



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PARTICIPACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE COLESTEROL ABCA1 EN EL DESARROLLO DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (HGNA) EN SUJETOS CON OBESIDAD MÓRBIDA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Joel Vega Badillo

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Samuel Canizales Quinteros
[Facultad de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando
[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán](#)

Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Ciudad de México. Agosto, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**VoBo Tutor,
Revisión de tesis de doctorado**

11/ 06 / 2016

Subcomité Académico

Yo Dr.(a): Samuel Canizales Quinteros

Tutor (asesor de tesis) del estudiante: Joel Vega Badillo

Manifiesto haber leído, revisado y corregido el manuscrito de tesis que lleva como título:

PARTICIPACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE COLESTEROL ABCA1 EN EL DESARROLLO DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (HGNA) EN SUJETOS CON OBESIDAD MÓRBIDA.

Por lo que autorizo a que sea entregado para su revisión a los sinodales que el Subcomité Académico asigne para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas por la Universidad Nacional Autónoma de México.

Atentamente

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Samuel Canizales Quinteros', is written over a horizontal line.

Dr. Samuel Canizales Quinteros

Tutor

PMDCB/769/2016...2a

Joel Vega Badillo
Alumno del Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 16 de mayo del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Participación del transportador de colesterol ABCA1 en el desarrollo del hígado graso no alcohólico (HGNA) en sujetos con obesidad mórbida**", dirigida por el Dr. Samuel Canizales Quinteros.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
VOCAL	Dr. Julio Isael Pérez Carreón
VOCAL	Dra. Ileana Patricia Canto Cetina
VOCAL	Dr. Gerardo Gamba Ayala
SECRETARIO	Dr. José Pedraza Chaverri

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de mayo de 2016
Coordinadora del Subcomité Académico

Soledad Funes

Dra. Soledad Funes Argüello

C.c.p. Tutor
C.c.p. Archivo

SFA*Igg

contacto:mdcbq@posgrado.unam.mx tel. 56237006

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del
Dr. Samuel Canizales Quinteros
en la **Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud**,
de la **Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México**
en el **Instituto Nacional de Medicina Genómica**.
Para la realización del mismo se contó con los financiamientos del Consejo
Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, SALUD-2012-01-182801),
PAPIIT-UNAM (IA202413) y de la Fundación Miguel Alemán, A.C.

DEDICATORIA

A Mary Cruz Márquez Hdez

A mis padres y a mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Samuel Canizales Quinteros por su apoyo, dirección, profesionalismo y por compartir conmigo su experiencia y conocimiento en la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando y al Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz por formar parte de mi comité tutorial, y por su valiosa asesoría en la realización de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por permitir ampliar mi visión y conocimiento, y despertar en mí, el interés por la investigación.

A los miembros del jurado Dr. Armando Roberto Tovar Palacio, Dr. Julio Isael Pérez Carreón, Dra. Ileana Patricia Canto Cetina, Dr. Gerardo Gamba Ayala y al Dr. José Pedraza Chaverri por su asesoría en la escritura de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio Blanca, Sofía, Maricela, Leo, Luis, Roxana, Laura, Elena y Cristina por su apoyo y orientación, así como a Pao, Hugo y Fausto por la incansable discusión de los proyectos, y por las tardes de café tan divertidas.

A la colaboración del Dr. Francisco Campos Pérez, de la Clínica Integral de cirugía para la Obesidad y Enfermedades Metabólicas del Hospital General “Dr. Rubén Leñero”.

A Mary Cruz Márquez Hdez por su amor y cariño, y por compartir conmigo este proyecto y todas las aventuras de mi vida.

A mis padres y a mi familia por animarme a seguir adelante.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo con la beca: 256502 y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el aporte económico para asistir al congreso de la “Semana Nacional de Gastroenterología”, 2012, Mérida Yucatán; al congreso internacional “Liver meeting”, 2013, Washington DC, y a la estancia con el Dr. Phillip D. Zamore en la “University of Massachusetts Medical School, RNA Therapeutics Institute”, 2014, Massachusetts, EUA.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
Abreviaturas	5
1 INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Hígado graso no alcohólico (HGNA)	7
1.1.1 Definición.....	7
1.1.2 Diagnóstico del HGNA.....	7
1.1.3 Prevalencia del HGNA.....	8
1.1.4 Historia Natural del HGNA.....	9
1.2 Etiopatogenia del HGNA	10
1.3 Patogénesis del HGNA	10
1.4 Toxicidad del colesterol en el HGNA.....	12
1.4.1 Disfunción mitocondrial por colesterol.....	12
1.4.2 Estrés en el retículo endoplasmático (RE) inducido por colesterol	13
1.4.3 Inducción de células Kupffer (CKs) y activación de células estelares hepáticas (CEHs) por colesterol.....	14
1.4.4 Formación de cristales de colesterol en la EHNA.....	15
1.5 Desequilibrio en la homeostasis del colesterol hepático en el HGNA	15
1.6 Transportadores de eflujo colesterol ABCA1 y ABCG1 e HGNA	18
1.6.1 Estructura y función de ABCA1 y ABCG1.....	18
1.6.2 Transportadores del eflujo de colesterol <i>ABCA1</i> y <i>ABCG1</i> como genes candidato en el desarrollo del HGNA	19
1.7 Regulación post-trancricional de los transportadores del eflujo de colesterol ABCA1 y ABCG1 por microRNAs	22
1.7.1 Biogénesis de los microRNAs	22
1.7.2 Regulación de los transportadores del eflujo de colesterol ABCA1 y ABCG1 por miR-33	23
1.7.3 Regulación de ABCA1 por miR-144.....	25
1.8 Otros genes blanco para miR-33 y miR-144.....	26
1.8.1 Modulación de CROT, CPT1A y HADHB por miR-33	26
1.8.2 Modulación de TLR-2 por miR-144.....	30
2 JUSTIFICACIÓN	32
3 HIPÓTESIS.....	33
4 OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo general.....	34
4.2 Objetivos específicos	34
5 MÉTODOS	35
5.1 Grupo de estudio.....	35
5.2 Parámetros bioquímicos y clínicos	36
5.3 Histología hepática.....	37
5.4 Medición del contenido de lípidos hepáticos.	38
5.5 Análisis del nivel de mRNA.....	38
5.6 Análisis del nivel de los microRNAs	40
5.7 Cuantificación de proteína mediante inmunodetección tipo western.....	40

5.8	Detección por inmunohistoquímica	42
5.9	Análisis estadísticos.....	42
	RESULTADOS	44
6	44
6.1	Características bioquímicas y clínicas	44
6.2	Evaluación histológica	44
6.3	Determinación del contenido de lípidos hepáticos.....	46
6.4	Asociación de la proteína hepática de ABCA1 y ABCG1 con HGNA	46
6.5	Correlaciones de la proteína hepática de ABCA1 y ABCG1 con los parámetros bioquímicos y con el contenido de lípidos hepáticos	50
6.6	Correlación del nivel de miR-33a y miR-144 con la expresión de los genes <i>ABCA1</i> y <i>ABCG1</i> en biopsias hepáticas	50
6.7	Asociación del nivel de miR-33a y miR-144 con HGNA	52
6.8	Correlación del nivel de miR-33a con la expresión de los genes <i>CROT</i> , <i>CPT1A</i> y <i>HADHB</i> , y asociación con HGNA.....	54
6.9	Correlación entre el nivel hepático de miR-144 y su gen blanco <i>TLR2</i> , y asociación con HGNA	56
7	DISCUSIÓN.....	59
7.1	Incremento en los niveles de colesterol libre en sujetos con esteatohepatitis.....	59
7.2	Participación de los transportadores de colesterol ABCA1 y ABCG1 en el HGNA	60
7.3	Correlación de las concentraciones plasmáticas de adiponectina con las concentraciones hepáticas de la proteína ABCA1.....	63
7.4	Correlación del nivel de miR-33 a y b con la expresión hepática de los genes <i>ABCA1</i> y <i>ABCG1</i> , y asociación con el HGNA	64
7.5	Correlación del nivel de miR-144 con la expresión del gen <i>ABCA1</i> , y asociación con HGNA	66
	Otros genes blanco para miR-33	67
7.6	67
7.7	Asociación de la expresión del gen <i>TLR-2</i> con el nivel hepático de miR-144 e HGNA	68
8	CONCLUSIONES.....	70
9	PERSPECTIVAS	71
10	REFERENCIAS	72
11	ANEXOS.....	83
12	PUBLICACIÓN	85
13	OTRAS PUBLICACIONES.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Historia natural del HGNA. _____	10
Figura 2: Homeostasis del colesterol hepático. _____	16
Figura 3: Estructura de la proteína de ABCA1. _____	18
Figura 4: Modelo de ABCA1 modulando el eflujo de colesterol. _____	20

Figura 5: Biogénesis de los microRNAs.	24
Figura 6: Modelo de regulación de miR-33.	25
Figura 7: Diagrama de las subunidades de la proteína trifuncional (MTP).	28
Figura 8: Diagrama representativo de la inhibición de enzimas clave, que participan en la degradación de los ácidos grasos por miR-33a/b.	29
Figura 9: Frecuencia del HGNA en la población de estudio.	46
Figura 10: La concentración reducida de la proteína ABCA1 y ABCG1 está asociada con HGNA.	48
Figura 11: Micrografías representativas de la detección de ABCA1 mediante inmunohistoquímica.	49
Figura 12: La concentración reducida de la proteína ABCA1 y ABCG1 se asocia con fibrosis grado 2.	49
Figura 13: El nivel de miR-33a y miR-144 está incrementado en sujetos con EHNA.	53
Figura 14: Distribución de los niveles de miR-33a y miR-144 en diferentes grados de fibrosis.	54
Figura 15: Niveles de mRNA de CROT, HADHB y CPT1A en los diferentes estadios del HGNA.	56
Figura 16: Relación de la concentración de proteína de CROT y HADHB con HGNA.	57
Figura 17: Relación de la expresión del gen <i>TLR2</i> con HGNA.	58

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Clasificación de las características histológicas empleadas por Kleiner para la determinación de EHNA.	37
Tabla 2: Lista de oligonucleótidos y sondas empleados para cuantificar el nivel de mRNA.	39
Tabla 3: Lista de anticuerpos empleados para determinar la concentración de proteína.	41
Tabla 4: Parámetros antropométricos y bioquímicos de los pacientes de estudio.	45
Tabla 5: Asociación del contenido de lípidos hepáticos con HGNA.	47
Tabla 6: Correlaciones entre las concentraciones de las proteínas de ABCA1/ABCG1 y los parámetros bioquímicos.	51
Tabla 7: Correlaciones entre el nivel hepático de microRNAs y la expresión de los genes <i>ABCA1/ABCG1</i> .	52
Tabla 8: Correlación del nivel de miR-33a con el de mRNA de sus genes blanco en el metabolismo de los ácidos grasos.	55
Tabla 9: Correlación del nivel de miR-144 con la expresión del gen <i>TLR2</i> .	57

RESUMEN

Diversos estudios han revelado que el metabolismo anormal de colesterol hepático podría contribuir a la patogénesis de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Sin embargo, aunque se conoce que el transportador A1 dependiente de unión a ATP (ABCA1) tiene una participación crucial en el eflujo del colesterol, su relación con el hígado graso no alcohólico (HGNA) no se ha dilucidado completamente. Se ha observado que miR-33 y miR-144 regulan la expresión de *ABCA1*, así como de otros genes involucrados en el eflujo de colesterol, oxidación de ácidos grasos (AG) e inflamación. Por tanto, en este trabajo se exploró la relación entre el HGNA y la expresión hepática de los transportadores A1 y G1 dependiente de unión a ATP (*ABCA1* y *ABCG1*), y otros genes participantes en el catabolismo de los AG regulados por miR-33, incluyendo carnitina O-octanoiltransferasa (*CROT*), carnitina palmitoiltransferasa 1A (*CPT1A*) y la hidroxiacil-CoA-dehidrogenasa (*HADHB*), así como el gen receptor 2 Tipo Toll (TLR2) regulado por miR-144. Finalmente, se determinó si la expresión de estos genes correlaciona con la expresión hepática de miR-33a/b y miR-144 en sujetos con obesidad clase II/III. El estudio incluyó cuatro grupos de sujetos: Diez sujetos que presentaron histología hepática normal (controles), 17 con esteatosis simple (ES), 19 con EHNA limítrofe (EHNA-L) y 38 casos con EHNA. Se obtuvieron biopsias hepáticas para la determinación del contenido hepático de colesterol libre, colesterol total, fosfolípidos y triglicéridos, así como la expresión de los genes *ABCA1*, *ABCG1*, *CROT*, *CPT1A*, *HADHB*, *TLR2*, miR-33a/b y miR-144. Los resultados revelaron que el contenido hepático de colesterol total y colesterol libre aumentaron 50% y 45% particularmente en el grupo de sujetos con EHNA, en comparación con los sujetos sin EHNA ($P=0.016$ y $P=0.037$, respectivamente), mientras que el contenido de triglicéridos incrementó significativamente en los sujetos con ES, EHNA-L y EHNA ($P<0.01$). Las concentraciones de la proteína ABCA1 y ABCG1 disminuyeron significativamente con la progresión a EHNA (2-3 y de 1-2 veces, respectivamente, $P<0.05$), mientras que los niveles de miR-33a y miR-144 aumentaron de manera significativa ($P=0.006$ y $P=0.024$, respectivamente). El nivel de miR-33a y

miR-144 correlacionó inversamente con la concentración de la proteína ABCA1 ($r=-0.305$, $P=0.006$; $r=-0.229$, $P=0.024$, respectivamente), pero no con ABCG1 ($P>0.2$). Por otra parte, aunque el nivel de miR-33a correlacionó inversamente con el nivel de mRNA de CROT ($r=-0.185$, $P=0.140$), HADHB ($r=-0.238$, $P=0.056$) y CPT1A (-0.058 , $P=0.650$), sólo correlacionó inversa y significativamente con la concentración de la proteína CROT ($r=-0.271$, $P=0.028$). El nivel de miR-144 no correlacionó de manera significativa con la expresión del gen *TLR2* ($P>0.05$). A su vez, la expresión de los genes *CROT*, *HADHB*, *CPT1A* y *TLR2* no se asoció con EHNA.

En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que un mayor nivel de miR-33a y miR-144 en el hígado, así como una menor concentración de proteína de su gen blanco *ABCA1* contribuyen a la patogénesis de la EHNA en sujetos con obesidad.

ABSTRACT

Several studies show that an abnormal cholesterol metabolism may contribute to the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Although the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) is known to have a crucial role in cholesterol efflux, its role in human non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is not fully understood. miR-33 and miR-144 regulate *ABCA1* expression and other target genes involved in cholesterol efflux, fatty acid (FA) oxidation, and inflammation. Thus, in this study, we explored relationships between NAFLD and the hepatic expression of the ATP-binding cassette transporters A1 and G1 (*ABCA1* and *ABCG1*), as well as other target genes related to catabolism of FA regulated by miR-33, including carnitine *O*-octanoyltransferase (*CROT*), carnitine palmitoyltransferase 1A (*CPT1A*) and hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (*HADHB*) and by miR-144 as toll-like receptor-2 (*TLR2*). Finally, we evaluated whether the hepatic expression of these genes is correlated with miR-33a/b and miR-144 expression in individuals with class II/III obesity.

Four groups of subjects were studied: Ten subjects with normal liver histology (controls), 17 with simple steatosis (SS), 19 with borderline NASH (B-NASH) and 38 NASH cases. Liver biopsies were obtained to measure total cholesterol (HTC), free cholesterol (HFC), phospholipid (HPL) and hepatic triglyceride (HTG) content, as well as *ABCA1*, *ABCG1*, *CROT*, *HADHB*, *TLR2*, miR-33a/b and miR-144 expression.

The results showed that HTC and HFC content were significantly increased in NASH as compared to non-NASH subjects (50%, $P=0.016$ and 45%, $P=0.037$, respectively), while HTG content increased significantly in subjects with SS, B-NASH and NASH ($P<0.01$). *ABCA1* and *ABCG1* protein levels significantly decreased with NASH progression (2-3 and 1-2 fold, respectively, $P<0.05$), while miR-33a and miR-144 increased significantly ($P=0.006$ and $P=0.024$, respectively). miR-33a and miR-144 levels correlated inversely with *ABCA1* ($r=-0.305$, $P=0.006$; $r=-0.229$, $P=0.024$, respectively) but not with *ABCG1* protein levels ($P>0.2$). On the other hand, although miR-33a level correlated inversely with *CROT* ($r=-0.185$, $P=0.140$), *HADHB* ($r=-0.238$, $P=0.056$) and *CPT1A* ($r=-0.058$, $P=0.650$), miR-33a only correlated inversely and significantly with *CROT* protein levels ($r=-0.271$, $P=0.028$). miR-144 level did not show

significant correlation with the expression of TLR2 ($P>0.05$). In turn, the expression of CROT, CPT1A, HADHB and TLR2 was not associated with NASH.

In conclusion, the results of this study suggest that increased hepatic expression of miR-33a and miR-144, as well as lower protein concentrations of its target gene *ABCA1* contribute to the pathogenesis of NASH in obese subjects.

Abreviaturas

AB,s	Ácidos biliares.
ABCA1	Transportador A1 dependiente de unión a ATP.
ABCG1	Transportador G1 dependiente de unión a ATP.
ABCG5	Transportador G5 dependiente de unión a ATP.
ABCG8	Transportador G8 dependiente de unión a ATP.
AG	Ácidos grasos.
AGL	Ácidos grasos libres.
ALT	Alanina amino-transferasa.
anti-HCV	Anticuerpo para hepatitis C.
apoB	Apolipoproteína B.
AST	Aspartato amino-transaminasa.
Bsep	Proteína exportadora de sales biliares.
CD36	Proteína de transporte de ácidos grasos.
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario.
CEH	Células estelares hepáticas.
CKs	Células Kupffer.
CL	Colesterol libre.
CLH	Colesterol libre hepático.
CNTL	Control.
CPT1A	Carnitina palmitoiltransferasa.
CROT	Carnitin O-octanoil transferasa.
CTH	Colesterol total hepático.
Cyp7a1	Colesterol 7 alfa-hidroxilasa.
DAB	3-3'- diaminobencidina.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DO	Densidades ópticas.
DT2	Diabetes tipo 2.
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica.
EHNA-L	Esteatohepatitis no alcohólica limítrofe.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
ES	Esteatosis simple.
EUA	Estados Unidos de América.
F	Fibrosis.
FLH	Fosfolípidos hepáticos.
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa.
HADHB	Hidroxiacil-coenzima A deshidrogenasa, subunidad β.
HBF	Hipobetalipoproteinemia familiar.
HBsAg	Antígeno superficial de la hepatitis B.
HDL	Lipoproteínas de alta densidad.
HDL-C	Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad.
HGNA	Hígado graso no alcohólico.
HMGCR	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa.
HOMA-IR	Modelo de homeostasis para la resistencia a la insulina.
IL-1β	Interleucina 1β.
IL-6	Interleucina 6.

IMC	Índice de masa corporal.
JAK2	Quinasa Janus 2.
LDL	Lipoproteínas de baja densidad.
LDL-R	Receptor de las lipoproteínas de baja densidad.
LRP	Proteína relacionada al receptor LDL.
Mdr1/2	Proteína de resistencia a multidrogas-1/2.
mGSH	Glutación mitocondrial.
miR	microRNA.
MP	Membrana plasmática.
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero.
MRP-2	Proteína asociada a resistencia a multidrogas-2.
MTP	Proteína trifuncional de la mitocondria.
MUFA	Ácidos grasos mono-insaturados.
NAS	Puntaje de actividad del HGNA.
NBD	Dominio de unión a nucleótidos.
nCEH	Hidrolasa de ésteres de colesterol.
nt	Nucleótido.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
RE	Retículo endoplasmático.
RIPA	Radio ensayos de inmunoprecipitación.
LRH-1	Receptor homólogo del hígado-1.
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por miRNAs.
RNA	Ácido ribonucleico.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
SERCA	ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarco(endo) plásmico.
SP-2	Proteasa de unión a SREBP-2.
SR-B1	Receptor basurero clase B tipo 1.
SREBP-1	Proteína 1 de unión al elemento regulador de esteroides.
SREBP-2	Proteína 2 de unión al elemento regulador de esteroides.
STAT3	El transductor de señal y activador de la transcripción 3.
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante beta 1.
TGH	Triglicéridos hepáticos.
TLR2	Receptor 2 tipo Toll.
TLR4	Receptor 4 tipo Toll.
TNFα	Factor de necrosis tumoral α.
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas.
UTR	Región no traducida.
VHC	Virus de la hepatitis C.
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad.
α-TUB	α -tubulina.
β-ACT	β -actina.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Hígado graso no alcohólico (HGNA)*

1.1.1 Definición

El hígado graso no alcohólico (HGNA) es la forma más común de enfermedad hepática crónica sin una historia de consumo significativo de alcohol [1]. El HGNA se caracteriza por la acumulación de grasa en los hepatocitos, que excede el 5% del peso del hígado [2]. El fenotipo histológico del HGNA se extiende desde la acumulación de grasa en el hígado (esteatosis simple, ES) hasta esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) [3]. Esta última se distingue de la esteatosis simple, por la presencia de balonamiento hepatocelular e inflamación lobular, incrementando el riesgo a desarrollar otras complicaciones como cirrosis, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular [2,3].

1.1.2 Diagnóstico del HGNA

Para el diagnóstico del HGNA se deben excluir otras causas que alteran la función hepática como el exceso en el consumo de alcohol (>20 g/día), enfermedades virales (principalmente hepatitis B y C), autoinmunes o tóxicas. La mayoría de los pacientes con HGNA son asintomáticos al diagnóstico o presentan síntomas inespecíficos como astenia, malestar general o dolor en el hipocondrio derecho (presente en el 30-40% de los sujetos con HGNA) [4]. Existen métodos o marcadores no invasivos para establecer el diagnóstico del HGNA, incluyendo marcadores séricos, bioquímicos (Ej. aminotransferasas elevadas, proteína C reactiva, citoqueratina 18 y SteatoTest, entre otros) y

métodos de imágenes (Ej. ecografía abdominal, tomografía axial computarizada y resonancia magnética nuclear), los cuales son útiles para determinar la presencia de grasa y en algunos casos daño hepático [4]. No obstante, estos métodos no detectan el infiltrado inflamatorio y el daño hepático con la especificidad y sensibilidad de la evaluación histológica, por lo que el estándar de oro para definir la progresión del HGNA es el estudio histológico de la biopsia hepática [3].

1.1.3 Prevalencia del HGNA

En diversos estudios se ha descrito una prevalencia del 25% de HGNA en población adulta [5,6]. Además, la prevalencia del HGNA aumenta en paralelo con el incremento del índice de masa corporal (IMC) [7], observándose hasta en un 74% de los individuos obesos y en un 96% de los sujetos con obesidad mórbida [8,9]. Este último grupo, presentando hasta un 50% de sujetos con EHNA [10].

Desde el 2004, el número de adultos con complicaciones derivadas de EHNA en espera de trasplante hepático (TH), casi se ha triplicado en los EUA; siendo actualmente la EHNA la segunda indicación más común para trasplante hepático, sólo después de la enfermedad hepática causada por el virus de la hepatitis C (VHC). Sin embargo, se estima que en los siguientes 10 a 20 años, las complicaciones por EHNA serán la primera causa de trasplante hepático [11,12], convirtiéndose en un serio problema de salud pública.

La prevalencia de esteatosis hepática varía entre los diferentes grupos étnicos. Un estudio en población urbana de EUA encontró que la esteatosis hepática está presente en 45% de los sujetos hispanos, 33% de los caucásicos y 24% de los afroamericanos [13]. Debido a que la población hispana también presenta una mayor prevalencia de obesidad, se ha sugerido que ésta podría ser la causa de la mayor prevalencia de esteatosis hepática en esta población [13]. Sin embargo, el hecho de que la población afro-americana presente una menor prevalencia de esteatosis y una prevalencia de obesidad similar o mayor a los hispanos [13], sugiere que otros factores adicionales a la obesidad, podrían estar involucrados en el riesgo de esteatosis en los hispanos.

En México, no existen datos epidemiológicos que determinen la prevalencia de HGNA. Sin embargo, si se considera que alrededor del 32% de la población adulta presenta obesidad (ENSANUT 2012), y que hasta un 75% de estos sujetos obesos pueden desarrollar HGNA; se puede estimar que hasta un 20% de la población adulta mexicana presenta HGNA.

1.1.4 Historia Natural del HGNA

Con respecto a la historia natural del HGNA, se estima que aproximadamente un 30% de los sujetos que presentan esteatosis progresará a EHNA, de los cuales hasta un 20% desarrollará cirrosis. De estos pacientes con cirrosis, entre un 30 a 40% podría desarrollar insuficiencia hepática y hasta un 10% carcinoma hepatocelular [14–16] (**Figura 1**). Sin embargo, los factores que condicionan la progresión de las etapas o estadios del HGNA no se han dilucidado completamente.

