial dysfunction in the progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2013 Dec 21;19(47):8880.
91. Hatle KM, Gummadidala P, Navasa N, Bernardo E, Dodge J, Silverstrim B, et al. MCJ/DnaJC15, an endogenous mitochondrial repressor of the respiratory chain that controls metabolic alterations. *Mol Cell Biol*. 2013 Jun;33(11):2302–14.
92. Huang G, Lu H, Hao A, Ng DCH, Ponniah S, Guo K, et al. GRIM-19, a Cell Death Regulatory Protein, Is Essential for Assembly and Function of Mitochondrial Complex I. *Mol Cell Biol*. 2004 Oct 1;24(19):8447–56.
93. Tammineni P, Anugula C, Mohammed F, Anjaneyulu M, Larner AC, Sepuri NBV. The import of the transcription factor STAT3 into mitochondria depends on GRIM-19, a

- component of the electron transport chain. *J Biol Chem*. 2013 Feb 15;288(7):4723–32.
94. Vukotic M, Oeljeklaus S, Wiese S, Vögtle FN, Meisinger C, Meyer HE, et al. Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metab*. 2012 Mar 7;15(3):336–47.
  95. Shridhar V, Bible KC, Staub J, Avula R, Lee YK, Kalli K, et al. Loss of expression of a new member of the DNAJ protein family confers resistance to chemotherapeutic agents used in the treatment of ovarian cancer. *Cancer Res*. 2001 May 15;61(10):4258–65.
  96. Strathdee G, Davies BR, Vass JK, Siddiqui N, Brown R. Cell type-specific methylation of an intronic CpG island controls expression of the MCJ gene. *Carcinogenesis*. 2004 May 19;25(5):693–701.
  97. Strathdee G, Vass JK, Oien KA, Siddiqui N, Curto-Garcia J, Brown R. Demethylation of the MCJ gene in stage III/IV epithelial ovarian cancer and response to chemotherapy. *Gynecol Oncol*. 2005 Jun;97(3):898–903.
  98. Fernández-Cabezudo MJ, Faour I, Jones K, Champagne DP, Jaloudi MA, Mohamed YA, et al. Deficiency of mitochondrial modulator MCJ promotes chemoresistance in breast cancer. *JCI Insight*. 2016 May 19;1(7).
  99. Navasa N, Martin-Ruiz I, Atondo E, Sutherland JD, Angel Pascual-Itoiz M, Carreras-González A, et al. Ikaros mediates the DNA methylation-independent silencing of MCJ/DNAJC15 gene expression in macrophages. *Sci Rep*. 2015 Sep 30;5:14692.
  100. Champagne DP, Hatle KM, Fortner KA, D'Alessandro A, Thornton TM, Yang R, et al. Fine-Tuning of CD8(+) T Cell Mitochondrial Metabolism by the Respiratory Chain Repressor MCJ Dictates Protection to Influenza Virus. *Immunity*. 2016 Jun 21;44(6):1299–311.
  101. Navasa N, Martín I, Iglesias-Pedraz JM, Beraza N, Atondo E, Izadi H, et al. Regulation of Oxidative Stress by Methylation-Controlled J Protein Controls Macrophage Responses to Inflammatory Insults. *J Infect Dis*. 2015 Jan 1;211(1):135–45.
  102. Barbier-Torres L, Iruzubieta P, Fernández-Ramos D, Delgado TC, Taibo D, Guitiérrez-de-Juan V, et al. The mitochondrial negative regulator MCJ is a therapeutic target for acetaminophen-induced liver injury. *Nat Commun*. 2017 Dec 12;8(1):2068.
  103. Rosenthal N, Brown S. The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nat Cell Biol*. 2007 Sep 1;9(9):993–9.
  104. Perlman RL. Mouse Models of Human Disease: An Evolutionary Perspective. *Evol Med Public Heal*. 2016 Apr 27;2016(1):eow014.
  105. Tag CG, Sauer-Lehnen S, Weiskirchen S, Borkham-Kamphorst E, Tolba RH, Tacke F, et al. Bile Duct Ligation in Mice: Induction of Inflammatory Liver Injury and Fibrosis by Obstructive Cholestasis. *J Vis Exp*. 2015 Feb 10;(96).
  106. Heinrich S, Georgiev P, Weber A, Vergopoulos A, Graf R, Clavien P-A. Partial bile duct ligation in mice: a novel model of acute cholestasis. *Surgery*. 2011 Mar;149(3):445–51.
  107. Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, et al. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg*. 2008 May;95(5):646–56.
  108. Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y, Werneburg N, Takimoto R, El-Deiry W, et al. The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail-receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *J Biol Chem*. 2001 Oct 19;276(42):38610–8.