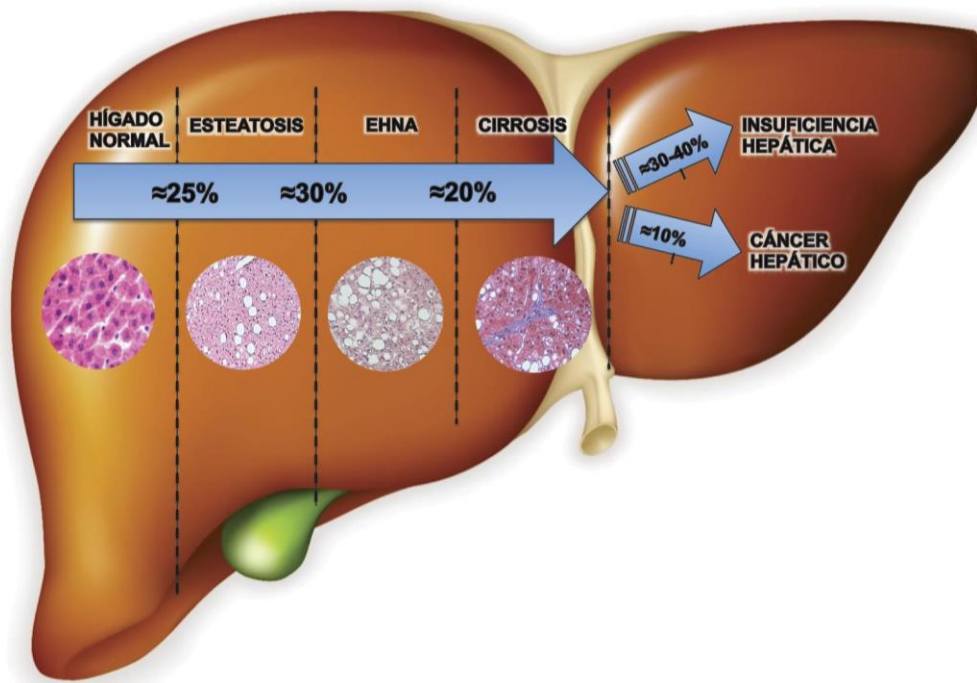


Figura 1: Historia natural del HGNA. HGNA, Hígado Graso No Alcohólico; EHNA, Esteatohepatitis No Alcohólica. Modificado de [14].

1.2 Etiopatogenia del HGNA

Diversas causas pueden condicionar el desarrollo del HGNA, incluyendo el alto consumo de ácidos grasos saturados y azúcares simples [17,18], inactividad física [19] y predisposición genética [20–22]. Además, de manera reciente en diversos estudios se ha relacionado al consumo elevado de colesterol como un factor de riesgo importante para el desarrollo de HGNA, progresión a EHNA, cirrosis y cáncer hepático [18,23].

1.3 Patogénesis del HGNA

La hipótesis más aceptada para explicar la patogénesis del HGNA es la propuesta por Day CP y James OF [24], la cual consiste en dos agresiones, la primera para el establecimiento de la esteatosis hepática, debida a la acumulación de ácidos grasos y

triglicéridos, como consecuencia del incremento en la captación y/o síntesis de ácidos grasos, así como la disminución de la beta oxidación de los mismos. La progresión de esteatosis a EHNA se establece a través de una segunda agresión, la cual parte de un hígado esteatótico más vulnerable al daño hepatocelular e inflamación. Los principales mecanismos involucrados en este proceso incluyen el estrés oxidante, disfunción mitocondrial e inmunomodulación a través de distintas citocinas. Sin embargo, aun cuando esta hipótesis de dos agresiones es ampliamente aceptada, recientemente se ha sugerido que la progresión a EHNA ocurre en un proceso continuo, donde los lípidos con capacidad tóxica/pro-inflamatoria promueven un efecto de lipotoxicidad, lo cual conlleva a la progresión de esteatosis a EHNA [25]. A este respecto, distintas investigaciones se han enfocado en determinar la participación de diversos tipos de lípidos en la progresión a EHNA. En este sentido, aun cuando el HGNA inicia con el incremento de triglicéridos hepáticos [26], algunos estudios sugieren que los triglicéridos, los cuales constituyen la mayoría de los lípidos hepáticos tanto en esteatosis simple como en EHNA, son lípidos de almacenamiento con poco potencial lipotóxico [25,27–29]. De manera consistente, pacientes con hipobetalipoproteinemia familiar (HBF) no progresaron a esteatohepatitis a pesar de la presencia de esteatosis masiva [30], lo que sugiere que la acumulación de triglicéridos *per se* podría no ser un factor determinante para la progresión del HGNA. Por ello, distintos estudios se han enfocado en la identificación de otros lípidos, que pudieran estar implicados en la progresión del HGNA, incluyendo ácidos grasos libres (AGL), diacilgliceroles, fosfolípidos (ceramidas y esfingolípidos) y más recientemente el colesterol libre (CL) [25]. De manera interesante, dos estudios a nivel lipídomico revelaron que es el nivel

hepático de colesterol libre, pero no el de triglicéridos, el que se encuentra diferencialmente elevado en los sujetos que progresan a EHNA [31,32].

1.4 Toxicidad del colesterol en el HGNA

A diferencia de la membrana plasmática que contiene alta concentración de colesterol, el retículo endoplasmático (RE) y la mitocondria contienen una cantidad menor de colesterol (3-5% del colesterol celular total) [33], y son altamente sensibles a la pérdida de fluidez membranal, ocasionada por enriquecimiento de colesterol [34]. Estos eventos afectan negativamente a ciertas proteínas transmembranales, las cuales requieren libertad conformacional para realizar sus funciones de manera apropiada [35].

1.4.1 Disfunción mitocondrial por colesterol

Se ha demostrado en modelos murinos alimentados con una dieta alta en colesterol, que el exceso de colesterol libre en la mitocondria hace sensible al hepatocito a citocinas Inflammatorias a través de la disminución del glutatión mitocondrial (mGSH, por sus siglas en inglés), el cual es esencial para regular los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) [36]. Esto sucede a través del incremento de colesterol libre en la mitocondria que reduce la fluidez de su membrana, y afecta la estabilidad de la proteína transmembranal acarreadora de 2-oxoglutarato, la cual transporta glutatión del citosol al interior de la mitocondria [36]. En consecuencia, el nivel de glutatión se encuentra reducido en la mitocondria, y los hepatocitos se vuelven sensibles al factor de necrosis tumoral α (TNF- α , por sus siglas en inglés) y a la molécula pro-apoptótica Fas. Lo anterior promueve la permeabilización de la membrana mitocondrial, necrosis y

apoptosis; lo que conlleva a inflamación hepática y EHNA en modelos experimentales [36].

1.4.2 Estrés en el retículo endoplasmático (RE) inducido por colesterol

El retículo endoplasmático es un organelo membranoso con funciones celulares críticas: plegamiento y modificaciones post-transcripcionales de proteínas nacientes para una conformación adecuada, síntesis de fosfolípidos y almacenamiento de iones calcio para el señalamiento celular, entre otras funciones [37].

Algunos estudios sugieren, que la acumulación de colesterol en la membrana del RE, altera sus funciones y su capacidad para el correcto plegamiento de proteínas [38,39], esto resulta en una condición conocida como estrés del RE o respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés). Se sabe que esta condición juega un papel importante en desórdenes asociados a la obesidad, incluyendo el HGNA [40]. Un ejemplo de ello, son los desórdenes conformacionales de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco(endo) plásmico (SERCA, por sus siglas en inglés), la cual es altamente sensible al incremento mínimo en el nivel de colesterol en el RE, que afecta su actividad ATPasa [41,42]. Por consiguiente, la alta concentración fisiológicas de Ca^{2+} dentro del RE disminuye, y como resultado, se pierde la capacidad del correcto plegamiento de proteínas; lo que conduce a estrés en RE [41,42].

1.4.3 Inducción de células Kupffer (CKs) y activación de células estelares hepáticas (CEHs) por colesterol

Las células Kupffer (CKs) representan entre un 20 a 25% de las células no-parenquimatosas del hígado. Además de su reconocida participación como células fagocíticas, las CKs activadas representan una fuente principal de citocinas pro-inflamatorias y pro-fibrogénicas (TNF- α y el factor de crecimiento transformante beta 1, TGF- β 1) [43]. Asimismo, se ha demostrado en modelos murinos alimentados con una dieta alta en grasa y colesterol, que se requiere la acumulación de colesterol libre en CKs para la activación de un fenotipo pro-inflamatorio, lo cual puede conducir al desarrollo de EHNA [44]. Por otra parte, debido a que las CKs no sintetizan colesterol, ellas lo obtienen principalmente a través de la captación de las lipoproteínas de baja densidad (LDLs) en estado oxidado (oxLDLs). Llama la atención, que la acumulación de colesterol lisosomal en las CKs promueve una respuesta inflamatoria, y causa incremento en la inflamación hepática en modelos experimentales con EHNA [45,46].

Por otra parte, la activación de las células estelares hepáticas (CEHs) forma parte de los procesos fibrogénicos observados en el desarrollo del HGNA [47]. Evidencia reciente en modelos murinos, revela que la acumulación de colesterol libre intracelular activa directamente las CEHs, sensibilizándolas a la inducción por TGF- β . Por consiguiente, se activan procesos fibrogénicos mediados por el receptor 4 tipo Toll (TLR4, por sus siglas en inglés), lo que conduce al incremento de la fibrosis en la EHNA [48,49].

1.4.4 Formación de cristales de colesterol en la EHNA

A los cristales de colesterol se les ha implicado en la activación del inflamasoma en lesiones arterioescleróticas [50,51]. Por tanto, diversos estudios sugieren que este proceso podría ocurrir de manera similar en el HGNA [52–55]. Por ejemplo, tanto en un modelo de ratón con una dieta alta en colesterol, como en sujetos con EHNA, se ha observado que los cristales de colesterol están presentes en las gotas de lípidos, y forman estructuras tipo corona, lo cual conduce a la producción de citocinas pro-inflamatorias, y activación de CKs y CEH [54,55]. Por ello, se ha propuesto que la formación de cristales de colesterol podría promover la progresión de esteatosis a EHNA [52,53].

Lo anterior sugiere que un desequilibrio en las vías metabólicas que participan en la homeostasis del colesterol hepático, podría no solamente condicionar a disrupción mitocondrial y estrés en el RE en el hepatocito, sino también la activación de CKs y CEHs, lo que puede promover la progresión de esteatosis a EHNA y fibrosis.

1.5 *Desequilibrio en la homeostasis del colesterol hepático en el HGNA*

La homeostasis de colesterol hepático se mantiene a través de una red coordinada que implica la participación de diversos genes involucrados en su captación, síntesis, biotransformación, eflujo, excreción, así como en la regulación por factores de transcripción que censan los niveles de colesterol intracelular [43] (**Figura 2**).

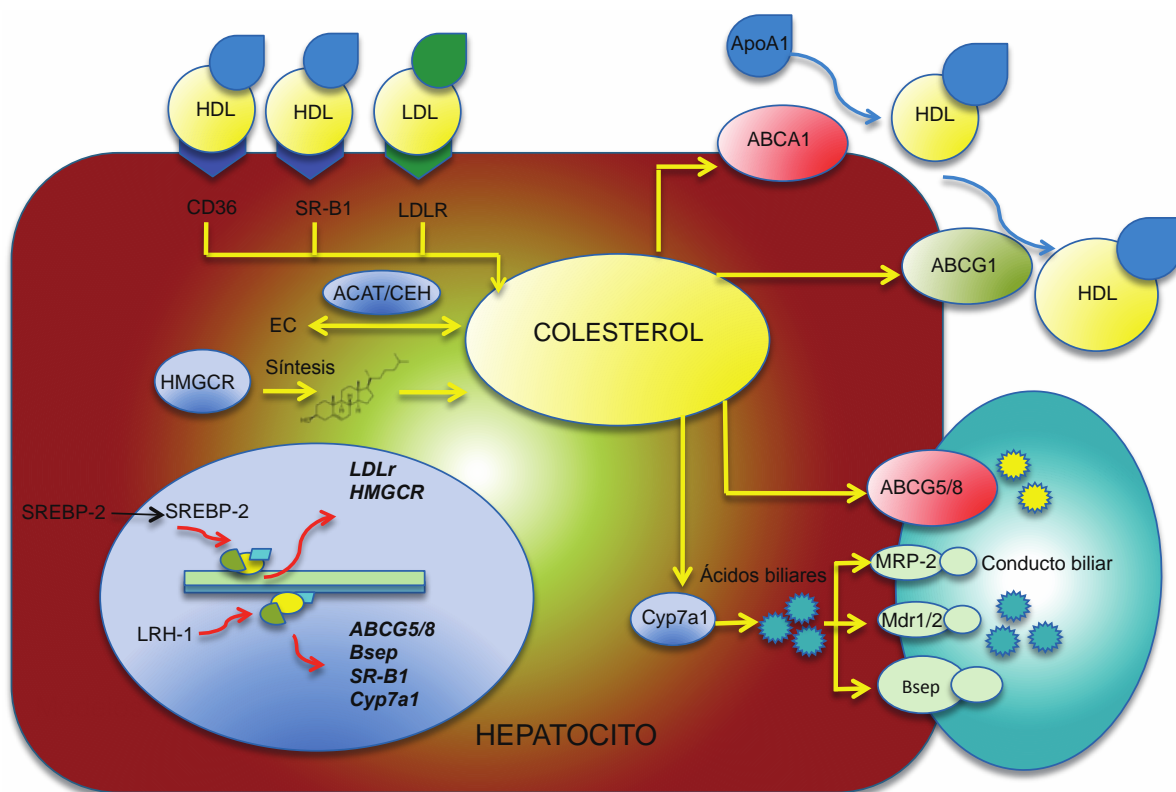


Figura 2: Homeostasis del colesterol hepático. La homeostasis de colesterol intracelular está coordinada por diferentes vías metabólicas, captación (CD36, SR-B1, LDL-R), síntesis (HMGCR), bio-transformación (CYP7A1), eflujo celular al conducto biliar (ABCG5/G8, MRP-2, Mdr1/2 y Bsep) y eflujo celular hacia las HDL (ABCA1/G1); así como la regulación por factores de transcripción que censan el nivel de colesterol intracelular (SREBP-2 y LRH-1). CD36, Proteína de transporte de ácidos grasos; SR-B1, Receptor basurero clase B tipo 1; LDL-R, Receptor de las lipoproteínas de baja densidad; HMGCR, Hidroximetilglutaril CoA reductasa; Cyp7a1, Colesterol 7 alfa-hidroxilasa; ABCG5, Transportador G5 dependiente de unión a ATP; ABCG8, Transportador G8 dependiente de unión a ATP; MRP-2, Proteína asociada a resistencia a multidrogas-2; Mdr1/2, Proteína de resistencia a multidrogas-1/2, Bsep, Proteína exportadora de sales biliares; ABCA1, Transportador A1 dependiente de unión a ATP, ABCG1, Transportador G1 dependiente de unión a ATP; SREBP-2, Proteína 2 de unión al elemento regulador de esteroides; LRH-1, Receptor 1 homólogo del hígado; EC, ésteres de colesterol. Basado en [49,56,57]

A este respecto, los estudios en modelos animales con obesidad, diabetes o dislipidemias han revelado que el desequilibrio en la homeostasis hepática del colesterol condiciona a su acumulación y modula la transición de esteatosis a EHNA, lo que correlaciona directamente con el grado de daño hepático, muerte celular por apoptosis, acumulación de macrófagos y fibrosis [49,58]. De manera reciente, estudios en pacientes con EHNA encontraron que distintas rutas metabólicas involucradas en la homeostasis del colesterol se encuentran desreguladas, incluyendo un incremento en la bio-síntesis de colesterol relacionada con el aumento en la expresión y actividad de la hidroximetilglutaril CoA reductasa (HMGCR); aumento en el nivel hepático de la proteína 2 de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-2), la cual activa genes específicos en la captación y biosíntesis del colesterol; incremento en la desesterificación de colesterol mediante la hidrolasa de ésteres de colesterol (CEH), que promueve la liberación de colesterol libre; disminución en la salida de colesterol al conducto biliar mediante la reducción de la expresión del transportador G8 dependiente de unión a ATP (ABCG8); y disminución en la bio-transformación de colesterol a ácidos biliares, a través de una menor expresión de la colesterol 7 y 27 alfa-hidroxilasa (CYP7A1 y CYP27A1) [31,59]. Sin embargo, a pesar de que el eflujo de colesterol, a través de los transportadores A1 y G1 dependientes de unión a ATP (ABCA1 y ABCG1), ha sido ampliamente estudiado en el transporte reverso de colesterol y la formación de partículas HDLs, su participación en el HGNA aún no se ha dilucidado completamente [60].

1.6 Transportadores de eflujo de colesterol ABCA1 y ABCG1 e HGNA

1.6.1 Estructura y función de ABCA1 y ABCG1

Las proteínas ABCA1 y ABCG1 pertenecen a la familia de proteínas ABC, las cuales utilizan ATP para generar la energía necesaria para transportar metabolitos a través de la membrana. Los transportadores ABC contienen dos dominios trans-membranales y dos dominios de unión a nucleótidos codificados por un único polipéptido (**Figura 3**) [56,61,62].

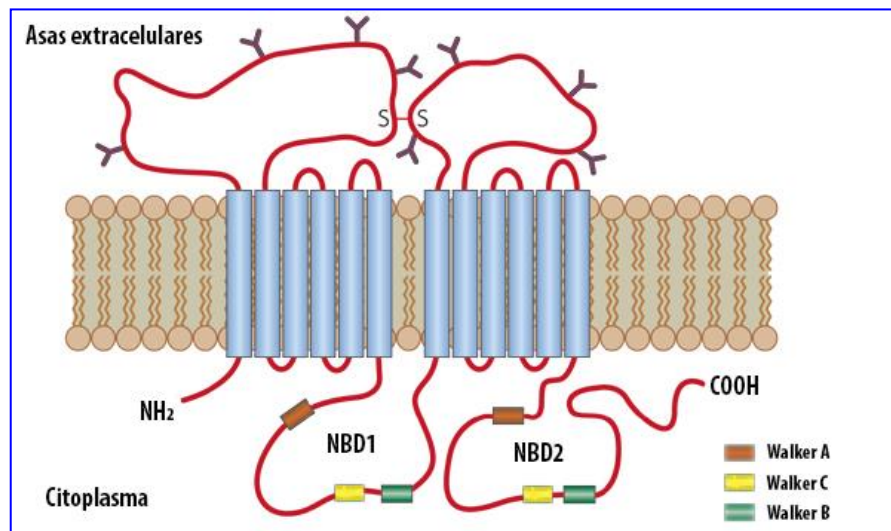


Figura 3: Estructura de la proteína de ABCA1. La proteína ABCA1 se encuentra formada por dos mitades con estructura similar, unidas por puentes covalentes; cada una unida por un dominio transmembranal (compuestas por seis hélices indicadas en azul) y un dominio de unión a nucleótidos (NBD por sus siglas en inglés, “nucleotide binding fold”). Cada NBD contiene 2 regiones llamadas Walker A y Walker B (conservadas en muchas proteínas que utilizan ATP) y una región Walker C que es propia de las proteínas ABC. Figura modificada de [63]

Las proteínas ABCA1 y ABCG1 se expresan considerablemente en el hígado, y tienen una participación importante en el eflujo de colesterol y en la biogénesis de las HDLs [63,64]. La proteína ABCA1 modula el eflujo de colesterol hepático mediante ApoA1 libre de lípidos para ensamblar HDLs nacientes, lo que resulta finalmente en la liberación hepática de colesterol y fosfolípidos [65] (**Figura 4**). En contraste, ABCG1 modula el eflujo de colesterol hacia las partículas HDL nacientes pero no a apo-A1, redistribuyendo el colesterol a dominios de la superficie celular, accesibles para ser removidos por las HDLs [66–69]. En este sentido, una reducción del eflujo de colesterol a través de los transportadores ABCA1 y ABCG1 podría contribuir a la acumulación del colesterol hepático.

1.6.2 Transportadores del eflujo de colesterol *ABCA1* y *ABCG1* como genes candidato en el desarrollo del HGNA

Los transportadores ABCA1 y ABCG1 se han estudiado ampliamente debido a su estrecha relación con la concentración plasmática del colesterol HDL [64]. La lipidación de apoA-1 mediante el transportador ABCA1 es un paso limitante en la generación de HDL en el plasma [70]. Por ello, un transporte eficiente o eflujo de colesterol podría ser clave en la prevención del desarrollo a EHNA. Llama la atención que en distintos estudios en pacientes con HGNA se ha descrito una disminución en el nivel plasmático del colesterol HDL [22,59,71], lo cual denota una reducción en la biogénesis de las HDLs y en el eflujo de colesterol en el hígado, posiblemente a través de una reducción en la expresión hepática de los transportadores ABCA1 y ABCG1. Recientemente, se ha informado que el silenciamiento de ABCA1 incrementa el nivel intracelular de ácidos

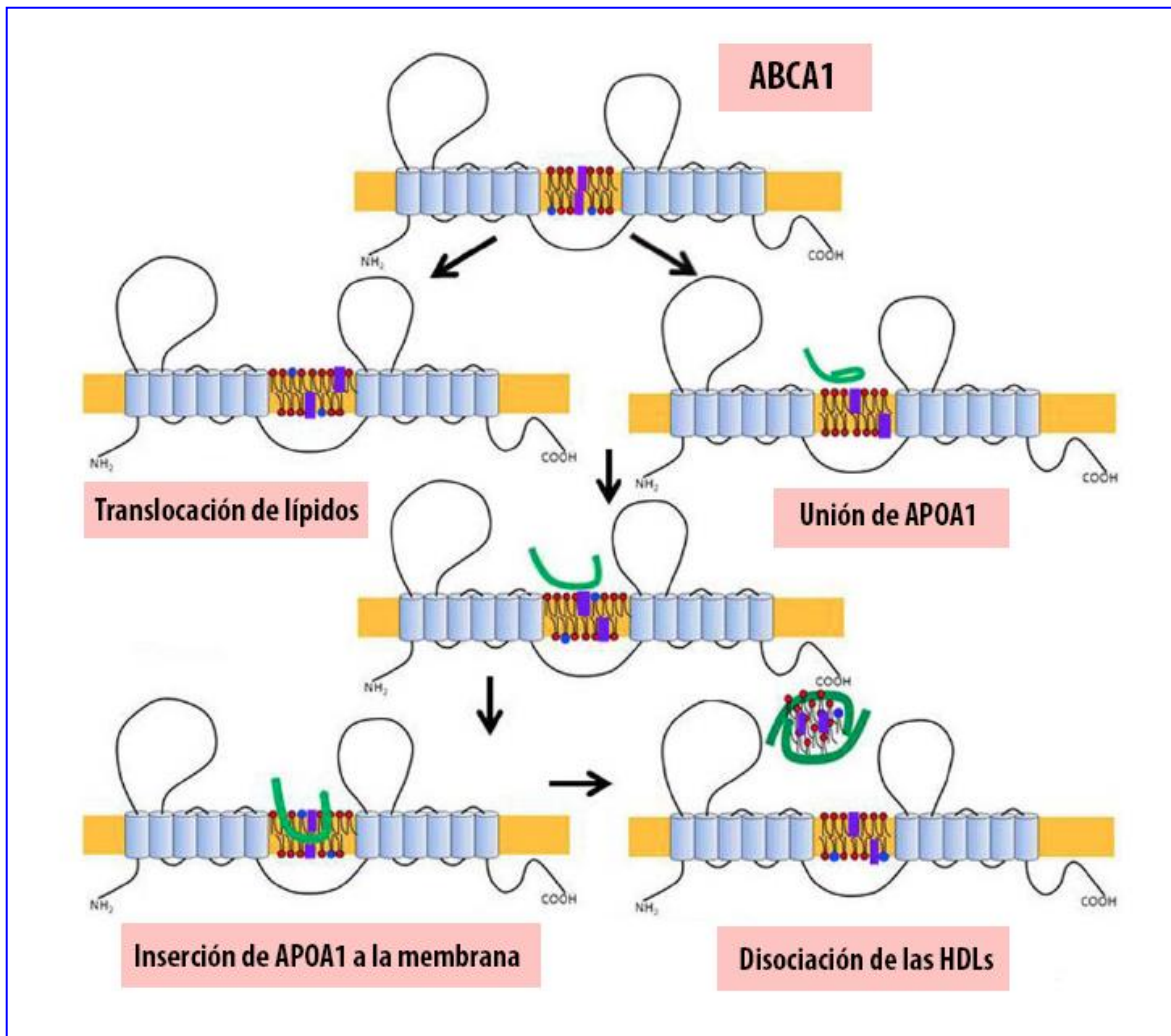


Figura 4: Modelo de ABCA1 modulando el eflujo de colesterol. Primero, la proteína ABCA1 modula 2 pasos independientes, (1) la translocación de colesterol y fosfolípidos desde el interior hacia la capa exterior de la membrana plasmática y (2) la unión celular de ApoA1; los cuales podrían ser mediados por la hidrólisis de ATP. Segundo, la proteína ABCA1 modula cambios conformacionales parciales en el amino terminal de APOA1, lo que resulta en una proteína no plegada. Tercero, la pérdida de la conformación terciaria de ApoA1 permite la inserción espontánea dentro de la membrana plasmática. Cuarto, la inserción de ApoA1 conduce finalmente a la liberación de colesterol y fosfolípidos, y formación de HDLs nacientes en la célula. Figura modificada de [65].

grasos libres, triglicéridos y colesterol en líneas celulares hepáticas de humano [72]. Este hallazgo sugiere, que la esteatosis también podría estar asociada con la reducción de la expresión de la proteína ABCA1, lo que conduce a un incremento en el almacenamiento de lípidos hepáticos. De manera adicional, se ha observado que el hígado de ratas con EHNA expresan un nivel bajo de la proteína ABCA1 [73]. Por otra parte, en modelos murinos con una dieta alta en grasa y colesterol, la ausencia de ABCG1 promueve la acumulación de lípidos en células hepáticas [66]. Además, la proteína ABCG1 también promueve el eflujo de ciertos oxi-esteroles lipotóxicos (como el 7-cetocolesterol) [74]. En conjunto, estas evidencias sugieren que los transportadores del eflujo de colesterol ABCA1 y ABCG1 pudieran tener una participación importante en el desarrollo del HGNA.

Durante el desarrollo de esta Tesis, Min y colaboradores [59] describieron una disminución en el nivel de mRNA de ABCA1 y ABCG1, así como en la concentraciones de la proteína de ABCG1, pero no de ABCA1 en biopsias de hígado de sujetos con EHNA [59]. La discrepancia entre el nivel de mRNA y concentración de proteína de ABCA1 podría deberse a mecanismos de regulación post-transcripcional. Diversos estudios en modelos murinos y en primates no humanos con expresión reprimida de miR-33, han observado que la concentración de la proteína de ABCA1 pueden ser modulada post-transcripcionalmente por el microRNA-33 (miRNA-33) hasta en 50% [75,76]. Por tanto, la concentración de proteína de ABCA1 y el eflujo de colesterol —en el desarrollo de la enfermedad— podrían estar influenciados por la modulación de microRNAs, como el miRNA-33.

1.7 Regulación post-transcripcional de los transportadores del eflujo de colesterol ABCA1 y ABCG1 por microRNAs

Recientemente, además de la regulación transcripcional clásica, una clase de RNAs no codificantes denominados microRNAs (miRNAs), constituidos de ~23 nt de RNA endógeno, se ha presentado como un regulador de la expresión, los cuales actúan predominantemente a nivel post-transcripcional [77,78]. En la última década, se ha demostrado que los microRNAs funcionan como reguladores importantes de un amplio rango de rutas metabólicas, incluyendo el eflujo de colesterol [77,79,80].

1.7.1 Biogénesis de los microRNAs

Los productos de miRNAs maduros son generados de precursores llamados pri-miRNAs, los cuales se componen de cientos o miles de nucleótidos que son procesados por la ribonucleasa que es específica para RNA bicatenario (DROSHA) y el factor de procesamiento de microRNAs (DGCR8, DiGeorge syndrome critical region gene 8, por sus siglas en inglés). [77,81]. El procesamiento de los pri-miRNAs genera precursores de horquillas nucleares llamados pre-miRNAs, los cuales posteriormente son exportados al citoplasma por la exportina 5, donde son procesados por otra ribonucleasa tipo III llamada DICER para producir el miRNA maduro [77,81]. En general, los microRNAs regulan la expresión génica post-transcripcionalmente, mediante el apareo de bases a sus mRNAs blanco [77]. En animales, la mayoría de los microRNAs investigados forman híbridos imperfectos con las secuencias del mRNA (sitios de reconocimiento) en la región 3' no traducida (3'UTR, por sus siglas en inglés). En este proceso, los microRNAs son preferentemente incorporados dentro del complejo

de silenciamiento inducido por miRNAs (RISC), donde se asocian con la proteína argonauta que dirige la unión del complejo RISC a la región 3'UTR de sus mRNAs blanco. Esta asociación puede afectar tanto la traducción de proteínas, como la estabilidad del mRNA favoreciendo su degradación o una combinación de ambos procesos [77,81] (**Figura 5**). En el humano se calcula que los miRNAs podrían controlar la actividad de aproximadamente un 30% de todos los genes que codifican proteínas [81].

1.7.2 Regulación de los transportadores del eflujo de colesterol ABCA1 y ABCG1 por miR-33

Estudios recientes identificaron una participación importante de miR-33 en la represión de genes involucrados en el eflujo de colesterol, incluyendo ABCA1 y ABCG1, los cuales tienen sitios de reconocimiento para miR-33 [80,82]. En humano se han identificado dos isoformas de miR-33: miR-33a y miR-33b. El gen miR-33a está localizado en el intrón 16 del gen *Srebp-2* y el gen miR-33b está presente en el intrón 17 del gen *Srebp-1*. Además, se ha sugerido que estos miRNAs se transcriben de manera conjunta con sus genes hospederos [80,83,84] (**Figura 6**).

En una serie de estudios realizados en tejido hepático de ratón, así como en líneas celulares hepáticas de humano, se ha demostrado que la sobre-expresión de miR-33 resulta en la disminución tanto de la expresión de ABCA1, como del eflujo de colesterol. [75,80,83,84]. De manera similar, se ha observado que la sobre-expresión

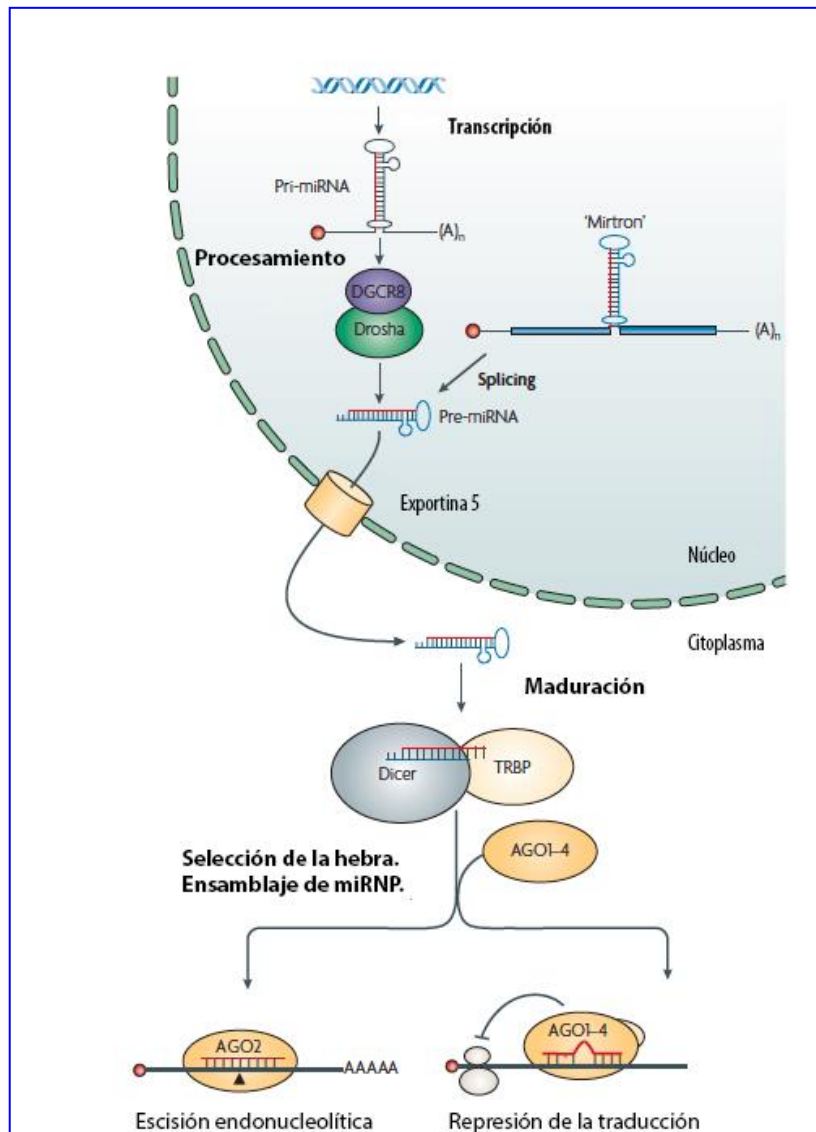


Figura 5: Biogénesis de los microRNAs. Los productos de miRNAs maduros son generados de precursores llamados pri-miRNAs, los cuales se componen de cientos o miles de nucleótidos que son procesados por el complejo formado por la RNasa (DROSHA) y el factor de procesamiento de microRNA (DGCR8). El procesamiento de los pri-miRNAs genera precursores de horquillas nucleares llamados pre-miRNAs de ~70 nucleótidos, los cuales luego son exportados al citoplasma por la exportina 5, donde son procesados por DICER (la cual forma un complejo con la proteína TRBP, por sus siglas en inglés TAR RNA binding

protein) para producir un miRNA dúplex de ~20 pb. Luego una hebra es seleccionada para funcionar como microRNA maduro, mientras que la otra puede ser degradada. Posteriormente, los microRNAs son preferentemente incorporados dentro del complejo ribonucleoproteico llamado micro-RNPs (miRNPs) o complejo de silenciamiento inducido por miRNAs (RISC, por su siglas en inglés miRNA-induced silencing complexes) donde se asocian con la proteína argonauta que dirige la unión del complejo RISC a la región 3'UTR de sus mRNA blancos. Esta asociación puede afectar principalmente tanto la inhibición de la traducción de proteínas como la estabilidad del mRNA, o una combinación de ambos procesos (modificado de [81]).

de miR-33 también inhibe la expresión de ABCG1, disminuyendo el eflujo de colesterol [75,80,84]. Por tanto, lo anterior sugiere que un nivel incrementado de miR-33 en el hígado podría promover la acumulación de colesterol y el desarrollo del HGNA.

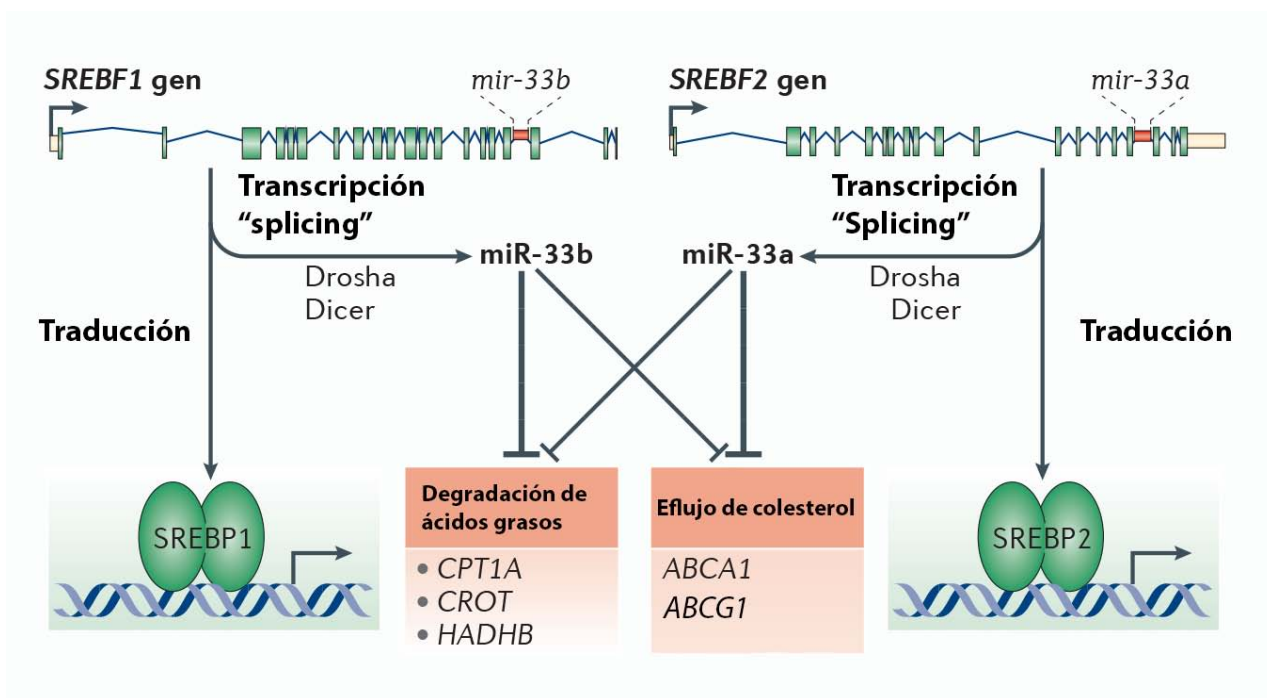


Figura 6: Modelo de regulación de miR-33. El gen miR-33b está presente en el intrón 17 del gen *Srebp-1* y el gen miR-33a está localizado en el intrón 16 del gen *Srebp-2*. Los microRNAs 33a y 33b actúan reprimiendo genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos por ejemplo a la carnitina O-octanoil transferasa (CROT), la hidroxiacil-coenzima A deshidrogenasa, subunidad β (HADHB) y la carnitina palmitoiltransferasa 1A (CPT1A), así como en el eflujo de colesterol (por ejemplo ABCA1 y ABCG1). Imagen modificada de [85].

1.7.3 Regulación de ABCA1 por miR-144

En estudios recientes se ha demostrado que ABCA1 es regulado post-transcripcionalmente por miR-144 tanto *in vitro* como *in vivo* [86,87]. En este sentido, ensayos experimentales en cultivos primarios de hepatocitos y líneas celulares

hepáticas de humano, revelaron que la sobre-expresión de miR-144 inhibe la expresión de ABCA1, reduciendo el eflujo de colesterol [86]. De manera adicional, la liberación *in vivo* de miR-144 —en un modelo murino— reprime la expresión hepática de ABCA1 [87]. Por tanto, el nivel alto en el hígado de miR-144, al igual que el de miRNA-33 podrían contribuir de manera importante en el desarrollo del HGNA.

1.8 Otros genes blanco para miR-33 y miR-144

Un mRNA tiene sitios de reconocimiento para distintos microRNAs en su región 3'UTR [77]. Por tanto, puede ser blanco para muchos microRNAs. A su vez, los microRNAs se unen a múltiples mRNAs [77]. Por lo tanto, un microRNA puede regular la expresión de genes involucrados en distintas vías metabólicas [77,79].

En este sentido, se conoce que miR-33 no sólo regula el eflujo de colesterol, sino que también reduce la β -oxidación a través de la regulación de distintos blancos, entre ellos: la carnitina O-octanoil transferasa (CROT), la carnitina palmitoil-transferasa 1A (CPT1A) y a la hidroxiacil-coenzima A deshidrogenasa, subunidad β (HADHB) [88,89] (**Figura 6**). De manera similar, estudios en modelos murinos sugieren que miR-144 podría contribuir al desarrollo y progresión de EHNA mediante la regulación de la expresión del Receptor 2 tipo Toll (TLR2, por sus siglas en inglés), y con ello desencadenar la producción de citocinas pro-inflamatorias [90].

1.8.1 Modulación de CROT, CPT1A y HADHB por miR-33

CROT es un gen miembro de la familia de las carnitina aciltransferasas que está involucrado en la oxidación de ácidos grasos en los hepatocitos. La proteína

comprendida por 612 aminoácidos convierte el 4-8 dimetilnonanoil-CoA a su correspondiente éster de carnitina [91]. Esta trans-esterificación ocurre en el peroxisoma y es necesaria para el transporte de moléculas de acil-CoA de cadena media y larga fuera del peroxisoma hacia el citosol y la mitocondria [92]. Por otra parte, CPT1A es una enzima mitocondrial que modula el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana externa mitocondrial mediante la unión a carnitina, y es considerada una enzima clave en la regulación de la oxidación de los ácidos grasos (AG) [93]. Finalmente, HADHB pertenece al complejo multi-enzimático (hetero-octámero) de la proteína trifuncional de la mitocondria (MTP, por sus siglas en inglés), este complejo cataliza los tres últimos pasos de la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga [94]. La proteína HADHB subunidad β —con actividad tiolasa— cataliza el paso final de la β -oxidación. Inicialmente, el 3-cetoacil CoA se une a un grupo tiol de otra molécula de Coenzima A. Después, el grupo tiol es insertado entre los carbono C-2 y C-3, lo cual produce una molécula de acetil-CoA y una molécula de acil-CoA, que es dos carbonos más corta [94] (**Figura 7**). Por lo que una reducción en la expresión de estos genes que participan en el catabolismo de los ácidos grasos podría promover el desarrollo del HGNA.

En distintos estudios se ha demostrado que los sitios de reconocimiento para miR-33 están altamente conservados en la región 3'UTR de *CROT*, *CPT1A* y *HADHB* [88,89]. A su vez, a través de distintos estudios de la actividad 3'UTR de *CROT*, *CPT1A* y *HADHB* se ha demostrado que miR-33 regula la expresión proteica de cada uno de estos blancos, los cuales son clave en la oxidación de los ácidos grasos (**Figura**

8). Lo anterior se evidenció al sobre-exresar miR-33 en líneas celulares hepáticas de humano, donde se observó una reducción tanto de la expresión de los genes blanco (*CROT*, *CPT1A* y *HADHB*), como de la oxidación de ácidos grasos. En contraste, la inhibición de la expresión endógena de miRNA-33 produce un aumento de la expresión de los genes de *CROT*, *CPT1A* y *HADHB*, la cual se acompaña de un aumento en la oxidación de los ácidos grasos [88,89].

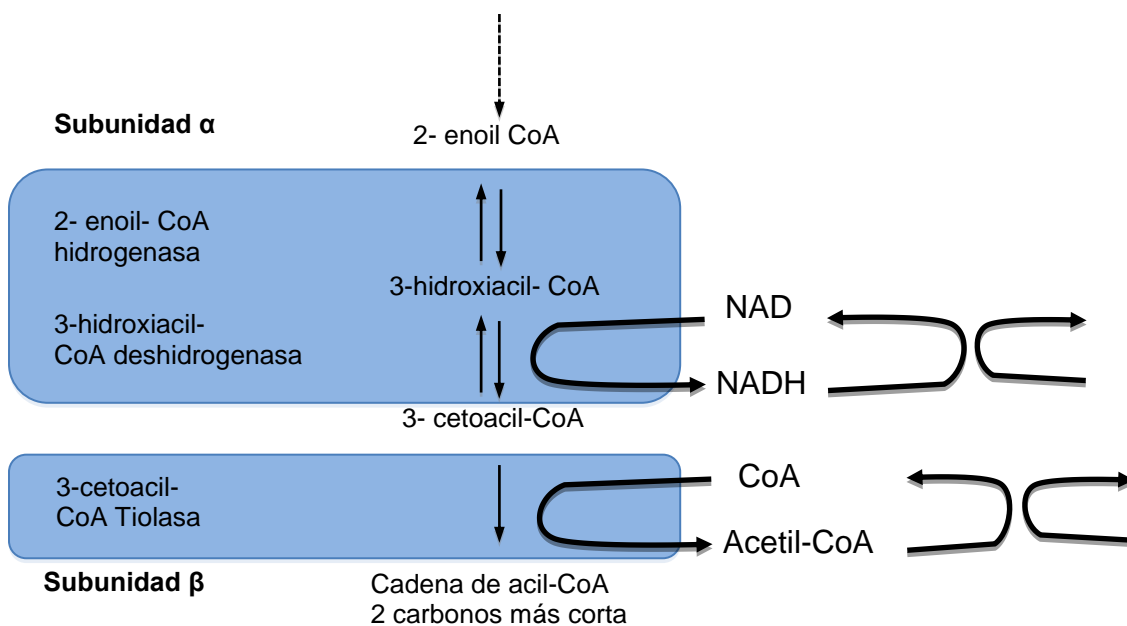


Figura 7: Diagrama de las subunidades de la proteína trifuncional (MTP). El diagrama presenta la subunidad α que comprende la actividad de la 2- enoil- CoA hidrogenasa y la 3- hidroxiacil- CoA deshidrogenasa, mientras que subunidad β comprende a la 3-cetoacil- CoA tiolasa (*HADHB* subunidad β), la cual cataliza el paso final de la β -oxidación. Modificado de [94]

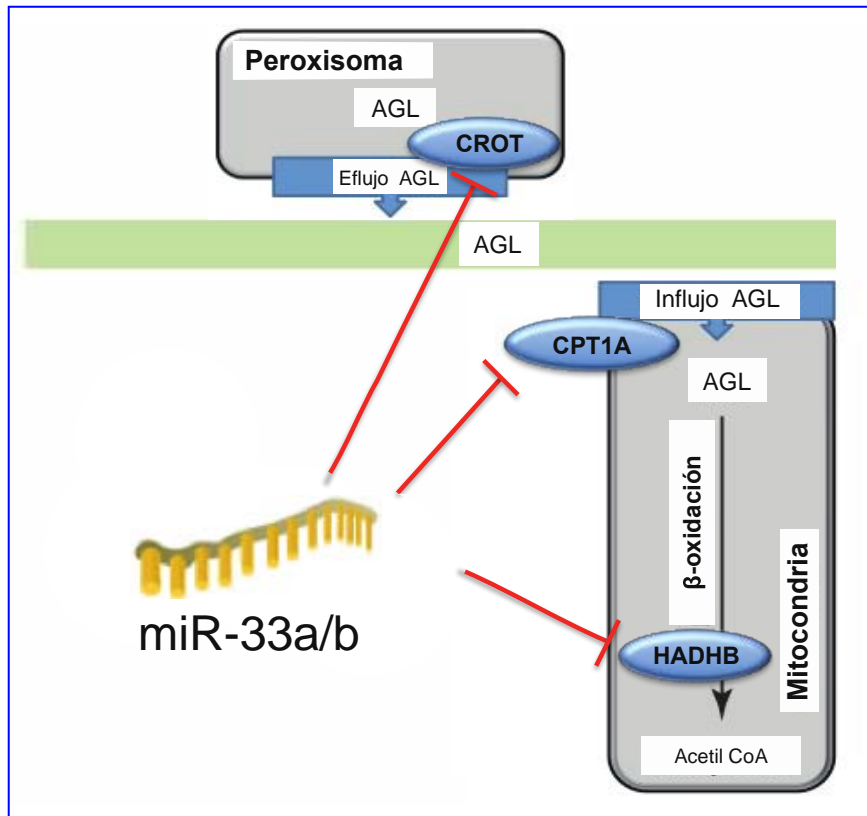


Figura 8: Diagrama representativo de la inhibición de enzimas clave, que participan en la degradación de los ácidos grasos por miR-33a/b. El miR-33 inhibe post-transcripcionalmente la expresión de la carnitin O-octanoil transferasa (*CROT*) que participa en el transporte de moléculas de acil-CoA de cadena media y larga fuera del peroxisoma hacia el citosol y la mitocondria; la carnitin palmitoil-transferasa 1A (*CPT1A*) modula el transporte ácidos grasos de cadena larga del exterior al interior de la mitocondria a través de la membrana externa mediante la unión a carnitina; y la hidroxiacil-coenzima A deshidrogenasa, subunidad β (*HADHB*) cataliza el paso final de la β -oxidación. Basado en [88]

1.8.2 Modulación de TLR-2 por miR-144

En distintos estudios se ha demostrado que el sistema inmune innato se activa en la EHNA [95,96]. Particularmente, los receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés) son proteínas que censan señales derivadas de bacterias y virus, lo cual activa el sistema inmune innato [97]. De esta manera, el señalamiento de los TLRs defiende al hospedero contra patógenos invasores a través de la inducción de citocinas pro-inflamatorias en las células inmunes. Sin embargo, un aumento en la activación de la señalización celular por TLRs o la ruptura en la tolerancia produce una gran cantidad de citocinas inflamatorias, que en última instancia conduce al daño tisular [98]. Entre los 13 TLRs que se han identificado en mamíferos, distintos grupos han descrito que TLR2, TLR4 y TLR9 están asociados con EHNA en modelos experimentales, siendo moléculas cruciales para promover daño hepático, inflamación y fibrosis [96,99–101].