109. Benz C, Angermüller S, Otto G, Sauer P, Stremmel W, Stiehl A. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile acid-induced apoptosis in primary human hepatocytes. *Eur J Clin Invest*. 2000 Mar;30(3):203–9.
110. Woolbright BL, Jaeschke H. Novel insight into mechanisms of cholestatic liver injury. *World J Gastroenterol*. 2012 Sep 28;18(36):4985.
111. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol*. 1984 Jun;65(3):305–11.
112. Geerts AM, Vanheule E, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *Int J Exp Pathol*. 2008 Aug 17;89(4):251–63.
113. Aller M-A, Arias J-L, Prieto I, Losada M, Arias J. Bile duct ligation: step-by-step to cholangiocyte inflammatory tumorigenesis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Jun;22(6):651–61.
114. Nytofte NS, Serrano MA, Monte MJ, Gonzalez-Sanchez E, Tumer Z, Ladefoged K, et al. A homozygous nonsense mutation (c.214C>A) in the biliverdin reductase alpha gene (BLVRA) results in accumulation of biliverdin during episodes of cholestasis. *J Med Genet*. 2011 Apr 1;48(4):219–25.
115. YE L, LIU S, WANG M, SHAO Y, DING M. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Chromatogr B*. 2007 Dec 1;860(1):10–7.
116. Koopman WJH, Willems PHGM, Smeitink JAM. Monogenic Mitochondrial Disorders. *N Engl J Med*. 2012 Mar 22;366(12):1132–41.
117. Lee WS, Sokol RJ. Mitochondrial hepatopathies: advances in genetics, therapeutic approaches, and outcomes. *J Pediatr*. 2013 Oct;163(4):942–8.
118. Lee W, Sokol R. Liver Disease in Mitochondrial Disorders. *Semin Liver Dis*. 2007 Aug;27(3):259–73.
119. Larosche I, Lettéron P, Berson A, Fromenty B, Huang T-T, Moreau R, et al. Hepatic mitochondrial DNA depletion after an alcohol binge in mice: probable role of peroxynitrite and modulation by manganese superoxide dismutase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Mar 1;332(3):886–97.
120. Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM, et al. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology*. 2002 Feb;122(2):366–75.
121. Tiao M-M, Lin T-K, Kuo F-Y, Huang C-C, Du Y-Y, Chen C-L, et al. Early stage of biliary atresia is associated with significant changes in 8-hydroxydeoxyguanosine and mitochondrial copy number. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007 Sep;45(3):329–34.
122. Wagner M, Zollner G, Trauner M. New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *J Hepatol*. 2009 Sep;51(3):565–80.
123. Schölmerich J, Becher MS, Schmidt K, Schubert R, Kremer B, Feldhaus S, et al. Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties--studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles. *Hepatology*. 4(4):661–6.
124. Schaffner F, Bacchin PG, Hutterer F, Scharnbeck HH, Sarkozi LL, Denk H, et al. Mechanism of cholestasis. 4. Structural and biochemical changes in the liver and serum in rats after

- bile duct ligation. *Gastroenterology*. 1971 May;60(5):888–97.
125. Corpechot C, Chrétien Y, Chazouillères O, Poupon R. Demographic, lifestyle, medical and familial factors associated with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2010 Jul;53(1):162–9.
  126. Parés A. Treatment of primary biliary cirrhosis: Is there more to offer than ursodeoxycholic acid? *Clin Liver Dis*. 2014 Feb 1;3(2):29–33.
  127. Papa S, Martino PL, Capitanio G, Gaballo A, De Rasmio D, Signorile A, et al. The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria. In: *Advances in experimental medicine and biology*. 2012. p. 3–37.
  128. Krähenbühl L, Schäfer M, Krähenbühl S. Reversibility of hepatic mitochondrial damage in rats with long-term cholestasis. *J Hepatol*. 1998 Jun;28(6):1000–7.
  129. Letts JA, Fiedorczuk K, Sazanov LA. The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature*. 2016 Sep 21;537(7622):644–8.
  130. Song B-J, Akbar M, Abdelmegeed MA, Byun K, Lee B, Yoon SK, et al. Mitochondrial dysfunction and tissue injury by alcohol, high fat, nonalcoholic substances and pathological conditions through post-translational protein modifications. *Redox Biol*. 2014;3:109–23.
  131. Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet*. 2015 Sep 1;16(9):543–52.