Recientemente, un estudio experimental en modelos murinos con EHNA, la cual fue inducida con una dieta alta en grasa y deficiente en metionina y colina, mostró que la expresión hepática de miR-144 correlaciona negativamente con la expresión de TLR2 [90]. En este estudio se demostró que miR-144 se une a la región 3'UTR del mRNA de TLR2. Además, se observó que TLR2 disminuye después de la inducción con un análogo de miR-144 en macrófagos derivadas de ratas, mientras que el efecto opuesto fue observado después de la inhibición con miR-144 [90]. Estos resultados en el modelo murino sugieren que miR-144 podría también estar involucrado en el desarrollo y progresión de la EHNA a través de la regulación de TLR2 y con ello promover la liberación de citocinas pro-inflamatorias río abajo. Sin embargo, aun

cuando el microRNA 144 parece ser importante en la modulación de la expresión de TLR2, hasta el momento no existen estudios que demuestren su relación con el HGNA en humanos.

En conjunto, las investigaciones previas sugieren que miR-33 y miR-144 podrían tener una participación importante, no sólo a través de la modulación de los transportadores del eflujo de colesterol *ABCA1* y/o *ABCG1*, sino que también mediante la regulación de otros genes blanco como *CROT*, *CPT1A*, *HADHB* y *TLR2* en el desarrollo del HGNA.

2 JUSTIFICACIÓN

La patogenia del HGNA aún no se ha dilucidado completamente. Los factores y mecanismos moleculares responsables del HGNA y su progresión a EHNA siguen siendo investigados con la finalidad de prevenir la progresión, y eventualmente ofrecer mejores estrategias terapéuticas. En distintos análisis lipidómicos se ha demostrado la presencia de la acumulación de colesterol libre en sujetos con EHNA. De igual manera, estudios en pacientes con EHNA encontraron que distintas rutas metabólicas involucradas en la homeostasis del colesterol se encuentran desreguladas, incluyendo un incremento en la expresión y actividad de la HMGCR (síntesis), aumento en los niveles hepáticos de SREBP-2 (transcripción), incremento en la hidrólisis de ésteres de colesterol mediante la CEH (des-esterificación), disminución en la expresión de ABCG8 (excreción) y disminución en la expresión de CYP7A1 y CYP27A1 (bio-transformación). Sin embargo, aunque se conoce que los transportadores del eflujo del colesterol *ABCA1* y *ABCG1* tienen una función importante en la homeostasis del colesterol, su participación en la fisiopatología del HGNA no se ha dilucidado completamente. Además, la regulación de estos genes y otros participantes en el metabolismo de los ácidos grasos y en procesos inflamatorios (*CROT*, *CPT1A*, *HADHB* y *TLR2*) por los microRNAs 33 y 144, podría ser un mecanismo relevante en el desarrollo del HGNA; a la fecha poco explorado en el humano.

3 HIPÓTESIS

La expresión de los transportadores del eflujo de colesterol *ABCA1* y *ABCG1* estará disminuida en el hígado de sujetos con HGNA. Esta menor expresión correlacionará con un mayor nivel hepático de miR-33 y miR-144 en sujetos con HGNA.

4 OBJETIVOS

4.1 *Objetivo general*

Determinar la participación de los transportadores del eflujo de colesterol ABCA1 y ABCG1 y su relación con miR-33 y miR-144 en el desarrollo del HGNA en sujetos con obesidad clase II/III.

4.2 *Objetivos específicos*

- Evaluar la asociación del contenido hepático de colesterol libre, colesterol total, fosfolípidos y triglicéridos con las distintas etapas del HGNA.
- Analizar la asociación de la expresión hepática de *ABCA1* y *ABCG1* con HGNA, así como con los parámetros bioquímicos y el contenido de lípidos hepáticos.
- Establecer la correlación entre el nivel de mRNA y concentración de proteína de ABCA1/ABCG1 con el nivel de miR-33 y miR-144 en biopsias de tejido hepático.
- Determinar la asociación entre el nivel hepático de miR-33 y miR-144 con las etapas del HGNA.
- Evaluar la correlación de miR-33 y miR-144 con la expresión hepática de otros genes blanco (*CROT*, *CPT1A*, *HADHB* y *TLR2*). Así como, la asociación de la expresión de estos genes con HGNA

5 MÉTODOS

5.1 *Grupo de estudio*

Se realizó un estudio de corte transversal en el que participaron 84 pacientes con obesidad clase II/III (54 mujeres y 30 hombres) sometidos a cirugía bariátrica (bypass gástrico o manga gástrica) para reducción de peso corporal en el Hospital General “Dr. Rubén Leñero” de la Ciudad de México.

Los sujetos participantes en el estudio se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios: individuos con obesidad clase III ($\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$) y/o con obesidad clase II ($\text{IMC} \geq 35 \text{ kg/m}^2$) que presentaran una o más comorbilidades como diabetes tipo 2 (DT2), hipertensión (presión arterial sistólica $\geq 140 \text{ mmHg}$ o presión arterial diastólica $\geq 90 \text{ mmHg}$ o tratamiento para la hipertensión), concentración sérica de triacilglicéridos $\geq 150 \text{ mg/dL}$ o de C-HDL $\leq 50 \text{ mg/dL}$ [102]. Ninguno de los pacientes se había sometido a colecistectomía por colecistitis. El rango de edad fue de 20-60 años. Los participantes en el estudio fueron captados de manera consecutiva en un periodo de un año y medio, y una biopsia de tejido hepático se tomó durante la cirugía. Todos los participantes en el estudio firmaron una carta de consentimiento informado. El estudio cumplió con los principios de la declaración de Helsinki, y la presente investigación fue aprobada por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Los siguientes criterios de exclusión fueron considerados; consumo significativo de alcohol >20 g/día, serología positiva para el antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg) o para hepatitis C (anti-HCV) (Johnson-Johnson, BUX, UK).

5.2 Parámetros bioquímicos y clínicos

Las mediciones antropométricas, como peso y talla, se tomaron de acuerdo a la técnica de Lohman y colaboradores [103], con instrumentos que cumplieron las normas de calidad establecidas internacionalmente. El IMC se calculó dividiendo el peso expresado en kilogramos entre la estatura en metros elevada al cuadrado (kg/m^2). Para las mediciones bioquímicas, las muestras sanguíneas se tomaron después de 10 horas en ayunas. Las concentraciones de glucosa sanguínea, insulina, triglicéridos, colesterol total y HDL-C se determinaron de acuerdo a procedimientos previamente descritos [104]. La actividad de las enzimas del funcionamiento hepático en suero: aspartato amino-transferasa (AST), alanina amino-transferasa (ALT) y gamma glutamil transpeptidasa (GGT) se midieron con los métodos disponibles comercialmente (Beckman Counter, CA, USA). Todas las mediciones se realizaron en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). La resistencia a la insulina se calculó empleando el modelo de índice HOMA-IR (modelo de homeostasis para la resistencia a la insulina), mediante la ecuación ($\text{HOMA-IR} = [\text{glucosa (mmol/L)} \times \text{insulina (mUI/L)}] / 22.5$) [105]. Las concentraciones de adiponectina y leptina se determinaron mediante ensayos de ELISA (Linco, MO, USA). El diagnóstico de DT2 se definió por informe de tratamiento con hipoglucemiantes o un valor de glucosa en ayuno ≥ 126 mg/dL [106].

5.3 Histología hepática

Las biopsias hepáticas se tomaron del borde libre del lóbulo izquierdo mediante la técnica de resección en cuña con bisturí armónico. Posteriormente, se sumergieron en RNA^{later} (Ambion/Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y se almacenaron a -80°C. Para la caracterización histológica, una porción de la biopsia hepática se fijó en formaldehído y se embebió en parafina, seccionó y se tiñó con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. La caracterización histológica de la biopsia hepática de todos los participantes fue evaluada por un patólogo del Departamento de Patología del INCMNSZ. El diagnóstico de HGNA se realizó mediante el sistema de puntuación de Kleiner [3]. En la **Tabla 1** se describe la clasificación de las características histológicas empleadas.

Tabla 1: Clasificación de las características histológicas empleadas por Kleiner para la determinación de EHNA.

Esteatosis (% de grasa hepática)	Grado	Inflamación lobular (Focos de inflamación en zona lobular- 20x campo óptico)	Grado	Balonamiento (Presencia)	Grado
< 5%	0	0	0	Poco	1
5 -33 %	1	< 2	1	Abundante	2
34-66 %	2	2 - 4	2		
> 66 %	3	> 4	3		

El puntaje de actividad del HGNA (NAS), el cual se encuentra en un rango de 0 a 8, se obtuvo sumando los distintos grados de esteatosis, inflamación lobular y balonamiento. Con base en estas características y a la puntuación del NAS obtenida,

los grupos se clasificaron de la siguiente manera: sujetos control (histología hepática normal), esteatosis simple (esteatosis grado 1-2, sin inflamación), EHNA limítrofe (EHNA-L, NAS 3-4) y EHNA (NAS \geq 5).

La escala de fibrosis (F) fue considerada en un rango de 0-4: F0, sujetos sin fibrosis; F1, sujetos con fibrosis perisinusoidal o portal (la cual se subdivide en: 1A, fibrosis media perisinusoidal en la zona 3; 1B, fibrosis moderada perisinusoidal en la zona 3; 1C, fibrosis portal y periportal); F2, sujetos con fibrosis perisinusoidal con fibrosis portal/periportal; F3, sujetos con fibrosis en puente y F4, sujetos con cirrosis.

5.4 Medición del contenido de lípidos hepáticos.

Se utilizaron 50 mg de tejido hepático, los cuales se homogenizaron en solución salina (0.9%), los lípidos totales se extrajeron en una solución cloroformo/metanol (2:1 vol/vol) de acuerdo al método de Folch y colaboradores [107]. Posteriormente, la fase orgánica se evaporó bajo la inyección de nitrógeno gaseoso, y los lípidos se re-suspendieron en iso-propanol y Triton X-100 al 10%. Las concentraciones de triglicéridos, colesterol total y libre, así como los fosfolípidos se determinaron mediante el uso de ensayos colorimétricos comerciales (Diagnostic Systems, Holzheim, Bavaria, Germany) y espectrofotometría (Beckman DU 640, Palo Alto, CA, USA). Finalmente, los datos se normalizaron con la concentración de proteína total y expresados como mg/mg de proteína total.

5.5 Análisis del nivel de mRNA

El RNA total fue extraído con Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

El DNA genómico se removió mediante un tratamiento con DNAsa I recombinante (Roche, Rotkreuz, Switzerland). Posteriormente, 500 ng de RNA total se usaron para la síntesis de cDNA empleando los reactivos TaqMan Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Después de la síntesis de cDNA, la expresión génica (mRNA) se cuantificó por PCR en tiempo real usando el producto LightCycler TaqMan Master Real time PCR y el equipo Light-Cycler 480 II (Roche, Rotkreuz, Switzerland). Para la cuantificación se usaron sondas TaqMan de la librería universal (Roche, Rotkreuz, Switzerland) en combinación con oligonucleótidos diseñados para generar amplicones cortos (<150 pb) [108]. El diseño de los oligonucleótidos y selección de la sonda se realizó de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. La lista de oligonucleótidos y sondas empleadas en el estudio se presenta en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Lista de oligonucleótidos y sondas empleados para cuantificar el nivel de mRNA.

Gen	“Forward”	“Reverse”	No. Sonda
<i>ABCA1</i>	tacgtgggcttcacactcaa	actcacagccaaaccca	40
<i>ABCG1</i>	gccctcatgcctactgttct	caggtgtcccgaagaaga	80
<i>CROT</i>	caattccgcaccttga	ggaactggactaagtgcgtga	30
<i>CPT1A</i>	caatcggactctggaaacg	ccgctgaccacgttctc	20
<i>HADHB</i>	ggcttagtggctgcgtgt	ataagcttccactatcatagcatgg	78
<i>TLR2</i>	cgttctctcaggtgactgctc	ccttggatcctgcttgc	30
<i>β-ACTINA</i>	ccaaccgcgagaagatga	ccagaggcgtacagggatag	64

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: pre-incubación de 10 minutos (min) a 95°C seguido de 45 ciclos; cada ciclo consistió de 10 segundos (seg) de

desnaturalización a 95°C, 30 seg de alineamiento a 60°C y 1 seg de extensión a 72°C; el enfriamiento final fue de 30 seg a 40°C. El nivel relativo de mRNA se calculó en relación a β -actina con el Software 1.5.1. del equipo Light-Cycler® 480, que emplea el método matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$.

5.6 *Análisis del nivel de los microRNAs*

Para la síntesis de cDNA se emplearon 50 ng de RNA total y se utilizaron los siguientes ensayos Taqman (TaqMan® MicroRNA Assays INV): hsa-miR-33b-5p (I.D: 002085), hsa-miR-33a-5p (I.D: 002135), hsa-miR-144-3p (I.D: 002676), RNU6B; así como el Kit de transcripción reversa para microRNAs Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El nivel de miR-33a, miR-33b, miR-144 y U6 se determinó mediante PCR en tiempo real. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: pre-incubación de 10 min a 95°C seguido de 55 ciclos; cada ciclo consistió de 15 seg de desnaturalización a 95 °C, 1 min de alineamiento a 60°C y 5 seg de extensión a 72°C; el enfriamiento final fue de 30 seg a 40°C. Los datos fueron normalizados con RNU6B (small nuclear RNA, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y la cuantificación relativa del nivel se calculó usando el Software 1.5.1. del equipo Light-Cycler® 480 ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

5.7 *Cuantificación de proteína mediante inmunodetección tipo*

western

La concentración de proteína se midió en extractos de hígado mediante Western Blot. La proteína total se extrajo de tejidos hepáticos usando el amortiguador para ensayos de inmunoprecipitación (RIPA) y con inhibidores de proteasas (Roche, Rotkreuz, Switzerland). La concentración de proteína total se cuantificó mediante los ensayos con

el grupo de reactivos DC (Bio-Rad, Richmond, CA, USA), y se separaron 80 μ g de proteína total mediante SDS-PAGE en geles al 8%, los cuales fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (GE Healthcare/Amersham Biosciences, NJ, USA). Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con buffer de bloqueo (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario de interés, los cuales se enlistan en la **Tabla 3**. En seguida, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano durante 1.5 hrs. Finalmente, las proteínas inmuno-reactivas se detectaron usando un agente quimioluminisciente (Chemiluminescent HRP Substrate - ECL, Millipore, Billerica, MA, USA), y la señal captada y los análisis, se realizaron mediante el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Todos los ensayos se realizaron por duplicado y los resultados están presentados como la razón de las densidades ópticas (DO) de la proteína de interés entre las proteínas constitutivas (α -tubulina o β -actina).

Tabla 3: Lista de anticuerpos empleados para determinar la concentración de proteína.

Anticuerpo	Característica	Compañía
ABCA1	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
ABCG1	Policlonal	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
CROT	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
HADHB	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
TLR2	Monoclonal	Abcam, Cambridge MA, USA
α -tubulin	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
β -actin	Monoclonal	GeneTex, Irvine CA, USA

5.8 Detección por inmunohistoquímica

Para la detección por inmunohistoquímica se emplearon los mismos bloques generados para la evaluación histológica usando cortes de 3 μm de grosor de las secciones de parafina. Posteriormente, las secciones se desparafinaron y se trataron para recuperación antigénica con la solución 20X ImmunoDNA Retriever Citrate. En seguida, las secciones se bloquearon con la solución ImmunoDetector Peroxidase Blocker (Bios SB, Santa Barbara, CA, USA) y se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ABCA1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Para su detección las secciones se trataron con los reactivos Mouse/Rabbit ImmunoDetector HRP/DAB Detection System (Bios SB, Santa Barbara, CA, USA) y el cromógeno 3-3'-diaminobencidina (DAB); y al final, se realizó una contra-tinción con hematoxilina.

5.9 Análisis estadísticos

Para evaluar las diferencias entre grupos que no presentaron una distribución normal se utilizaron pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis o Mann-Whitney U). Las pruebas de Chi-cuadrada se usaron para variables categóricas nominales. Las pruebas de *t* de *Student* se emplearon sólo para comparar datos de distribución normal entre dos grupos. Las correlaciones se obtuvieron usando pruebas de Spearman no paramétricas y modelos de regresión lineal. Para determinar la interacción entre microRNAs, genes blanco y la enfermedad del HGNA se utilizaron modelos lineales generalizados, los cuales incluyeron las covariables: sexo, edad e IMC. Todos los análisis se realizaron usando el programa SPSS versión 15.0 (Chicago, IL, USA) y los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos.

El poder estadístico de este estudio para encontrar asociación entre el contenido de colesterol libre y la EHNA se determinó mediante el programa G*Power (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) [109]. El tamaño del efecto (d de Cohen) se calculó con base en estudios previos que comparan el nivel hepático de colesterol libre entre sujetos control y con EHNA [32]. Este cálculo proporcionó un tamaño del efecto de 1.1, y se consideró además un error probabilístico (α) de 0.05 y una muestra conformada de 10 sujetos controles y 38 pacientes con EHNA; el poder estadístico calculado fue de 0.84. Por tanto, este estudio tiene la capacidad suficiente para encontrar diferencias significativas entre los grupos de estudio.

6 RESULTADOS

6.1 *Características bioquímicas y clínicas*

Los grupos de estudio no presentaron diferencias significativas con respecto a edad, sexo e IMC ($P>0.05$). Los sujetos controles sin esteatosis presentaron concentraciones significativamente más bajas de triglicéridos circulantes y menor resistencia a la insulina ($P<0.05$); así como concentraciones más altas de adiponectina y HDL-C que los sujetos con EHNA ($P<0.05$) (**Tabla 4**). Por otra parte, aunque se observó incremento en las concentraciones de las enzimas del funcionamiento hepático AST, ALT y GGT, particularmente en el grupo de sujetos con EHNA, estas diferencias no alcanzaron significancia estadística ($P>0.05$). La EHNA estuvo presente en el 76.92% de los sujetos con diabetes, mientras que en los sujetos sin diabetes se observó en un 46.15% ($P<0.05$); la misma tendencia se presentó después de estratificar por sexo (anexo 1).

6.2 *Evaluación histológica*

De los 84 pacientes incluidos en este estudio, 74 pacientes presentaron HGNA (88.1%), de los cuales 17 presentaron esteatosis simple (23.0%), 19 con EHNA-limítrofe (25.7%) y 38 fueron diagnosticados con EHNA (51.3%). Los 10 sujetos restantes (11.9%), no presentaron esteatosis y se consideraron como controles sin esteatosis (**Figura 9**).

Tabla 4: Parámetros antropométricos y bioquímicos de los pacientes de estudio.

Características	Control (n=10)	ES (n=17)	EHNA-L (n=19)	EHNA (n=38)	Valor (P)
Edad (años)	36.30 ± 9.09	36.24 ± 7.67	39.37 ± 9.72	35.95 ± 9.05	n.s
Sexo (hombres %)	20	35.30	26.30	44.70	n.s
IMC (kg/m ²)	45.49 ± 5.68	43.41 ± 4.69	43.79 ± 5.25	45.08 ± 6.62	n.s
Glucosa (mg/dL)	95.9 (90-107)	116 (92-124)	100 (93-118)	115 (96-132)	<0.05 [§]
Insulina (μIU/mL)	11 (5.25-15)	13.45 (5.4-20.45)	14.9 (8.70-24.60)	18.40 (9.35-36.85)	n.s
HOMA-IR	2.70 (1.42-3.38)	3.30 (1.94-6.73)	4.04 (2.16-6.88)	4.73 (2.64-12.83)	<0.01 [§]
DT2 (%)	2 (20)	4 (23.50)	6 (31.60)	20 (52.6)	<0.05 [§]
AST (IU/mL)	31.50 (22-43)	45 (28-79)	28 (23-52)	49 (25-73)	n.s
ALT (IU/mL)	29 (21-57)	32 (20-40)	25 (17-56)	42 (22-50)	n.s
GGT (IU/mL)	17 (12-45)	19 (13 - 39)	16 (13-25)	21 (16-34)	n.s
Adiponectina (μg/mL)	7.62 ± 2.44	7.05 ± 2.59	7.54 ± 2.26	5.9 ± 1.97	<0.05 [§]
Leptina (ng/mL)	32.05 ± 21.42	28.96 ± 14.59	44.29 ± 38.01	47.12 ± 27.88	n.s
Triglicéridos (mg/dL)	90.97 (62.28-104)	144 (104-229)	143.13 (97.7-178)	148.50 (127-217)	<0.01 ^{*.‡.§}
Colesterol total (mg/dL)	173.61 ± 36.64	175.76 ± 45.91	169.68 ± 35.97	163.74 ± 31.83	n.s
HDL-C (mg/dL)	41.54 ± 12.37	30.24 ± 10.81	32.47 ± 9.81	28.71 ± 7.04	<0.05 ^{*.‡.§}
LDL-C (mg/dL)	110.10 ± 28.64	111.59 ± 36.85	101.84 ± 26.41	94.32 ± 30.01	n.s

Los datos están expresados como la media ± la desviación estándar, mediana (rango intercuartil) o n (%)

Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; HOMA-IR, Homeostatic model assessment for insulin resistance (por sus siglas en inglés); DT2, diabetes tipo II; AST, aspartato amino-transferasa; ALT, alanino amino-transferasa; GGT, gama glutamil transpeptidasa; HDL-C, colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (high-density lipoprotein cholesterol, por sus siglas en inglés); LDL-C, colesterol de lipoproteínas de baja densidad (low-density lipoprotein, por sus siglas en inglés); ES, esteatosis simple; EHNA-L, EHNA límite; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica. Valor *P corresponde a las comparaciones entre los controles y el grupo de sujetos con ES; valor ‡P corresponde a las comparaciones entre los controles y el grupo EHNA-L; y valor §P corresponde a las comparaciones entre los controles y el grupo de sujetos con EHNA; n.s, no significativo.

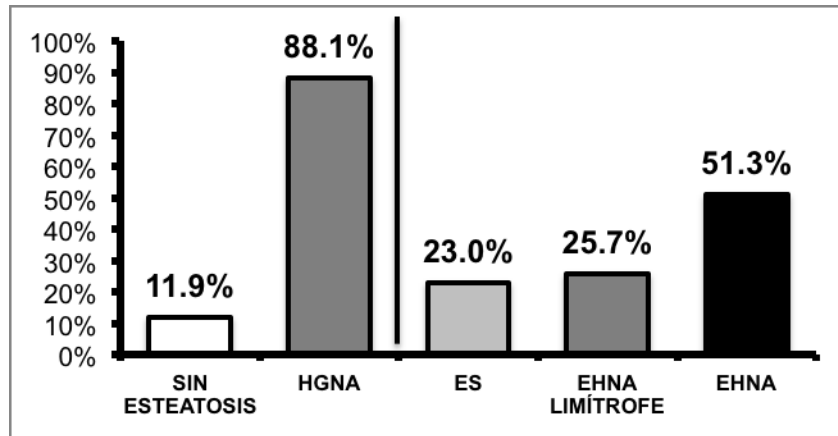


Figura 9: Frecuencia del HGNA en la población de estudio. Esteatosis simple, ES; HGNA, hígado graso no alcohólico; EHNA-L, EHNA limítrofe; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica. Sin esteatosis (controles), n=10; con HGNA, n=74 (ES, n=17; EHNA L, n=19; EHNA, n=38).

6.3 Determinación del contenido de lípidos hepáticos

El contenido hepático de colesterol total (CTH) y colesterol libre (CLH) aumentó particularmente en el grupo de sujetos con EHNA en comparación a los sujetos sin EHNA (50% y 45%, respectivamente, $P < 0.05$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos de sujetos controles, esteatosis simple y EHNA-L ($P > 0.05$) (**Tabla 5**). En contraste, el contenido de triglicéridos hepáticos (TGH) incrementó acorde a la progresión de la enfermedad, siendo el más elevado en el grupo con EHNA ($P < 0.05$), mientras que el contenido de fosfolípidos hepáticos (FLH) fue similar en los cuatro grupos de estudio (**Tabla 5**).

6.4 Asociación de la proteína hepática de ABCA1 y ABCG1 con

HGNA

Los niveles de mRNA de ABCA1 y ABCG1 no fueron significativamente diferentes entre los sujetos con EHNA y los controles sin esteatosis ($P = 0.471$ y 0.621 ; respectivamente,

Figura 10). Sin embargo, el nivel de mRNA de ABCA1 fue significativamente menor en el grupo de sujetos con EHNA en comparación a los sujetos con esteatosis simple ($P=0.030$). A su vez, la concentración a nivel hepático de la proteína de ABCA1 fue más alta en el grupo control que en los sujetos con esteatosis simple y EHNA ($P=0.052$ y $P=0.008$, respectivamente). Resultados similares se obtuvieron para la proteína ABCG1, aunque sólo se observaron diferencias significativas al comparar el grupo de sujetos con EHNA y los controles sin esteatosis ($P=0.048$). A su vez, la proteína ABCA1 se detectó mediante inmunohistoquímica en la región transmembranal y citoplasmática de los hepatocitos de los sujetos control, mientras que la intensidad de la señal de ABCA1 disminuyó en las biopsias de sujetos con EHNA (**Figura 11**).

Tabla 5: Asociación del contenido de lípidos hepáticos con HGNA.

Parámetro	Controles (n=10)	ES (n=17)	EHNA-L (n=19)	EHNA (n=38)
Contenido CTH	0.10 ± 0.05	0.11 ± 0.05	0.09 ± 0.05	0.15 ± 0.09 ^δ
Contenido CLH	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.11 ± 0.08 ^δ
Contenido TGH	0.57 ± 0.5	1.87 ± 1.5 *	1.14 ± 0.6 *	3.43 ± 1.9 *, §, ^δ
Contenido FLH	0.50 ± 0.2	0.48 ± 0.3	0.45 ± 0.3	0.51 ± 0.3

Los datos están expresados como la media ± la desviación estándar.

Esteatosis simple (ES), EHNA-Limítrofe (EHNA-L), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), colesterol total hepático (CTH), colesterol libre hepático (CLH), triglicéridos hepáticos (TGH), fosfolípidos hepáticos (CFH). * $P<0.05$ vs. controles; § $P<0.05$ vs. ES; ^δ $P<0.05$ vs. grupo sin EHNA. Grupo sin EHNA (controles, ES y EHNA-L). Los datos están expresados como mg/mg de proteína.

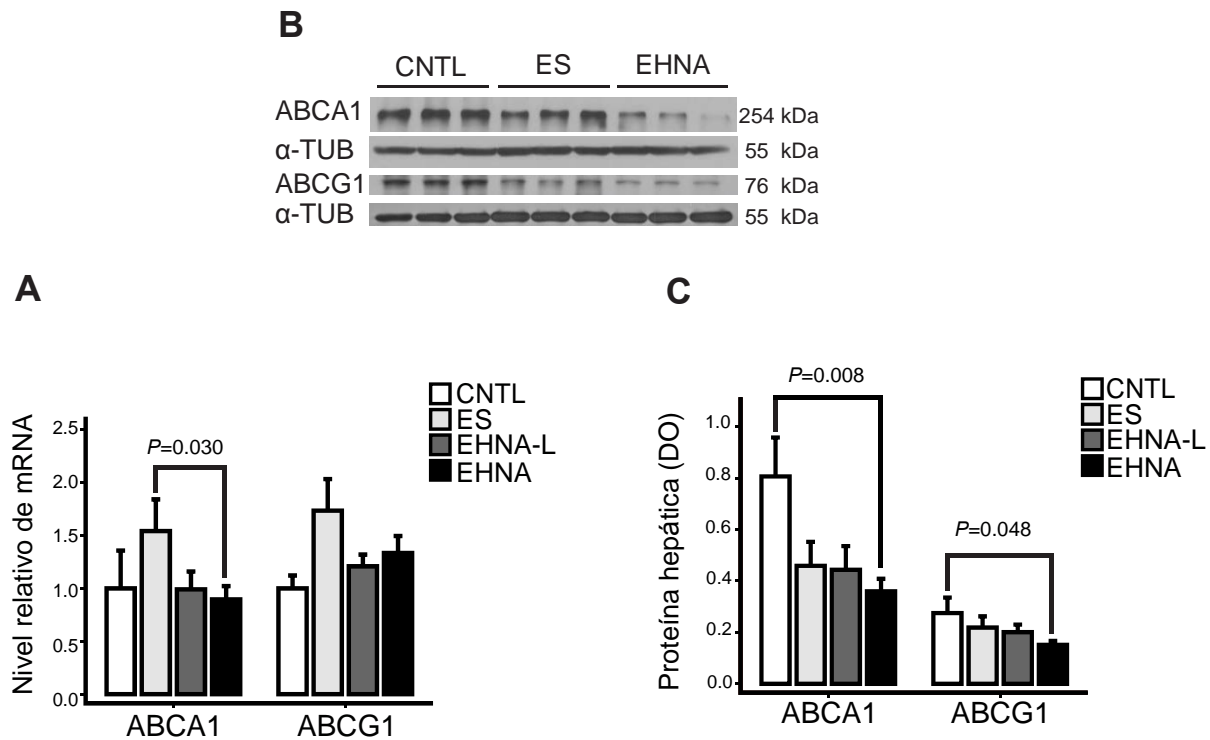


Figura 10: La concentración reducida de la proteína ABCA1 y ABCG1 está asociada con HGNA. (A) Nivel de mRNA de ABCA1 y ABCG1 en los diferentes estadios del HGNA (n=10, controles; n=17, esteatosis simple; n=19, EHNA-L y n=38, sujetos con EHNA). (B) Ejemplo representativo de un inmunoblot de ABCA1 y ABCG1 en tejido hepático de sujetos control, ES y EHNA. (C) Comparación de la concentración de la proteína de ABCA1 y ABCG1 en los diferentes estadios del HGNA. El nivel de mRNA de ABCA1 y ABCG1 se normalizó con β -actina. Los valores de proteína fueron normalizados con α -tubulina, y representan la razón de las densidades ópticas (DO) de ABCA1 y ABCG1/ α -tubulina. Control (CNTL), esteatosis simple (ES), EHNA-Limítrofe (EHNA-L) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Los datos son presentados como la media \pm error estándar.

De manera interesante, las concentraciones de la proteína ABCA1 y ABCG1 fueron menores en los individuos con fibrosis moderada (F2) en comparación a aquellos sin fibrosis hepática ($P=0.008$ y $P=0.004$ para ABCA1 y ABCG1, respectivamente) (**Figura 12**).

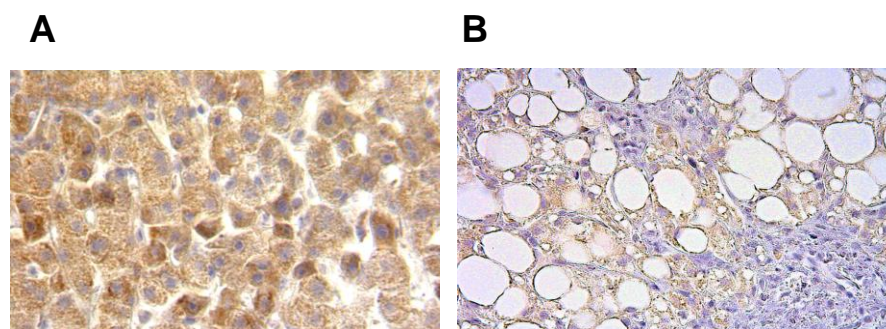


Figura 11: Micrografías representativas de la detección de ABCA1 mediante inmunohistoquímica. (A) Biopsia de hígado de un sujeto control la cual muestra numerosos hepatocitos, la proteína ABCA1 se encuentra en el citoplasma y en la membrana celular. (B) Biopsia de un sujeto con EHNA la cual muestra una disminución de la intensidad de señal de ABCA1. Imagen tomada a 40X.

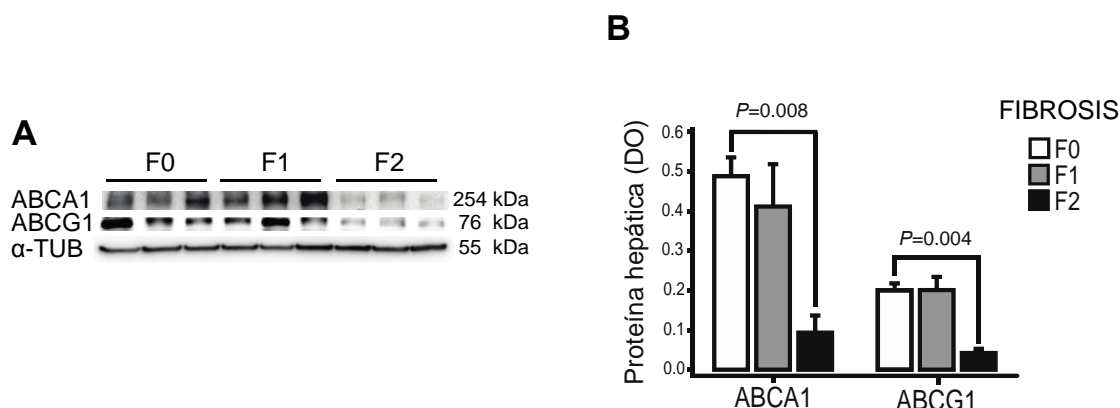


Figura 12: La concentración reducida de la proteína ABCA1 y ABCG1 se asocia con fibrosis grado 2. (A) Ejemplo representativo de ABCA1/ABCG1 por inmunodetección tipo Western en tejido hepático de diferentes grados de fibrosis. (B) Distribución de la concentración de proteína de ABCA1 y ABCG1 en diferentes grados de fibrosis (F0, n=65; F1, n=14; F2, n=5). Los valores representan la razón de las densidades ópticas (DO) de ABCA1 y ABCG1/ α -tubulina. Los datos son presentados como la media \pm error estándar.

6.5 Correlaciones de la proteína hepática de ABCA1 y ABCG1 con los parámetros bioquímicos y con el contenido de lípidos hepáticos

Las concentraciones hepáticas de las proteínas ABCA1 y ABCG1 correlacionaron positivamente con las concentraciones del colesterol HDL ($r=0.225$, $P=0.040$; y $r=0.347$, $P=0.001$, respectivamente), colesterol total ($r=0.281$, $P=0.010$; y $r=0.252$, $P=0.021$, respectivamente) y LDL-C ($r=0.309$, $P=0.004$; and $r=0.334$, $P=0.002$, respectivamente). Por otra parte, la concentración de la proteína ABCA1, pero no de ABCG1 correlacionó positivamente con la concentración plasmática de adiponectina ($r=0.231$, $P=0.043$ y $r=0.174$, $P=0.130$, respectivamente). Con respecto al contenido de lípidos hepáticos, la concentración de la proteína ABCA1 presentó una correlación positiva y significativa con el contenido hepático de colesterol libre ($r=0.270$; $P=0.014$) y con el contenido de fosfolípidos ($r=0.260$, $P=0.018$). Por el contrario, la concentración de la proteína ABCG1 no presentó correlación significativa con los lípidos hepáticos analizados (**Tabla 6**). Debido a que se ha reportado que la DT2 y/o los tratamientos hipoglucemiantes podrían alterar la expresión de ABCA1 [110,111], se realizó un análisis excluyendo a los sujetos con DT2 ($n=32$). Se demostró que el grupo de sujetos sin DT2 presenta la misma tendencia observada para los distintos parámetros analizados en la población completa (anexo 2).

6.6 Correlación del nivel de miR-33a y miR-144 con la expresión de los genes ABCA1 y ABCG1 en biopsias hepáticas

El nivel de miR-33a correlacionó inversamente con el nivel de mRNA de ABCA1 ($r=-0.221$, $P=0.050$) y concentración de proteína ($r=-0.305$, $P=0.006$). Sin embargo, los

Tabla 6: Correlaciones entre las concentraciones de las proteínas de ABCA1/ABCG1 y los parámetros bioquímicos.

	ABCA1		ABCG1	
	Coefficiente de correlación	Valor de <i>P</i>	Coefficiente de correlación	Valor de <i>P</i>
IMC (kg/m ²)	-0.007	0.950	0.131	0.237
Glucosa (mg/dL)	-0.132	0.240	-0.140	0.212
Insulina (μIU/mL)	-0.145	0.207	-0.019	0.870
HOMA-IR	-0.152	0.195	-0.020	0.864
AST (IU/mL)	-0.214	0.052	-0.108	0.333
ALT (IU/mL)	-0.146	0.189	-0.129	0.245
GGT (IU/mL)	0.060	0.590	-0.123	0.266
Adiponectina (μg/mL)	0.231	0.043	0.174	0.130
Leptina (ng/mL)	0.016	0.888	0.061	0.601
Triglicéridos (mg/dL)	0.080	0.472	-0.016	0.887
Colesterol (mg/dL)	0.281	0.010	0.252	0.021
HDL-C (mg/dL)	0.225	0.040	0.347	0.001
LDL-C (mg/dL)	0.309	0.004	0.334	0.002
Contenido TGH (mg/mg Proteína)	-0.075	0.505	-0.140	0.211
Contenido CTH (mg/mg Proteína)	0.203	0.067	0.047	0.674
Contenido CLH (mg/mg Proteína)	0.270	0.014	0.040	0.718
Contenido FH (mg/mg Proteína)	0.260	0.018	0.047	0.676

Pruebas no paramétricas (correlación Spearman)

niveles de miR-33a no correlacionaron significativamente con el nivel de mRNA o concentración de proteína de ABCG1. Por otro lado, los niveles de miR-33b presentaron una correlación inversa con el nivel de mRNA de ABCA1 y ABCG1 ($r=-0.436$, $P=5.9 \times 10^{-4}$; y $r=-0.334$, $P=0.003$; respectivamente), pero no con las concentraciones de las proteínas ABCA1 y ABCG1 (**Tabla 7**).

De manera similar, el nivel de miR-144 mostró una correlación inversa con el nivel de mRNA y concentración de proteína ABCA1 ($r=-0.142$, $P=0.220$ y $r=-0.229$, $P=0.043$, respectivamente), pero no con la expresión del gen *ABCG1* (**Tabla 7**).

Tabla 7: Correlaciones entre el nivel hepático de microRNAs y la expresión de los genes *ABCA1/ABCG1*.

	miR-33a		miR-33b		miR-144	
	Coefficiente de correlación	Valor de <i>P</i>	Coefficiente de correlación	Valor de <i>P</i>	Coefficiente de correlación	Valor de <i>P</i>
ABCA1 mRNA	-0.221	0.050	-0.436	5.9×10^{-4}	-0.142	0.212
ABCA1 Proteína	-0.305	0.006	0.070	0.538	-0.229	0.043
ABCG1 mRNA	-0.143	0.209	-0.334	0.003	0.041	0.720
ABCG1 Proteína	-0.181	0.110	0.015	0.894	-0.131	0.251

Pruebas no paramétricas (correlación Spearman)

En consistencia con la correlación inversa entre miR-33a/144 y ABCA1, estos microRNAs presentaron una correlación inversa con la concentración plasmática del colesterol HDL ($r=-0.313$, $P=0.004$; para miR-33a) y ($r=-0.221$, $P=0.043$; para miR-144).

6.7 Asociación del nivel de miR-33a y miR-144 con HGNA

Aunque el nivel relativo de miR-33a aumentó de manera progresiva con respecto a la enfermedad, sólo fue estadísticamente significativo y más alto en individuos con EHNA en comparación al grupo de sujetos control sin esteatosis ($P=0.006$) (**Figura 13**). Esta diferencia se mantuvo significativa incluso después de ajustar por las concentraciones de la proteína ABCA1 ($P=0.018$), sugiriendo que miR-33a podría participar en el

desarrollo del HGNA mediante la regulación de otros genes blanco. Por otra parte, el nivel relativo de miR-144 fue significativamente más alta sólo en los sujetos con EHNA ($P=0.024$) (**Figura 13**), cabe mencionar que esta diferencia no permaneció significativa después de ajustar por las concentraciones de la proteína ABCA1, aunque mantuvo una tendencia ($P=0.081$). El nivel relativo de miR-33b no presentó diferencias significativas entre grupos ($P>0.05$) (**Figura 13**).

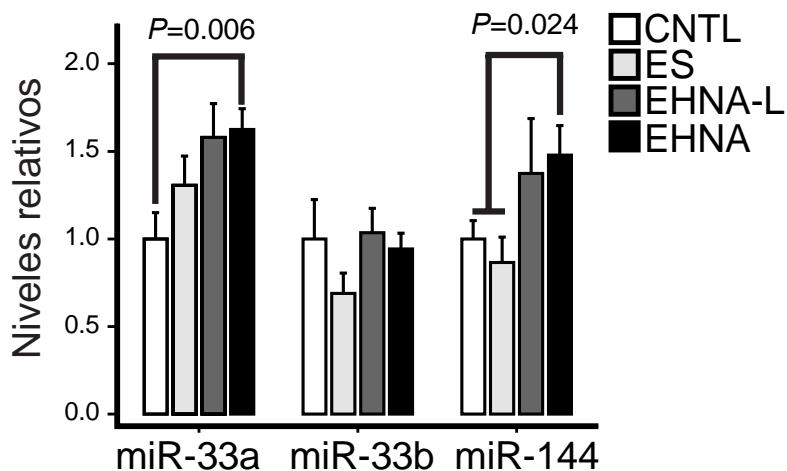


Figura 13: El nivel de miR-33a y miR-144 está incrementado en sujetos con EHNA. El nivel relativo de miR-33a/b y miR-144 se midió en tejido hepático de sujetos con obesidad clase II/III mediante sondas TaqMan con PCR en tiempo real de sujetos control (n=10), esteatosis simple (n=17), EHNA-L (n=19) y EHNA (n=38). La abundancia relativa de los microRNAs se calculó después de la normalización con “small nuclear RNA U6” (RNU6B). Control (CNTL), esteatosis simple (ES), EHNA-Limítrofe (EHNA-L) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos están presentados como la media \pm error estándar.

Llama la atención que el nivel relativo de miR-33a y miR-144 fue más alto en sujetos con fibrosis moderada (F2), que en aquellos con fibrosis grado 0, aunque la diferencia no fue significativa ($P=0.098$ y $P=0.168$, respectivamente), (**Figura 14**).

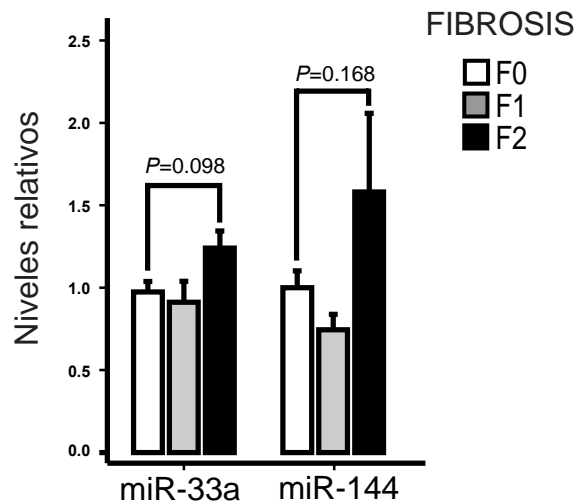


Figura 14: Distribución de los niveles de miR-33a y miR-144 en diferentes grados de fibrosis. (F0, n=65; F1, n=14; F2, n=5). La abundancia relativa de los microRNAs se calculó después de la normalización con RNU6B. Los datos están presentados como la media \pm error estándar.

6.8 Correlación del nivel de miR-33a con la expresión de los genes CROT, CPT1A y HADHB, y asociación con HGNA

Como se mencionó previamente, la asociación del nivel de miR-33a con la EHNA se mantuvo significativa aun después de ajustar por la concentración de la proteína ABCA1 ($P=0.018$), lo que indica la participación de otros genes blanco para miR-33a en el desarrollo del HGNA, incluidos algunos participantes en el catabolismo de los ácidos grasos.

El nivel de miR-33a y los niveles de mRNA de CROT y HADHB correlacionaron inversamente aunque sin significancia estadística ($r=-0.185$, $P=0.140$; $r=-0.238$, $P=0.056$, respectivamente). Mientras que el nivel de mRNA de CPT1A presentó una correlación inversa muy baja con los niveles de miR-33a ($r=-0.056$,

$P=0.650$). Además, el nivel de miR-33a presentó una relación inversa y significativa con la concentración de la proteína de CROT ($r=-0.271$, $P=0.028$), mientras que la concentración de la proteína de HADHB sólo presentó una tendencia negativa ($r=-0.184$, $P=0.139$, **Tabla 8**).

Tabla 8: Correlación del nivel de miR-33a con el de mRNA de sus genes blanco en el metabolismo de los ácidos grasos.

	miR-33a	
	Coefficiente de Correlación	Valor <i>P</i>
<i>mRNA</i>		
CROT	-0.185	0.140
HADHB	-0.238	0.056
CPT1A	-0.058	0.650
<i>Proteína</i>		
CROT	-0.271	0.028
HADHB	-0.184	0.139

Pruebas no paramétricas (correlación Spearman), $n=66$.

Con respecto a la asociación con HGNA. Los niveles de mRNA de CROT, CPT1A y HADHB fueron más bajos en sujetos con esteatosis simple que los controles sin esteatosis ($P=0.115$, $P=0.030$ y $P=0.017$, respectivamente) (**Figura 15**). De igual manera, los niveles de mRNA de CROT, CPT1A y HADHB fueron menores en sujetos con EHNA, aunque ninguna de estas diferencias fue significativa ($P=0.115$, $P=0.100$ y $P=0.053$, respectivamente) (**Figura 15**).

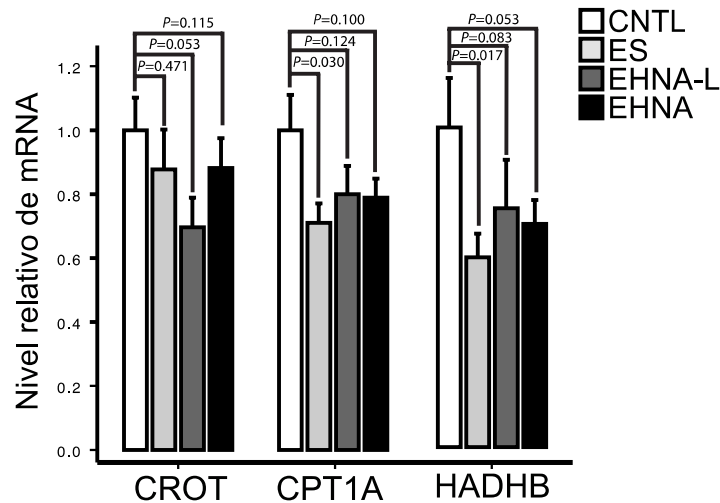


Figura 15: Niveles de mRNA de CROT, HADHB y CPT1A en los diferentes estadios del HGNA. La expresión de los genes se analizó en muestras con suficiente cantidad de tejido, n=66. (n=9, controles; n=14, ES; n=14, EHNA-L y n=29, sujetos con EHNA. El nivel relativo de mRNA se normalizó con β -actina. Control (CNTL), esteatosis simple (ES), EHNA-Limítrofe (EHNA-L) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Los datos son presentados como la media \pm error estándar.

Por otro lado, la concentración de la proteína CROT fue más baja en los sujetos con esteatosis simple y EHNA que el grupo control, aunque la diferencia no alcanzó significancia estadística ($P=0.072$, $P=0.221$, respectivamente), mientras que la concentración de la proteína de HADHB fue similar en los distintos grupos con HGNA ($P>0.3$) (Figura 16).

6.9 Correlación entre el nivel hepático de miR-144 y su gen blanco TLR2, y asociación con HGNA

Un estudio previo encontró que el nivel de miR-144 correlacionó negativamente con la expresión del gen *TLR-2* en el hígado de ratas con EHNA inducida con una dieta alta en grasa [90]. Por tanto, en este estudio se evaluó la correlación de miR-144 con la

expresión de TLR2 y su asociación con el HGNA. Aunque se ha predicho que TLR-2 en humano tiene un sitio de unión para miR-144 en la región 3'UTR, el nivel de miR-144 no correlacionó significativamente con el nivel del mRNA o proteína de TLR2 ($r=0.132$, $P=0.293$; $r=-0.023$, $P=0.856$, respectivamente, **Tabla 9**).

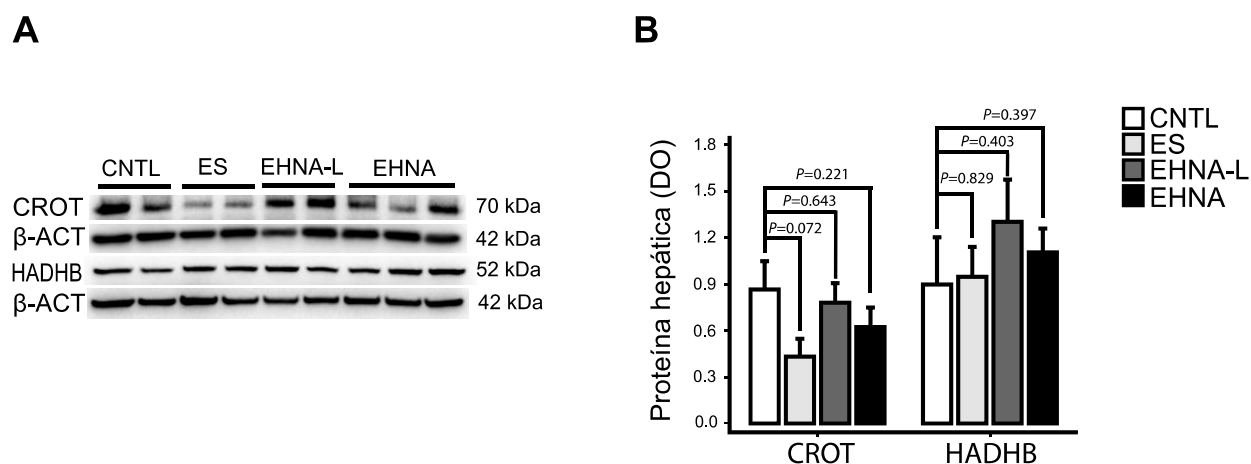


Figura 16: Relación de la concentración de proteína de CROT y HADHB con HGNA. (A) Ejemplo representativo de inmunodetección tipo Western de CROT y HADHB de sujetos control (n=9), ES (n=14), EHNA-L (n=14) y EHNA (n=29). (B) Comparación de la expresión de proteína de CROT y HADHB en sujetos control, ES, EHNA-L y EHNA. Los valores representan la razón de las densidades ópticas (DO) de CROT y HADHB/β-actina. Control (CNTL), esteatosis simple (ES), EHNA limítrofe (EHNA-L) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Los datos son presentados como la media ± error estándar. n=66.

Tabla 9: Correlación del nivel de miR-144 con la expresión del gen *TLR2*.

	miR-144	
	Coefficiente de correlación	Valor <i>P</i>
TLR2 mRNA	0.132	0.293
TLR2 Proteína	0.023	0.856

Pruebas no paramétricas (correlación Spearman), n=66

Además, los niveles de mRNA de TLR2 no variaron entre los diferentes grupos de estudio ($P=0.880$) (**Figura 17 A**). A su vez, mientras las concentraciones de proteína aumentaron gradualmente con la severidad de la enfermedad, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P=0.170$, **Figura 17 B-C**).

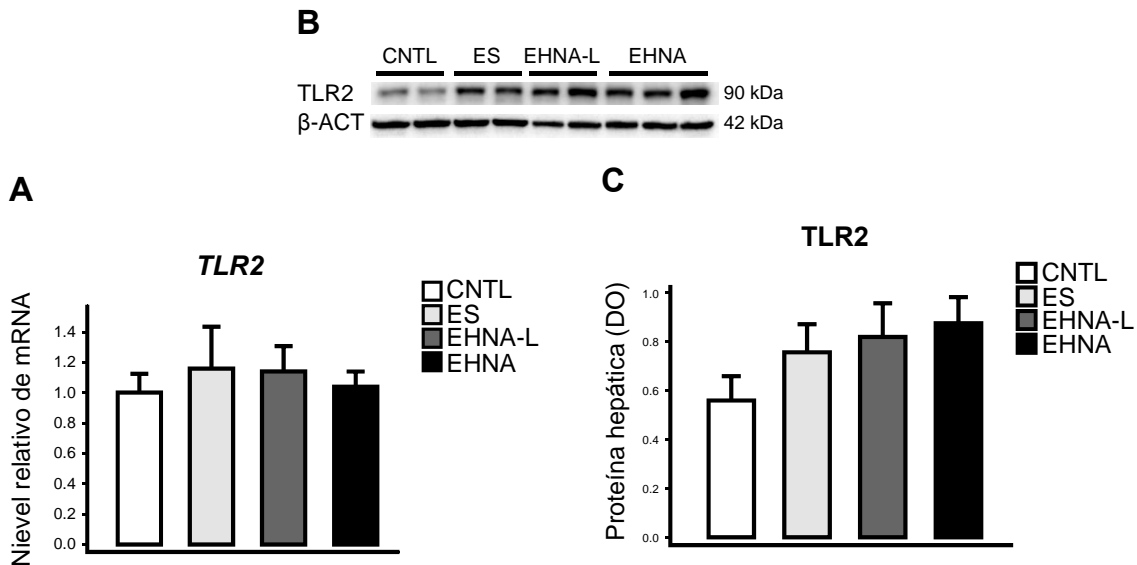


Figura 17: Relación de la expresión del gen *TLR2* con HGNA. (A) Niveles de mRNA de TLR2 en diferentes estados del HGNA (n=9, controles; n=14, ES; n=14, EHNA-L y n=29, EHNA). (B) Inmunodetección tipo Western de TLR2 en tejido hepático de sujetos controles, ES, EHNA-L y EHNA. (C) Comparación de las concentraciones de proteína de TLR2 en sujetos control, ES, EHNA-L y EHNA. Los valores del nivel de mRNA y concentración de proteína de TLR2 se normalizaron con β -actina. Control (CNTL), esteatosis simple (ES), EHNA-limítrofe (EHNA-L) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Los datos son presentados como la media \pm error estándar. n=66.

7 DISCUSIÓN

En estudios recientes se ha demostrado que el incremento de colesterol libre está implicado en los estados más avanzados del HGNA, tales como esteatohepatitis y fibrosis hepática [31,32,49,59]. El eflujo del colesterol es uno de los mecanismos participantes en la regulación de la concentración de colesterol hepático, éste tiene una participación importante no sólo en el metabolismo de los lípidos y en la fisiología normal del hígado, sino también en distintos procesos patológicos incluyendo el HGNA [43,72,112]. Por ello, en este estudio se analizó la relación entre la expresión hepática de los transportadores ABCA1/ABCG1, los cuales representan un paso limitante en el eflujo de colesterol; los microRNAs miR-33a/b y miR-144, reguladores de la expresión de estos transportadores y su asociación con el desarrollo del HGNA.

7.1 Incremento en los niveles de colesterol libre en sujetos con esteatohepatitis

En la presente investigación se observó un incremento en el contenido de colesterol libre hepático en los sujetos con esteatohepatitis, pero no en los pacientes con esteatosis simple, lo que sugiere que el colesterol está implicado en la segunda agresión del HGNA. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que presentan niveles aumentados de colesterol libre en el hígado de sujetos con esteatohepatitis [31,32]. Sin embargo, el mecanismo a través del cual el aumento de colesterol libre hepático condiciona al desarrollo de esteatohepatitis, aun no se ha dilucidado completamente. Se ha propuesto que el efecto citotóxico del colesterol, la disrupción de la integridad de la membrana mitocondrial y del retículo endoplasmático

(RE), podrían estar relacionados con desarrollo del estrés oxidativo y del RE, mecanismos asociados a la segunda agresión del HGNA, en la cual se presenta la esteatohepatitis [31,36,113,114].

7.2 Participación de los transportadores de colesterol ABCA1 y ABCG1 en el HGNA

La concentración de la proteína ABCA1 se encontró reducida en sujetos con esteatosis simple aunque sólo presentaron diferencias significativas en sujetos con esteatohepatitis. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos en modelos murinos, donde la esteatohepatitis se asoció con la disminución en la concentración de la proteína ABCA1 y a un incremento en el contenido de lípidos hepáticos (colesterol, triglicéridos y AGL), mientras que la sobre-expresión de ABCA1 resultó en el aumento del eflujo de colesterol y la disminución del contenido de lípidos hepáticos [72,73]. Sin embargo, un estudio en sujetos de origen asiático con sobrepeso, reveló un incremento en la concentración hepática de la proteína ABCA1 en pacientes con esteatosis simple [115]. Las inconsistencias observadas entre la expresión hepática de ABCA1 y su asociación con el HGNA en las distintas poblaciones estudiadas, podría deberse, al menos en parte, a las diferencias étnicas, antropométricas y clínicas de los pacientes participantes en los diversos estudios. Particularmente, en este trabajo se incluyeron sujetos mexicanos con obesidad clase II/III, la cual representa un padecimiento cuya fisiopatología es distinta a la observada en sujetos con sobrepeso [116]. Por ejemplo, a diferencia de lo observado en el grupo de sujetos asiáticos, en los cuales tanto las concentraciones del colesterol HDL, como de la proteína ABCA1 aumentan ligeramente en los sujetos con esteatosis simple, en el presente estudio, las concentraciones de

estos dos parámetros se encuentran disminuidas en sujetos con esteatohepatitis, sugiriendo una reducción en la biogénesis de las HDLs y en el eflujo del colesterol hepático, lo cual denota las diferencias metabólicas que pueden ser encontradas en las distintas poblaciones de estudio. De igual manera, se observó una disminución en la concentración hepática de la proteína ABCG1 en sujetos con esteatohepatitis. Estos hallazgos son consistentes con lo observado recientemente por Min y colaboradores [59], quienes informaron una reducción en la concentración de proteína de ABCG1 en sujetos con esteatohepatitis.

Además, las concentraciones hepáticas de las proteínas de ABCA1 y ABCG1 correlacionaron positiva y significativamente con la concentración plasmática del colesterol HDL, indicando un mayor eflujo de colesterol en el hígado. Por tanto, una correlación negativa con el contenido de colesterol hepático podría ser anticipada. Sin embargo, aunque las concentraciones de las proteínas ABCA1 y ABCG1 disminuyeron y el contenido de colesterol libre hepático aumentó en biopsias con esteatohepatitis, ambos parámetros, concentraciones de proteína (ABCA1 y ABCG1) y el colesterol libre, no presentaron una correlación inversa. De hecho, la concentración de proteína de ABCA1 presentó una correlación positiva con el contenido de colesterol libre. Una posible explicación podría ser atribuida a que las variaciones en las concentraciones de ABCA1 afectan otras rutas en el metabolismo del colesterol. En el modelo murino se observó que la sobre-expresión hepática de ABCA1 conduce a un incremento en el contenido de colesterol hepático, aparentemente mediado por la expresión incrementada de genes que elevan el contenido de colesterol hepático tales como la

HMGCR, el receptor LDL-R y la proteína relacionada al receptor LDL (LRP) [117]. Lo cual podría explicar, al menos en parte, la correlación positiva entre el incremento en las concentraciones de proteína ABCA1 y la acumulación del colesterol libre hepático. Además, en otro estudio se demostró que el aumento en el contenido de colesterol incrementa la abundancia de la proteína ABCA1 por mecanismos de ubiquitinación, limitando la degradación de este transportador [118]; los autores sugieren que la estabilización de ABCA1 permite a las células exportar el exceso de colesterol y restaurar el balance en la homeostasis celular [118]. Por lo tanto, en el presente estudio, la concentración de la proteína ABCA1 podría aumentar debido al incremento en el contenido de colesterol hepático, en un intento por mantener la homeostasis del colesterol; lo cual podría explicar también la correlación positiva encontrada entre estos dos parámetros. El hecho de que la concentración de la proteína ABCA1 permanezca reducida en los sujetos con esteatohepatitis, sugiere la existencia de mecanismos adicionales ejerciendo una regulación negativa y afectando el eflujo del colesterol hepático. Por tanto, aunque es difícil establecer en que medida los transportadores del eflujo de colesterol ABCA1 y ABCG1, modulan la acumulación del colesterol hepático, las concentraciones disminuidas de estas proteínas en sujetos con esteatohepatitis, y la correlación positiva con las concentraciones reducidas del colesterol HDL, indican una disminución en el eflujo de colesterol, y en consecuencia, podrían desencadenar disfunción mitocondrial y estrés en el retículo endoplasmático, características asociadas a la esteatohepatitis.

Además, en un estudio reciente en células estelares hepáticas, se demostró que la disminución en la expresión del gen *ABCA1* aumenta la acumulación de

colesterol libre y contribuye a la activación de células estelares hepáticas [49], las cuales tienen una participación relevante en la fisiopatología de la fibrosis. Lo anterior podría explicar por qué las concentraciones de las proteínas ABCA1 y ABCG1 disminuyeron drásticamente en sujetos con fibrosis. Por lo que estudios futuros *in situ* en este grupo de sujetos, ayudarán a entender las posibles implicaciones de estos transportadores en el desarrollo de procesos fibrogénicos. De manera adicional, otro mecanismo por el cual el transportador ABCA1 podría tener una participación en la prevención del HGNA, es a través de la modulación de la respuesta inflamatoria. Se ha descrito en macrófagos, que la interacción entre apoA1 y ABCA1 activa la ruta cinasa Janus 2 y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (JAK2/STAT3), lo cual suprime la respuesta inflamatoria independiente del transporte de lípidos [119]. Por lo que será de relevancia evaluar este mecanismo, tanto en humanos como en modelos experimentales con esteatohepatitis, para definir si la disminución en la expresión de ABCA1 modula procesos inflamatorios, vía JAK2/STAT3.

7.3 Correlación de las concentraciones plasmáticas de adiponectina con las concentraciones hepáticas de la proteína ABCA1

La correlación positiva observada en la presente investigación, entre la concentración de adiponectina en suero y la concentración hepática de la proteína de ABCA1, podría explicar en parte, la disrupción en la homeostasis del eflujo de colesterol. En estudios previos se ha demostrado una correlación positiva —dosis dependiente— entre la concentración de adiponectina recombinante humana y las concentración de proteína ABCA1 en cultivos primarios de hepatocitos y en líneas células hepáticas de humano [120,121]. Además, en tejido hepático de ratón, “knock-out” para adiponectina,

disminuyó la concentración de la proteína de ABCA1 [122]. Por tanto, aunque no se ha descrito el mecanismo por el cual la adiponectina regula la expresión hepática de ABCA1, estos resultados sugieren que las concentraciones reducidas de adiponectina en sujetos con esteatohepatitis podrían contribuir a la disminución de las concentraciones hepáticas de la proteína ABCA1. Sin embargo, llama la atención que la asociación de las concentraciones reducidas de la proteína de ABCA1 con esteatohepatitis se mantuvo significativa, aun después de ajustar por las concentraciones plasmáticas de adiponectina ($P=0.035$), lo cual sugiere que otros mecanismos, además de los que involucran a la adiponectina, podrían estar modulando la expresión de ABCA1 en la enfermedad del HGNA.

7.4 Correlación del nivel de miR-33 a y b con la expresión hepática de los genes ABCA1 y ABCG1, y asociación con el HGNA

Dado que las proteínas ABCA1 y ABCG1 se encuentran reducidas en los sujetos con esteatohepatitis, pero sin variación significativa en los niveles de mRNA, es factible considerar la participación de mecanismos post-transcripcionales que regulen el flujo del colesterol. En distintos estudios se ha descrito que miR-33 reprime la expresión de la proteína ABCA1 en cultivos de líneas celulares hepáticas de ratón y humano, así como la expresión de ABCG1 en hepatocitos de origen murino [75,84].

En este estudio, el nivel de miR-33a presentó una correlación inversa y significativa con la concentración de la proteína ABCA1, pero sólo una tendencia con el nivel de mRNA de ABCA1. Estos resultados son consistentes con lo observado en biopsias hepáticas de primates no-humanos, donde el tratamiento con anti-miR-33

presentó un efecto modesto sobre los niveles de mRNA de ABCA1, pero un fuerte incremento en la expresión de la proteína de ABCA1 [76]. Por el contrario, el nivel de miR-33a no correlacionó con la concentración hepática de la proteína ABCG1, lo cual es congruente con la ausencia de un sitio de reconocimiento conservado en humanos para miR-33a en el gen *ABCG1* [84]. Por tanto, miR-33a podría tener una participación en la reducción del eflujo del colesterol principalmente a través de la regulación de las concentraciones de la proteína ABCA1. Estos hallazgos son consistentes, con el incremento progresivo de miR-33a observado desde la esteatosis hasta la esteatohepatitis, efecto contrario observado con las concentraciones de la proteína ABCA1. Además, el nivel de miR-33a correlacionó inversamente con la concentración plasmática del colesterol HDL, sugiriendo una reducción del eflujo del colesterol hepático, posiblemente a través de la reducción de ABCA1, y en consecuencia de la biogénesis de las HDLs. En este sentido, el incremento de miR-33a en los sujetos con esteatohepatitis podría contribuir a la acumulación de colesterol hepático y desencadenar reacciones adversas asociadas al incremento del colesterol y/o modulación de ABCA1.

Por otra parte, la correlación inversa de miR-33b con el nivel hepático del mRNA de ABCA1, está en línea con lo observado en un modelo de ratón que expresa el miR-33b o en primates no-humanos, en los cuales miR-33b correlaciona inversamente con el nivel del mRNA de ABCA1 en el hígado [123,124]. Además, la correlación inversa de miR-33b con el nivel de mRNA de ABCG1 observada en la presente investigación, podría atribuirse a una unión no totalmente complementaria con el mRNA de ABCG1, induciendo su degradación; mecanismo propuesto para algunos

microRNAs [81,125,126]. Lo anterior podría deberse a que las isoformas de miR-33a y miR33b difieren en sólo dos nucleótidos de su secuencia madura, aunque son idénticos en la región de reconocimiento [88]. En este sentido, el miR-33b podría adherirse a sitios de unión en la región 3'UTR de *ABCG1*, lo cual podría resultar en la degradación y/o desestabilización de su mRNA. Además, esta diferencia de nucleótidos podría explicar la ausencia de correlación de miR-33b con la concentración de la proteína ABCA1 y ABCG1, afectando quizá la dinámica de la degradación y el almacenamiento del mRNA de sus genes blanco en los cuerpos P [127]. Adicionalmente, el mecanismo de represión traduccional podría ser completamente diferente entre estas dos isoformas [81]. Por lo que, la correspondencia entre la desestabilización del mRNA y la disminución en la concentración de proteína podría estar distorsionada [128]. De manera adicional, es importante resaltar que no se encontraron diferencias significativas de miR-33b en los diferentes grupos de estudio, ni tampoco una relación con las concentraciones plasmáticas del colesterol HDL. Por lo tanto, estos datos sugieren que miR-33b no tiene una participación en el desarrollo del HGNA, a través de la regulación en el eflujo de colesterol.

7.5 Correlación del nivel de miR-144 con la expresión del gen

ABCA1, y asociación con HGNA

Se ha demostrado que la inducción con análogos de miR-144 también reduce la concentración de la proteína ABCA1 y el eflujo de colesterol en líneas celulares hepáticas de humano [86]. Por ello, se decidió explorar la asociación de miR-144 con la expresión hepática del gen *ABCA1* y con el HGNA, encontrando una correlación

inversa y significativa de miR-144 con la concentración de la proteína ABCA1, pero no con el mRNA. Por tanto, al igual que miR-33a, la reducción en las concentraciones de proteína de ABCA1 podría estar influenciada por el incremento de miR-144, actuando a nivel post-transcripcional. Además, un hecho interesante es que el nivel de miR-144 incrementó particularmente en sujetos con esteatohepatitis, lo que indica la participación de miR-144 en estados más avanzados de la enfermedad, que es consistente a lo observado en un modelo de ratón, el cual fue tratado con un análogo de miR-144, en el que aumentó el contenido de colesterol hepático; así como las concentraciones plasmáticas de TNF- α , interleucina 1 β (IL-1 β) y interleucina 6 (IL-6) [129]. Lo anterior indica que miR-144 promueve la producción de citocinas pro-inflamatorias, las cuales son características del desarrollo a esteatohepatitis.

En conjunto, estos resultados sugieren que la reducción en la concentración hepática de la proteína ABCA1 en los sujetos con esteatohepatitis, es modulada por el incremento de miR-33a y miR-144 en este grupo de sujetos, y podría contribuir al desarrollo del HGNA, al menos en parte, a través de la inhibición del eflujo del colesterol.

7.6 Otros genes blanco para miR-33

Se ha demostrado que miR-33a regula otros genes blanco, incluyendo genes que codifican proteínas involucradas en el catabolismo de los ácidos grasos (*CROT*, *HADHB* y *CPT1A*) [82,88,89]. Por tanto, se decidió explorar la relación de miR-33a con la expresión de estos genes, encontrando que miR-33a correlacionó inversamente con el nivel hepático del mRNA de *CROT* y *HADHB*, pero no con el nivel del mRNA de

CPT1A, consistente con lo observado en biopsias hepáticas de primates no-humanos con síndrome metabólico, en donde el tratamiento con anti-miR-33a reveló un efecto modesto sobre los niveles del mRNA de CROT y HADHB, sin observar cambios en el nivel de CPT1A [123]. Además, únicamente la concentración de la proteína CROT correlacionó negativa y significativamente con el nivel de miR-33a, en línea con la reducción en la concentración de esta proteína en el grupo de sujetos con esteatosis. Por tanto, el incremento en el nivel de miR-33a podría reducir la oxidación de los ácidos grasos, a través de la inhibición de CROT, limitando la trans-esterificación a ésteres de carnitina, y de esta manera, evitando el transporte de moléculas de acil-CoA a la mitocondria. En consecuencia, la acumulación de ácidos grasos en el hígado podría contribuir al desarrollo del HGNA, al menos, en los primeros estadios de la enfermedad. Cabe mencionar, que aun cuando en hepatocitos y líneas celulares hepáticas de humano, el microRNA-33a regula la expresión de distintos genes en el catabolismo de los ácidos grasos [82,88,89], su efecto *in vivo* y bajo condiciones de alteraciones metabólicas podría ser diferente, como se observó en el este estudio y en primates no humanos con obesidad [123], en los que se evidenció que miR-33a parece tener únicamente un efecto modesto sobre la expresión del gen *CROT*. Por lo que miR-33a podría tener una participación más importante en la esteatohepatitis, a través de la regulación del transportador del eflujo de colesterol ABCA1, en presencia de obesidad.

7.7 Asociación de la expresión del gen *TLR-2* con el nivel hepático de *miR-144* e *HGNA*

De manera reciente, en un modelo de rata con esteatohepatitis inducida con una dieta alta en grasa y deficiente en metionina y colina, se demostró que la modulación de

miR-144 podría contribuir a la producción de citocinas pro-inflamatorias y a la progresión de esteatohepatitis a través de la regulación de TLR2 [90]. Aunque se predice mediante análisis bio-informáticos, que el gen de TLR2 en humano contiene un elemento de respuesta para miR-144 en su región 3' UTR; —en contraste a lo observado con la expresión de ABCA1— en el presente estudio no se encontró una correlación significativa entre miR-144 y la expresión del gen *TLR2* (mRNA o proteína). Esto podría atribuirse a que TLR2 tiene sólo un sitio de unión para miR-144 mientras que ABCA1 contiene 7 elementos de respuesta [87]. Además, basados en análisis bioinformáticos que utilizan el score mirSVR [130], se predice que ABCA1 tiene mayores probabilidades de ser modulado por miR-144 que TLR2. Por tanto, esta carencia de correlación podría ser atribuida a niveles insuficientes de miR-144, sin capacidad para ejercer su función reguladora sobre la expresión del gen *TLR2* [131].

8 CONCLUSIONES

Este estudio permite concluir que la concentración hepática de ABCA1, proteína importante en el eflujo de colesterol, se encuentra en un bajo nivel en los sujetos con esteatohepatitis. Esta disminución puede ser explicada en parte, por el aumento en los niveles de miR-33a y miR-144, lo cual podría contribuir a la patogénesis de la esteatohepatitis a través de la reducción del eflujo del colesterol. Éste es el primer estudio que demuestra que los niveles hepáticos de miR-33a y miR-144 están incrementados en sujetos con esteatohepatitis. Además, la variación del nivel de estos microRNAs podría alterar otras rutas metabólicas, indispensables para mantener la homeostasis de los lípidos hepáticos, como es el catabolismo de los ácidos grasos a través de la inhibición de la proteína CROT. En conjunto, estos hallazgos contribuyen al entendimiento de la patogénesis de la esteatohepatitis no alcohólica en sujetos con obesidad.

9 PERSPECTIVAS

- Debido a que la participación de ABCA1, en el desarrollo de la fisiopatología de la esteatohepatitis, podría ser independiente del nivel de colesterol libre, será importante evaluar su participación en la respuesta inflamatoria, independiente del transporte de lípidos. Por ejemplo, a través de la activación de la ruta JAK2/STAT3.
- El estudio aporta evidencia de que la concentración de la proteína ABCG1 está reducida en sujetos con esteatohepatitis, pero no los niveles del mRNA. Por lo tanto, será importante evaluar otros microRNAs, que regulen las concentraciones de la proteína ABCG1 en este estadio de la enfermedad.
- Es de gran interés estudiar la asociación de ABCA1 y ABCG1 con fibrosis, y determinar, además de miR-33a, otros factores involucrados en su regulación. Por lo tanto, se requerirán estudios tanto en células estelares hepáticas como *in-situ* para definir su participación en la fibrosis hepática en humanos.
- Debido a que la asociación de miR-33a con fibrosis sólo presentó una tendencia, en un grupo reducido de sujetos, será necesario confirmar esta asociación en un estudio con mayor número de individuos.
- Es de gran interés definir si la modulación terapéutica de estos microRNAs puede ser útil para el tratamiento del HGNA.

10 REFERENCIAS

1. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012; 55:2005–2023.
2. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* 2010; 5:145–171.
3. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005; 41:1313–1321.
4. Martín-Domínguez V, González-Casas R, Mendoza-Jiménez-Ridruejo J, García-Buey L, Moreno-Otero R. Pathogenesis, diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Rev. Esp. Enfermedades Dig. Organo Of. Soc. Esp. Patol. Dig.* 2013; 105:409–420.
5. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence and Outcomes. *Hepatology*. 2015; doi:10.1002/hep.28431
6. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatology*. 2013; 10:686–690.
7. Katrina Loomis A, Kabadi S, Preiss D, Hyde C, Bonato V, Louis MS, et al. Body mass index and risk of non-alcoholic fatty liver disease: Two electronic health record prospective studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015; :jc20153444.doi:10.1210/jc.2015-3444
8. Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatology*. 2002; 17 Suppl:S186–190.
9. Abd El-Kader SM, El-Den Ashmawy EMS. Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World J. Hepatology*. 2015; 7:846–858.
10. Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology*. 1990; 12:1106–1110.
11. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology*. 2011; 141:1249–1253.

12. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology*. 2015; 148:547–555.
13. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004; 40:1387–1395.
14. Levene AP, Goldin RD. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology*. 2012; 61:141–152.
15. McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Liver Dis*. 2004; 8:521–533, viii.
16. Mishra A, Younossi ZM. Epidemiology and Natural History of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Exp. Hepatol*. 2012; 2:135–144.
17. Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010; 51:1961–1971.
18. Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2003; 37:909–916.
19. Johnson NA, Keating SE, George J. Exercise and the liver: implications for therapy in fatty liver disorders. *Semin. Liver Dis*. 2012; 32:65–79.
20. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet*. 2008; 40:1461–1465.
21. Yuan X, Waterworth D, Perry JRB, Lim N, Song K, Chambers JC, et al. Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes. *Am. J. Hum. Genet*. 2008; 83:520–528.
22. León-Mimila P, Vega-Badillo J, Gutiérrez-Vidal R, Villamil-Ramírez H, Villareal-Molina T, Larrieta-Carrasco E, et al. A genetic risk score is associated with hepatic triglyceride content and non-alcoholic steatohepatitis in Mexicans with morbid obesity. *Exp. Mol. Pathol*. 2015; 98:178–183.
23. Ioannou GN, Morrow OB, Connole ML, Lee SP. Association between dietary nutrient composition and the incidence of cirrhosis or liver cancer in the united states population. *Hepatology*. 2009; 50:175–184.
24. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology*. 1998; 114:842–845.

25. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. Baltimore, Md. 2010; 52:774–788.
26. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 2004; 114:147–152.
27. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. Baltimore, Md. 2007; 45:1366–1374.
28. Wouters K, van Bilsen M, van Gorp PJ, Bieghs V, Lütjohann D, Kerksiek A, et al. Intrahepatic cholesterol influences progression, inhibition and reversal of non-alcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice. *FEBS Lett.* 2010; 584:1001–1005.
29. Wouters K, van Gorp PJ, Bieghs V, Gijbels MJ, Duimel H, Lütjohann D, et al. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. Baltimore, Md. 2008; 48:474–486.
30. Peretti N, Sassolas A, Roy CC, Deslandres C, Charcosset M, Castagnetti J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of chylomicron retention disease based on a review of the literature and the experience of two centers. *Orphanet J. Rare Dis.* 2010; 5:24.
31. Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, Fernández-Checa JC, Caballería J, García-Ruiz C. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J. Hepatology*. 2009; 50:789–796.
32. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. Baltimore, Md. 2007; 46:1081–1090.
33. Montero J, Mari M, Colell A, Morales A, Basañez G, Garcia-Ruiz C, et al. Cholesterol and peroxidized cardiolipin in mitochondrial membrane properties, permeabilization and cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1797:1217–1224.
34. Garcia-Ruiz C, Mari M, Colell A, Morales A, Caballero F, Montero J, et al. Mitochondrial cholesterol in health and disease. *Histol. Histopathol.* 2009; 24:117–132.
35. Yeagle PL. Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie.* 1991; 73:1303–1310.
36. Marí M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab.* 2006; 4:185–198.

37. Fu S, Watkins SM, Hotamisligil GS. The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metab.* 2012; 15:623–634.
38. Hager L, Li L, Pun H, Liu L, Hossain MA, Maguire GF, et al. Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency protects against cholesterol-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in mice. *J. Biol. Chem.* 2012; 287:20755–20768.
39. Li L, Hossain MA, Sadat S, Hager L, Liu L, Tam L, et al. Lecithin cholesterol acyltransferase null mice are protected from diet-induced obesity and insulin resistance in a gender-specific manner through multiple pathways. *J. Biol. Chem.* 2011; 286:17809–17820.
40. Gentile CL, Frye M, Pagliassotti MJ. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Antioxid. Redox Signal.* 2011; 15:505–521.
41. Fu S, Yang L, Li P, Hofmann O, Dicker L, Hide W, et al. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature.* 2011; 473:528–531.
42. Park SW, Zhou Y, Lee J, Lee J, Ozcan U. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010; 107:19320–19325.
43. Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog. Lipid Res.* 2013; 52:175–191.
44. Leroux A, Ferrere G, Godie V, Cailleux F, Renoud M-L, Gaudin F, et al. Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *J. Hepatol.* 2012; 57:141–149.
45. Bieghs V, van Gorp PJ, Walenbergh SMA, Gijbels MJ, Verheyen F, Buurman WA, et al. Specific immunization strategies against oxidized low-density lipoprotein: a novel way to reduce nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatol. Baltim. Md.* 2012; 56:894–903.
46. Hendriks T, Bieghs V, Walenbergh SMA, van Gorp PJ, Verheyen F, Jeurissen MLJ, et al. Macrophage specific caspase-1/11 deficiency protects against cholesterol crystallization and hepatic inflammation in hyperlipidemic mice. *PLoS One.* 2013; 8:e78792.
47. Fujii H, Kawada N. Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis. *J. Gastroenterol.* 2012; 47:215–225.
48. Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Oshikawa T, Yokoyama H, Shimamura K, et al. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2012; 142:152–164.e10.

49. Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Narimatsu K, et al. Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology*. Baltimore, Md. 2014; 59:154–169.
50. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010; 464:1357–1361.
51. Rajamäki K, Lappalainen J, Oörni K, Välimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PloS One*. 2010; 5:e11765.
52. Ioannou GN. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends Endocrinol. Metab.* 2016; 27:84–95.
53. Arguello G, Balboa E, Arrese M, Zanlungo S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015; 1852:1765–1778.
54. Ioannou GN, Haigh WG, Thorning D, Savard C. Hepatic cholesterol crystals and crown-like structures distinguish NASH from simple steatosis. *J. Lipid Res.* 2013; 54:1326–1334.
55. Ioannou GN, Van Rooyen DM, Savard C, Haigh WG, Yeh MM, Teoh NC, et al. Cholesterol-lowering drugs cause dissolution of cholesterol crystals and disperse Kupffer cell crown-like structures during resolution of NASH. *J. Lipid Res.* 2015; 56:277–285.
56. Fitzgerald ML, Mendez AJ, Moore KJ, Andersson LP, Panjeton HA, Freeman MW. ATP-binding cassette transporter A1 contains an NH₂-terminal signal anchor sequence that translocates the protein's first hydrophilic domain to the exoplasmic space. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:15137–15145.
57. Van Rooyen DM, Farrell GC. SREBP-2: a link between insulin resistance, hepatic cholesterol, and inflammation in NASH. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2011; 26:789–792.
58. Van Rooyen DM, Larter CZ, Haigh WG, Yeh MM, Ioannou G, Kuver R, et al. Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2011; 141:1393–1403, 1403.e1–5.
59. Min H-K, Kapoor A, Fuchs M, Mirshahi F, Zhou H, Maher J, et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* 2012; 15:665–674.
60. Gelissen IC, Harris M, Rye K-A, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, et al. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26:534–540.

61. Bungert S, Molday LL, Molday RS. Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:23539–23546.
62. Oram JF. HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23:720–727.
63. Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature.* 2005; 438:612–621.
64. Zannis VI, Fotakis P, Koukos G, Kardassis D, Ehnholm C, Jauhiainen M, et al. HDL biogenesis, remodeling, and catabolism. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2015; 224:53–111.
65. Wang S, Smith JD. ABCA1 and nascent HDL biogenesis. *BioFactors Oxf. Engl.* 2014; 40:547–554.
66. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldán A, Tarr P, Fishbein MC, et al. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 2005; 1:121–131.
67. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004; 101:9774–9779.
68. Nakamura K, Kennedy MA, Baldán A, Bojanic DD, Lyons K, Edwards PA. Expression and regulation of multiple murine ATP-binding cassette transporter G1 mRNAs/isoforms that stimulate cellular cholesterol efflux to high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:45980–45989.
69. Vaughan AM, Oram JF. ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:30150–30157.
70. Joyce C, Freeman L, Brewer HB, Santamarina-Fojo S. Study of ABCA1 function in transgenic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23:965–971.
71. Sung KC, Ryan MC, Kim BS, Cho YK, Kim BI, Reaven GM. Relationships between estimates of adiposity, insulin resistance, and nonalcoholic fatty liver disease in a large group of nondiabetic Korean adults. *Diabetes Care.* 2007; 30:2113–2118.
72. Liu W, Qin L, Yu H, Lv F, Wang Y. ApoA-I and ABCA1 expression alleviates lipid accumulation in hepatocytes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2013; doi:10.1111/jgh.12430
73. Yang Y, Jiang Y, Wang Y, An W. Suppression of ABCA1 by unsaturated fatty acids leads to lipid accumulation in HepG2 cells. *Biochimie.* 2010; 92:958–963.
74. Terasaka N, Wang N, Yvan-Charvet L, Tall AR. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting

efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007; 104:15093–15098.

75. Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*. 2010; 328:1570–1573.

76. Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, McDaniel AL, Marshall SM, van Gils JM, et al. Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature*. 2011; 478:404–407.

77. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136:215–233.

78. Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science*. 2005; 309:1519–1524.

79. Ambros V. MicroRNAs and developmental timing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2011; 21:511–517.

80. Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science*. 2010; 328:1566–1569.

81. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 2008; 9:102–114.

82. Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 2011; 121:2921–2931.

83. Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K, et al. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010; 107:17321–17326.

84. Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldán A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010; 107:12228–12232.

85. Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012; 13:239–250.

86. de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Kim T, Civelek M, Baldán Á, Esau C, et al. MicroRNA-144 regulates hepatic ATP binding cassette transporter A1 and plasma high-density lipoprotein after activation of the nuclear receptor farnesoid X receptor. *Circ. Res.* 2013; 112:1602–1612.

87. Ramírez CM, Rotllan N, Vlassov AV, Dávalos A, Li M, Goedeke L, et al. Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144. *Circ. Res.* 2013; 112:1592–1601.
88. Dávalos A, Goedeke L, Smibert P, Ramírez CM, Warriar NP, Andreo U, et al. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011; 108:9232–9237.
89. Gerin I, Clerbaux L-A, Haumont O, Lanthier N, Das AK, Burant CF, et al. Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. *J. Biol. Chem.* 2010; 285:33652–33661.
90. Li D, Wang X, Lan X, Li Y, Liu L, Yi J, et al. Down-regulation of miR-144 elicits proinflammatory cytokine production by targeting toll-like receptor 2 in nonalcoholic steatohepatitis of high-fat-diet-induced metabolic syndrome E3 rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015; 402:1–12.
91. Ferdinandusse S, Mulders J, IJlst L, Denis S, Dacremont G, Waterham HR, et al. Molecular cloning and expression of human carnitine octanoyltransferase: evidence for its role in the peroxisomal beta-oxidation of branched-chain fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 263:213–218.
92. Hunt MC, Alexson SEH. The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* 2002; 41:99–130.
93. Brady PS, Ramsay RR, Brady LJ. Regulation of the long-chain carnitine acyltransferases. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 1993; 7:1039–1044.
94. Eaton S, Bursby T, Middleton B, Pourfarzam M, Mills K, Johnson AW, et al. The mitochondrial trifunctional protein: centre of a beta-oxidation metabolon? *Biochem. Soc. Trans.* 2000; 28:177–182.
95. Maher JJ, Leon P, Ryan JC. Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol. Baltim. Md.* 2008; 48:670–678.
96. Miura K, Seki E, Ohnishi H, Brenner DA. Role of toll-like receptors and their downstream molecules in the development of nonalcoholic Fatty liver disease. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2010; 2010:362847.
97. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin. Immunol.* 2007; 19:24–32.
98. Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatol. Baltim. Md.* 2008; 48:322–335.
99. Miura K, Yang L, van Rooijen N, Brenner DA, Ohnishi H, Seki E. Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice. *Hepatol. Baltim. Md.* 2013; 57:577–589.

100. Rivera CA, Adegboyega P, van Rooijen N, Tagalicud A, Allman M, Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* 2007; 47:571–579.
101. Szabo G, Velayudham A, Romics L, Mandrekar P. Modulation of non-alcoholic steatohepatitis by pattern recognition receptors in mice: the role of toll-like receptors 2 and 4. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2005; 29:140S–145S.
102. Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. *Am. J. Clin. Nutr.* 1992; 55:615S–619S.
103. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign, IL: Human Kinetics Books; 1988.
104. Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Comparan M, Coral-Vazquez R, et al. The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes.* 2007; 56:1881–1887.
105. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985; 28:412–419.
106. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2010; 33 Suppl 1:S62–69.
107. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226:497–509.
108. Mouritzen P, Noerholm M, Nielsen PS, Jacobsen N, Lomholt C, Pfundheller HM, et al. ProbeLibrary: A new method for faster design and execution of quantitative real-time PCR. *Nat. Methods.* 2005; 2:313–316.
109. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang A-G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav. Res. Methods.* 2009; 41:1149–1160.
110. Patel DC, Albrecht C, Pavitt D, Paul V, Pourreyron C, Newman SP, et al. Type 2 diabetes is associated with reduced ATP-binding cassette transporter A1 gene expression, protein and function. *PloS One.* 2011; 6:e22142.
111. Ozasa H, Ayaori M, Iizuka M, Terao Y, Uto-Kondo H, Yakushiji E, et al. Pioglitazone enhances cholesterol efflux from macrophages by increasing ABCA1/ABCG1 expressions via PPAR γ /LXR α pathway: findings from in vitro and ex vivo studies. *Atherosclerosis.* 2011; 219:141–150.

112. Chen Y, Chen Y, Zhao L, Chen Y, Mei M, Li Q, et al. Inflammatory stress exacerbates hepatic cholesterol accumulation via disrupting cellular cholesterol export. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 27:974–984.
113. Marí M, Colell A, Morales A, Caballero F, Moles A, Fernández A, et al. Mechanism of mitochondrial glutathione-dependent hepatocellular susceptibility to TNF despite NF- κ B activation. *Gastroenterology.* 2008; 134:1507–1520.
114. Yao PM, Tabas I. Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:42468–42476.
115. Ahn SB, Jang K, Jun DW, Lee BH, Shin KJ. Expression of liver X receptor correlates with intrahepatic inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig. Dis. Sci.* 2014; 59:2975–2982.
116. Tran A, Gual P. Non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 2013; 37:17–29.
117. Basso F, Freeman L, Knapper CL, Remaley A, Stonik J, Neufeld EB, et al. Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J. Lipid Res.* 2003; 44:296–302.
118. Hsieh V, Kim M-J, Gelissen IC, Brown AJ, Sandoval C, Hallab JC, et al. Cellular cholesterol regulates ubiquitination and degradation of the cholesterol export proteins ABCA1 and ABCG1. *J. Biol. Chem.* 2014; 289:7524–7536.
119. Tang C, Liu Y, Kessler PS, Vaughan AM, Oram JF. The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor. *J. Biol. Chem.* 2009; 284:32336–32343.
120. Matsuura F, Oku H, Koseki M, Sandoval JC, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, et al. Adiponectin accelerates reverse cholesterol transport by increasing high density lipoprotein assembly in the liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 358:1091–1095.
121. Li Y, Qin G, Liu J, Mao L, Zhang Z, Shang J. Adipose tissue regulates hepatic cholesterol metabolism via adiponectin. *Life Sci.* 2014; 118:27–33.
122. Oku H, Matsuura F, Koseki M, Sandoval JC, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, et al. Adiponectin deficiency suppresses ABCA1 expression and ApoA-I synthesis in the liver. *FEBS Lett.* 2007; 581:5029–5033.
123. Rottiers V, Obad S, Petri A, McGarrah R, Lindholm MW, Black JC, et al. Pharmacological inhibition of a microRNA family in nonhuman primates by a seed-targeting 8-mer antimiR. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5:212ra162.

124. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, et al. MicroRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo. *Sci. Rep.* 2014; 4:5312.
125. Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell.* 2005; 122:553–563.
126. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA N. Y. N.* 2005; 11:1753–1761.
127. Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2007; 2007:re1.
128. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 2010; 466:835–840.
129. Hu Y-W, Hu Y-R, Zhao J-Y, Li S-F, Ma X, Wu S-G, et al. An agomir of miR-144-3p accelerates plaque formation through impairing reverse cholesterol transport and promoting pro-inflammatory cytokine production. *PloS One.* 2014; 9:e94997.
130. Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.* 2010; 11:R90.
131. Brown BD, Gentner B, Cantore A, Colleoni S, Amendola M, Zingale A, et al. Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25:1457–1467.

11 ANEXOS

Anexo 1. Parámetros antropométricos y bioquímicos estratificados por sexo.

Características	Control (n=10)		Esteatosis simple (n=17)		EHNA-L (n=19)		EHNA (n=38)		Valor <i>P</i> (todos)	Valor <i>P</i> (mujeres)
	Mujeres (n=8)	Hombres (n=2)	Mujeres (n=11)	Hombres (n=6)	Mujeres (n=14)	Hombres (n=5)	Mujeres (n=21)	Hombres (n=17)		
Edad (años)	33.75 ± 8.28	46.5 ± 2.12	37.09 ± 7.61	34.67 ± 8.24	39.21 ± 10.74	39.8 ± 7.05	34.71 ± 9.66	37.47 ± 8.27	n.s	n.s
IMC (kg/m ²)	46.32 ± 5.08	42.17 ± 7.02	42.14 ± 3.93	45.52 ± 5.45	43.57 ± 5.54	44.41 ± 4.87	45 ± 6.75	45.19 ± 6.67	n.s	n.s
Glucosa (mg/dL)	95.9 (90.5-105.5)	96.5 (86-107)	118 (94-119)	105.5 (92-132)	98.5 (93-118)	107 (99-117)	122 (100-133)	106 (92-132)	<0.05 [§]	<0.05 [§]
Insulina (μIU/mL)	11 (5.7-14.9)	9.5 (3.9-15.1)	10.8 (4.6-23.1)	13.55 (9.6-16.8)	10.2 (8.7-18.9)	24.65 (16.6-31.95)	10.25 (8.4-29.15)	22.85 (14.65-43.95)	n.s	n.s
HOMA-IR	2.76 (1.82-3.44)	2.12 (1.03-3.21)	4.45 (1.74-8.17)	3.3 (3.12-3.82)	2.53 (2.16-5.11)	6.82 (4.3-9.38)	2.69 (2.2-8.46)	6.39 (4.06-16.21)	<0.01 [§]	n.s
DT2 (%)	1(12.5)	1(50)	2(18.2)	2(33.3)	6(42.9)	0(0)	14(66.7)	6(35.3)	<0.05 [§]	<0.05 [§]
AST (IU/mL)	25 (21-42.5)	46.5 (38-55)	45 (21-94)	51 (39-79)	28 (23-53)	39 (21-43)	56.5 (26-87.5)	46 (24-69)	n.s	n.s
ALT (IU/mL)	23.5 (20-58.5)	45.5 (34-57)	20 (19-40)	41 (33-91)	23.5 (17-58)	30 (18-47)	39.5 (26-50.5)	44 (21-50)	n.s	n.s
GGT (IU/mL)	15 (10.5-34.5)	33 (18-48)	16 (12-41)	22 (15-36)	14 (12-21)	25 (16-36)	19.5 (14-29)	29 (17-45)	n.s	n.s
Adiponectina (μg/mL)	8.34 ± 2.1	5.46 ± 2.69	7.16 ± 3	6.88 ± 1.96	7.94 ± 2.34	6.24 ± 1.58	6.85 ± 1.78	4.71 ± 1.51	<0.05 [§]	n.s
Leptina (ng/mL)	38.64 ± 20.53	12.29 ± 7.87	32.74 ± 15.85	22.67 ± 10.5	53.13 ± 39.38	15.54 ± 7.87	51.36 ± 32.91	41.83 ± 19.71	n.s	n.s
Triglicéridos (mg/dL)	90.97 (70-102.5)	115.93 (58-173.85)	155 (128-241)	116.95 (91-139)	145.55 (90-178)	143.13 (118-174)	140 (124-185)	184 (135-273)	<0.01 ^{*†§}	<0.01 ^{*†§}
Colesterol total (mg/dL)	162.01 ± 30.65	220 ± 11.31	189.64 ± 43.66	150.33 ± 41.63	162.71 ± 36.9	189.2 ± 27.4	160.43 ± 31.37	167.82 ± 32.87	n.s	n.s
HDL-C (mg/dL)	40.68 ± 9.45	45 ± 26.87	32.36 ± 12.89	26.33 ± 3.67	32.36 ± 9.17	32.8 ± 12.62	29.93 ± 7.85	27.19 ± 5.77	<0.05 ^{*†§}	<0.05 [§]
LDL-C (mg/dL)	105.63 ± 27.85	128 ± 33.94	125.45 ± 37.29	86.17 ± 19.1	97.36 ± 23.83	114.4 ± 32.02	95.65 ± 26.75	92.76 ± 34.23	n.s	n.s

Los datos son mostrados como la media ± la desviación estándar, mediana (rango intercuartil) o n (%)

Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; HOMA-IR, Homeostatic model assessment for insulin resistance (por sus siglas en inglés); DT2, diabetes tipo II; AST, aspartato amino-transferasa (aspartate transaminase, por sus siglas en inglés); ALT, alanino amino-transferasa (alanine transaminase, por su siglas en inglés); GGT, gama gutamil transpeptidasa (gamma glutamyl transpeptidase, por sus siglas en inglés); HDL-C, colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (high-density lipoprotein cholesterol, por sus siglas en inglés); LDL, lipoproteínas de baja densidad (low-density lipoprotein, por sus siglas en inglés); ES, esteatosis simple; EHNA-L, EHNA-limitrofe; EHNA, esteatohepatitis no alcohólica. Valor **P* corresponde a las comparaciones entre los controles y el grupo de sujetos con ES; valor [†]*P* corresponde a las comparaciones entre los controles y el grupo EHNA-L; y valor [§]*P* corresponde a las comparaciones entre los controles y el grupo de sujetos con EHNA; n.s, no significativo.

Anexo 2. Relación entre los niveles de proteína de ABCA1/G1 y los parámetros bioquímicos en sujetos no diabéticos.

	ABCA1		ABCG1	
	Coeficiente de correlación	Valor de P	Coeficiente de correlación	Valor de P
IMC (kg/m ²)	-0.062	0.666	0.114	0.426
Glucosa (mg/dL)‡	-0.063	0.667	0.125	0.390
INSULINA (µIU/mL) ‡	-0.226	0.135	0.007	0.961
HOMA-IR‡	-0.223	0.156	0.085	0.593
AST (IU/mL)	-0.088	0.538	-0.088	0.537
ALT (IU/mL)	-0.129	0.367	-0.164	0.249
GGT (IU/mL)	0.113	0.430	-0.056	0.697
Adiponectina (µg/mL)	0.213	0.159	0.067	0.662
Leptina (ng/mL)	-0.134	0.381	0.025	0.871
Triglicéridos (mg/dL)	0.136	0.336	0.092	0.515
Colesterol (mg/dL)	0.287	0.039	0.177	0.210
HDL-C (mg/dL)	0.127	0.369	0.183	0.195
LDL-C (mg/dL)	0.282	0.045	0.272	0.053
Contenido TGH (mg/mg Proteína)	0.039	0.785	-0.004	0.978
Contenido CTH (mg/mg Proteína)	0.212	0.136	0.164	0.250
Contenido CLH (mg/mg Proteína)	0.222	0.117	0.115	0.423
Contenido FH (mg/mg Proteína)	0.179	0.208	0.009	0.950

Las correlaciones fueron realizadas mediante pruebas Spearman (n=52). Las asociaciones significativamente asociadas en la población completa están marcadas en negro.

ORIGINAL ARTICLE

Hepatic miR-33a/miR-144 and their target gene *ABCA1* are associated with steatohepatitis in morbidly obese subjects

Joel Vega-Badillo^{1,2}, Roxana Gutiérrez-Vidal^{1,2}, Hugo A. Hernández-Pérez², Hugo Villamil-Ramírez², Paola León-Mimila^{1,2}, Fausto Sánchez-Muñoz³, Sofía Morán-Ramos², Elena Larrieta-Carrasco⁴, Itzel Fernández-Silva⁵, Nahúm Méndez-Sánchez⁶, Armando R. Tovar⁷, Francisco Campos-Pérez⁵, Teresa Villarreal-Molina⁸, Rogelio Hernández-Pando⁹, Carlos A. Aguilar-Salinas¹⁰ and Samuel Canizales-Quinteros²

1 Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

2 Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud, Facultad de Química, UNAM/Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Mexico City, Mexico

3 Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (INCICh), Mexico City, Mexico

4 Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Mexico City, Mexico

5 Clínica Integral de Cirugía para la Obesidad y Enfermedades Metabólicas, Hospital General "Dr. Rubén Leñero", Mexico City, Mexico

6 Unidad de Investigación del Hígado, Fundación Clínica Médica Sur, Mexico City, Mexico

7 Departamento Fisiología de la Nutrición, INCMNSZ, Mexico City, Mexico

8 Laboratorio de Enfermedades Cardiovasculares, INMEGEN, Mexico City, Mexico

9 Departamento de Patología, INCMNSZ, Mexico City, Mexico

10 Departamento de Endocrinología y Metabolismo, INCMNSZ, Mexico City, Mexico

DOI: 10.1111/liv.13109

Abstract

Background and Aim: Abnormal cholesterol metabolism may contribute to the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and fibrosis. miR-33 and miR-144 regulate adenosine triphosphate binding cassette transporter (*ABCA1*) and other target genes involved in cholesterol efflux, fatty acid oxidation and inflammation. We explored relationships between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and the hepatic expression of *ABCA1/ABCG1*, as well as other target genes regulated by miR-33 (carnitine O-octanoyltransferase, *CROT* and hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase β -subunit, *HADHB*) and miR-144 (toll-like receptor-2, *TLR2*). Moreover, we evaluated whether the expression of these genes is correlated with miR-33a/b and miR-144 expression in Mexican individuals with morbid obesity. **Methods:** Eighty-four morbidly obese subjects undergoing bariatric surgery were included in this study. Liver biopsies were obtained to measure hepatic triglyceride and free

Abbreviations

ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; *ABCG1*, ATP-binding cassette transporter G1; ALT, alanine aminotransferase; anti-HCV, hepatitis C antibody; apo-A1, apolipoprotein A1; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; B-NASH, borderline NASH; CNTL, Control; *CROT*, carnitine O-octanoyltransferase; ER, endoplasmic reticulum; GGT, gamma glutamyl transpeptidase; *HADHB*, hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase β -subunit; HBSAg, hepatitis B surface antigen; HDL, high density lipoprotein; HFC, hepatic free cholesterol; HMGR, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase; HOMA-IR, homeostatic model assessment for insulin resistance; HPL, hepatic phospholipid; HTC, hepatic total cholesterol; HTG, hepatic triglyceride; LDL, low-density lipoprotein; LDLR, low density lipoprotein receptor; LRP, LDL receptor-related protein; miR, microRNA; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; NAS, NAFLD activity score; RIPA, radio-immunoprecipitation assay; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; SDS-PAGE, SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis; SS, simple steatosis; T2D, type 2 diabetes; *TLR2*, toll-like receptor-2; UTR, untranslated region; WHO, world health organization; α -TUB, α -tubulin; β -ACT, β -actin.

Correspondence

Samuel Canizales-Quinteros PhD

Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud, Facultad de Química, UNAM / Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico.

Periférico Sur No. 4809, Colonia Arenal Tepepan, Tlalpan 14610. México, D.F.

Tel: +52 55 53501900 Ext. 1186; Fax: +52 55 53501999

e-mail: cani@unam.mx

Handling Editor: Helena Cortez-Pinto

Received 27 March 2015; Accepted 26 February 2016

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.13109/supinfo

cholesterol contents, as well as ABCA1, ABCG1, CROT, HADHB, TLR2, miR-33a/b and miR-144 expression. **Results:** Hepatic free cholesterol content was significantly increased in NASH as compared to non-NASH subjects, while ABCA1 and ABCG1 protein levels significantly decreased with NASH and fibrosis progression. The relative expression of miR-33a and miR-144 correlated inversely with ABCA1 but not with ABCG1 protein levels. Moreover, both miRNAs increased significantly in NASH individuals. miR-33 target genes *CROT* and *HADHB* correlated inversely with miR-33a. However, the expression of these genes was not associated with NASH. **Conclusions:** miR-33a/144 and their target gene *ABCA1* may contribute to the pathogenesis of NASH in morbidly obese subjects.

Keywords

ABCA1 – ABCG1 – miR-144 – miR-33a/b – NASH

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a common cause of chronic liver disease with a high incidence in Hispanic populations (1). The clinical-histological spectrum of NAFLD extends from simple steatosis (SS) to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) (2). NASH is distinguished from SS by the presence of cytologic ballooning and lobular inflammation, with a greater risk of complications such as cirrhosis, liver failure and hepatocellular carcinoma (3). NAFLD has been associated with increased hepatic triglycerides (TG), however, several lipidomic NAFLD analyses have demonstrated hepatic accumulation of free cholesterol (FC) in NASH (4, 5). Efficient lipid transport or delivery seems to be crucial in the transition from steatosis to NASH (6). While the role of adenosine triphosphate binding cassette (ABC) transporters ABCA1 and ABCG1 in reverse cholesterol transport and high density lipoprotein (HDL) particle formation is well known, their role in human NAFLD is not fully understood (7). In this regard, hepatic-specific ABCA1 inactivation in the mouse model caused decreased plasma HDL levels and reduced cholesterol efflux in hepatic cells (8). Moreover, Min *et al.* (9) reported decreased ABCA1 and ABCG1 mRNA levels and decreased ABCG1 but not ABCA1 protein levels in NASH liver biopsies. The discrepancy between ABCA1 mRNA and protein levels could be because of post-transcriptional regulation mechanisms. Recent studies in animal models identified that miR-33 and miR-144 inhibit cellular cholesterol export via ABCA1 and/or ABCG1 (10–12). Two miR-33 isoforms involved in cholesterol and lipid homeostasis have been identified in humans (miR-33a and miR-33b) (11). Besides regulating ABCA1/G1 expression, these miR-33 isoforms

are involved in the regulation of fatty acid oxidation gene expression, including carnitine *O*-octanoyltransferase (*CROT*) and hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase β -subunit (*HADHB*) (11, 13). Moreover, experimental evidence suggests that miR-144 could contribute to the development and progression of NASH by regulating toll-like receptor-2 (*TLR2*) gene expression and thus eliciting proinflammatory cytokine production in rats (14).

As a result of the emerging and poorly understood role of ABCA1 and ABCG1 as modulators of cholesterol efflux in NASH, we explored the relationships between NAFLD and ABCA1/G1 expression, and whether these expression levels are correlated with miR-33 and miR-144 expression. We also explored if other miR-33 and miR-144 target genes involved in fatty acid oxidation (*CROT* and *HADHB*) and hepatic inflammatory pathways (*TLR2*), are associated with NAFLD in Mexican individuals with morbid obesity.

Materials and methods

Subjects

This study included 84 Mexican mestizo subjects aged 20–60 years with morbid obesity who underwent bariatric surgery with a body mass index ≥ 40 kg/m² or >35 kg/m² and significant obesity associated-morbidity (15), recruited from the Hospital General Rubén Leñero in Mexico City. Subjects with positive serology for hepatitis B surface antigen and hepatitis C antibody (anti-HCV) (Johnson-Johnson, BUX, UK), or with alcohol consumption >20 g/day were excluded. All participants provided informed consent. This study complied with the principles of the Declaration of Helsinki, and the INMEGEN Ethics Committee approved the research.

Clinical and biochemical parameters

Anthropometric measurements were determined as described (16). Blood samples were drawn after a 10-h overnight fast for biochemical measurements. Blood glucose, insulin, triglycerides, total and HDL cholesterol (HDL-C), were measured as described (16). Insulin sensitivity was calculated using the homeostatic model

Key points

- Reduced hepatic ABCA1 and ABCG1 protein levels are associated with NASH and fibrosis.
- The involvement of ABCA1 and ABCG1 in NASH pathophysiology seems to be independent of hepatic free cholesterol levels.
- Decreased expression of hepatic miR-33a inversely correlates with ABCA1 and CROT protein levels.
- Increased hepatic miR-33a and miR-144 are associated with NASH.

assessment (HOMA-IR) index (17). Aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase serum concentrations were measured with commercially available methods (Beckman Coulter, CA, USA). Serum adiponectin and leptin levels were determined by ELISA (Linco, MO, USA). Type 2 diabetes (T2D) was defined as either self-reported use of glucose-lowering medication or fasting plasma glucose levels ≥ 126 mg/dL (18).

Liver histology

Liver biopsies were collected in RNAlater (Ambion/Applied Biosystems, CA, USA) during surgery and stored at -80°C . Liver biopsy specimens were fixed in 10% formaldehyde embedded in paraffin, stained with haematoxylin-eosin and Masson's trichrome, and evaluated by an experienced pathologist. Histological characteristics were determined according to the Kleiner scoring system (19) and are detailed in Supplementary Methods.

Gene expression analysis

Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed in a Light Cycler 480 II (Roche, Rotkreuz, Switzerland) using LNA TaqMan probes as detailed in Supplementary Methods. Gene expression was normalized to β -actin. For miRNA analyses, total RNA was used for cDNA synthesis using TaqMan[®] MicroRNA Assays INV (Applied Biosystems) and RT-PCR were performed as detailed in the Supplementary Methods; all results were normalized RNU6B expression.

Protein expression analysis and immunohistochemistry

Total proteins extracted from liver tissue were subjected to SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis electrophoresis as detailed in Supplementary Methods. The following antibodies were used: ABCA1, CROT and HADHB (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), ABCG1 (Thermo Scientific, IL, USA), TLR2 (ABCAM, MA, USA) and α -tubulin (Santa Cruz Biotechnology) or β -actin (GeneTex, CA, USA) as loading controls. ABCA1 was evaluated by immunohistochemistry as detailed in Supplementary Methods.

Measurement of hepatic lipid content

Liver tissue was homogenized and total lipids were extracted according as described (20) and detailed in Supplementary Methods. Data were normalized to total protein concentrations.

Statistical analysis

Differences between groups were analysed using non-parametric tests (Kruskal–Wallis or Mann–Whitney

U-test). Chi-square test was used for nominal categorical variables. Student *t*-test was used to compare normally distributed data between two specific groups. Correlations were obtained using Spearman's test. Generalized linear models were used to determine interactions between miRNAs. *P*-values < 0.05 were considered significant. All statistical analyses were performed using SPSS version 15.0 (Chicago, IL, USA).

Results

Clinical and biochemical characteristics

A total of 84 patients with morbid obesity (54 female and 30 male) were included in this study; 10 had a histologically normal liver and were considered as controls, 74 showed NAFLD: 17 had SS, 19 had "borderline" NASH (B-NASH), and 38 had NASH. The main clinical and biochemical characteristics of all study subjects and stratified by gender are summarized in Tables S1 and S2. Controls had lower serum triglyceride, but higher adiponectin and HDL-C levels than NASH subjects ($P < 0.05$), and the same tendency was observed after stratifying by gender. Accordingly, the frequency of individuals with T2D subjects also increased with NAFLD progression; however, only the difference between the control and NASH groups was statistically significant ($P < 0.05$).

Hepatic lipid content in NAFLD

As expected, HTG content was significantly higher in subjects with SS, B-NASH and NASH as compared to controls ($P = 1.71 \times 10^{-8}$, Table S3). Hepatic total cholesterol (HTC) content was similar across non-NASH subjects (controls, SS and B-NASH, $P = 0.396$), but was significantly higher in NASH individuals ($P = 0.016$). Hepatic free cholesterol (HFC) content was also significantly higher in NASH than in non-NASH subjects ($P = 0.037$), while hepatic phospholipid (HPL) content was similar across the 4 groups ($P = 0.776$).

Association of ABCA1/G1 protein levels with NAFLD

Although ABCA1 and ABCG1 mRNA levels were not significantly different between control and NASH subjects ($P = 0.425$, $P = 0.621$; respectively), ABCA1 mRNA levels were significantly lower in the NASH than in the SS group ($P = 0.030$) (Fig. 1A). In turn, ABCA1 protein levels were highest in controls (0.81 ± 0.48), decreasing in SS (0.46 ± 0.38 , $P = 0.052$), and showing a 2–3 fold-decrease in NASH individuals (0.37 ± 0.30 ; $P = 0.008$). Similarly, ABCG1 protein levels were highest in controls (0.28 ± 0.19), slightly decreasing in SS (0.22 ± 0.18 ; $P = 0.283$), and significantly lower in the NASH group (0.15 ± 0.09 ; $P = 0.048$) (Fig. 1B and C). Immunohistochemistry revealed the presence of ABCA1 protein in the hepatocyte cytoplasm region of control

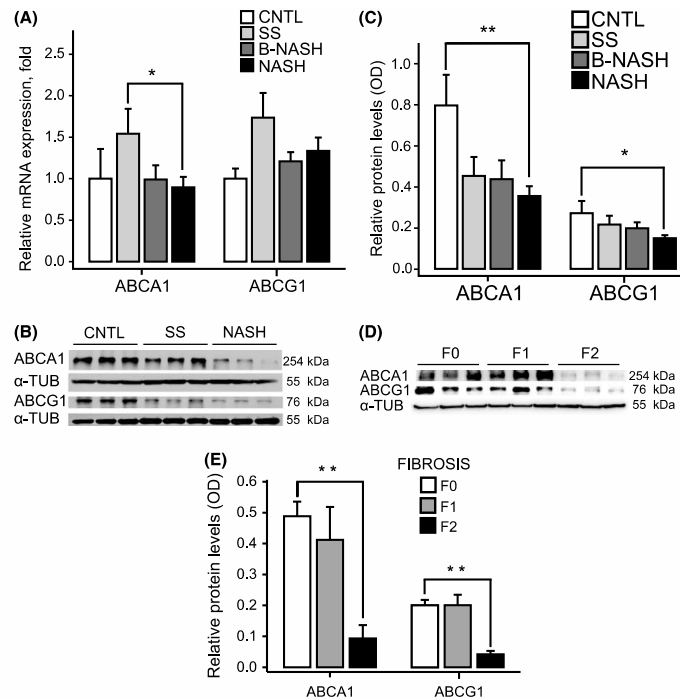


Fig. 1. Reduced ABCA1/G1 protein levels are associated with NASH and fibrosis. (A) ABCA1 and ABCG1 mRNA levels in different NAFLD stages ($n = 10$ controls; $n = 17$ simple steatosis; $n = 19$ B-NASH and $n = 38$ NASH patients). (B) Representative examples of ABCA1/ABCG1 immunoblotting in hepatic tissue of control, Simple Steatosis and NASH individuals. (C) Comparison of ABCA1 and ABCG1 protein levels in control, steatosis, B-NASH and NASH subjects. (D) Representative examples of ABCA1/ABCG1 immunoblotting in hepatic tissue of different grades of fibrosis. (E) Distribution of ABCA1 and ABCG1 protein levels in different grades of fibrosis (F0, $n = 65$; F1, $n = 14$; F2, $n = 5$). ABCA1/G1 mRNA expression normalized to β -actin. ABCA1/G1 protein levels normalized to α -Tubulin. Values represent ABCA1 or ABCG1/ α -Tubulin optical density (OD) ratio. Control (CNTL), Simple Steatosis (SS), Borderline NASH (B-NASH), Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH). Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

biopsies. The intensity of the ABCA1 signal was decreased in NASH biopsies (Fig. S1). In addition, ABCA1/G1 hepatic protein levels were 4-5 fold lower in individuals with moderate fibrosis (F2) than in those without fibrosis ($P = 0.008$ and $P = 0.004$ for ABCA1 and ABCG1 respectively; Fig. 1D and E).

Association of ABCA1/G1 protein levels with biochemical parameters and hepatic lipid content

Table 1 describes correlations between ABCA1/G1 protein levels with biochemical parameters and hepatic lipid content. Positive and statistically significant correlations between hepatic ABCA1 and ABCG1 protein levels were observed for plasma HDL-C ($r = 0.225$, $P = 0.040$; and $r = 0.347$, $P = 0.001$, respectively), total cholesterol ($r = 0.281$, $P = 0.010$; and $r = 0.252$, $P = 0.021$, respectively), and LDL-C levels ($r = 0.309$, $P = 0.004$; and $r = 0.334$, $P = 0.002$, respectively).

Serum adiponectin levels showed a positive correlation with hepatic ABCA1 ($r = 0.231$, $P = 0.043$), but not with ABCG1 protein levels. Regarding hepatic lipid content, ABCA1 hepatic protein levels unexpectedly showed a significant and positive correlation with HFC content ($r = 0.270$; $P = 0.014$) and HPL content ($r = 0.260$, $P = 0.018$). In contrast, ABCG1 hepatic protein levels showed no significant correlation with any type of hepatic lipid content ($P > 0.05$). As T2D and/or hypoglycaemic agents may alter ABCA1 expression (21, 22), a separate analysis was performed excluding T2D subjects ($n = 32$). All correlations observed in the entire study sample showed the same tendency in the non-T2D group (Table S4).

Association of miR-33a and miR-144 with NAFLD

The relative expression of miR-33a was lowest in controls, slightly increased in the SS group, and

Table 1. Relationship between hepatic ABCA1/G1 protein levels and biochemical parameters

	ABCA1		ABCG1	
	Correlation coefficient	P value	Correlation coefficient	P value
BMI (kg/m ²)	-0.007	0.950	0.131	0.237
Fasting glucose (mg/dL)	-0.132	0.240	-0.140	0.212
Fasting insulin (μU/mL)	-0.145	0.207	-0.019	0.870
HOMA-IR	-0.152	0.195	-0.020	0.864
AST (IU/mL)	-0.214	0.052	-0.108	0.333
ALT (IU/mL)	-0.146	0.189	-0.129	0.245
GGT (IU/mL)	0.060	0.590	-0.123	0.266
Adiponectin (μg/mL)	0.231	0.043	0.174	0.130
Leptin (ng/mL)	0.016	0.888	0.061	0.601
Triglycerides (mg/dL)	0.080	0.472	-0.016	0.887
Cholesterol (mg/dL)	0.281	0.010	0.252	0.021
HDL-C (mg/dL)	0.225	0.040	0.347	0.001
LDL-C (mg/dL)	0.309	0.004	0.334	0.002
HTG content (mg/mg Protein)	-0.075	0.505	-0.140	0.211
HTC content (mg/mg Protein)	0.203	0.067	0.047	0.674
HFC content (mg/mg Protein)	0.270	0.014	0.040	0.718
HPL content (mg/mg Protein)	0.260	0.018	0.047	0.676

Correlations were obtained by performing a Spearman's test.

increased significantly in NASH individuals ($P = 0.006$) Fig. 2; this difference remained significant after adjusting for ABCA1 protein levels ($P = 0.018$). In addition, relative miR-144 expression was similar in controls and SS individuals, but significantly higher in NASH individuals ($P = 0.024$). However, the difference reached only borderline significance after adjusting for ABCA1 protein levels ($P = 0.081$). miR-33b expression showed no significant differences among groups ($P > 0.05$).

Correlation of miR-33a/miR-144 with ABCA1/G1 expression in liver

We then tested whether miR33a, miR33b and miR144 are correlated with hepatic ABCA1/G1 mRNA and/or protein levels (Table 2). The relative expression of miR-33a inversely correlated with ABCA1 mRNA ($r = -0.221$, $P = 0.050$) and protein levels ($r = -0.305$, $P = 0.006$). However, miR-33a was not significantly associated with ABCG1 mRNA or protein levels. On the other hand, miR-33b correlated inversely with both ABCA1 and ABCG1 mRNA levels ($r = -0.436$, $P = 5.9 \times 10^{-4}$; and $r = -0.334$, $P = 0.003$; respectively); but not with ABCA1 or ABCG1 protein levels ($P > 0.5$).

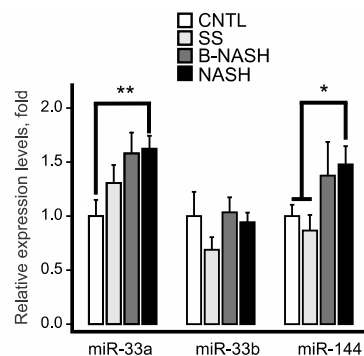


Fig. 2. miR-33a and miR-144 levels are increased in NASH patients. Relative expression levels of miR-33a/b and miR-144 were measured in hepatic tissue of morbidly obese subjects by miRNA TaqMan RT-PCR of control ($n = 10$), Simple Steatosis ($n = 17$), B-NASH ($n = 19$) and NASH subjects ($n = 38$). The relative abundance of miRNAs was calculated after normalization to small nuclear RNA U6 (RNU6B). Control (CNTL), Simple Steatosis (SS), Borderline NASH (B-NASH), Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH). All samples were analysed in triplicate. Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

Likewise, miR-144 relative expression showed an inverse relationship with ABCA1 mRNA and protein expression levels ($r = -0.142$, $P = 0.212$; and $r = -0.229$, $P = 0.043$; respectively), but not with ABCG1 expression ($P > 0.2$). Interestingly, plasma HDL-C levels showed an inverse correlation with miR-33a ($r = -0.313$, $P = 0.004$) and miR-144 ($r = -0.221$, $P = 0.043$), but not with miR-33b expression levels ($P = 0.870$).

Association of CROT and HADHB expression with NAFLD, and correlation with miR-33a

Because miR-33a expression remained significantly associated with NAFLD after adjusting for ABCA1 protein levels, we explored the association of other miR-33a target genes with NAFLD. *CROT* and *HADHB* expression were analysed in all hepatic biopsies with sufficient amount of tissue for analyses ($n = 66$). *CROT* and *HADHB* mRNA levels were both decreased in NAFLD subjects; however, only *HADHB* mRNA levels were significantly lower in the SS than in the control group ($P = 0.017$; Fig. 3A). While *HADHB* protein levels were similar across study groups, *CROT* protein levels were lower in SS as compared to controls, although the difference was not statistically significant ($P = 0.072$; Fig. 3B and C). Moreover, the miR-33a relative expression inversely correlated with *CROT* mRNA ($r = -0.185$, $P = 0.140$) and protein levels ($r = -0.271$, $P = 0.028$), and with *HADHB* mRNA ($r = -0.238$, $P = 0.056$) and protein levels ($r = -0.184$, $P = 0.139$; Table 3).

Table 2. Correlation between hepatic miRNAs levels and ABCA1/G1 expression

	miR-33a		miR-33b		miR-144	
	Correlation coefficient	P value	Correlation coefficient	P value	Correlation coefficient	P value
ABCA1 mRNA	-0.221	0.050	-0.436	5.9×10^{-4}	-0.142	0.212
ABCA1 Protein	-0.305	0.006	0.070	0.538	-0.229	0.043
ABCG1 mRNA	-0.143	0.209	-0.334	0.003	0.041	0.720
ABCG1 Protein	-0.181	0.110	0.015	0.894	-0.131	0.251

Correlations were obtained by performing a Spearman's test.

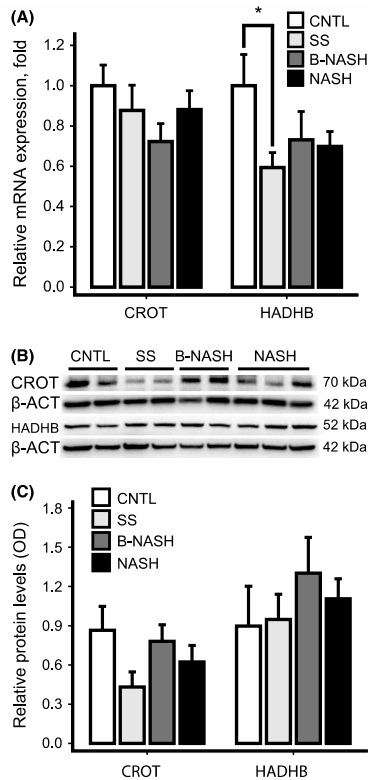


Fig. 3. Relationship of CROT and HADHB expression levels with NAFLD. (A) CROT and HADHB mRNA levels in different NAFLD stages ($n = 9$ controls; $n = 14$ simple steatosis; $n = 14$ B-NASH, and $n = 29$ NASH patients). (B) Representative examples of CROT/HADHB immunoblotting in hepatic tissue of control, Simple Steatosis, B-NASH and NASH individuals. (C) Comparison of CROT and HADHB protein levels in control, Simple Steatosis, B-NASH and NASH subjects. CROT/HADHB mRNA expression normalized to β -actin. CROT/HADHB protein levels normalized to β -actin. CROT or HADHB/ β -actin optical density (OD) ratio. Control (CNTL), Simple Steatosis (SS), Borderline NASH (B-NASH), Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH). Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

Table 3. Correlation of hepatic miR-33a levels with CROT and HADHB expression

	miR-33a	
	Correlation coefficient	P value
CROT mRNA	-0.185	0.140
CROT Protein	-0.271	0.028
HADHB mRNA	-0.238	0.056
HADHB Protein	-0.184	0.139

Correlations were obtained by performing a Spearman's test, ($n = 66$).

Association of TLR2 expression with NAFLD, and correlation with miR-144

As the association of miR-144 expression with NAFLD after adjusting for ABCA1 protein levels showed borderline significance, we explored the association of TLR2, a possible target gene miR-144 with NAFLD. TLR2 mRNA levels did not differ among study groups ($P = 0.880$). Moreover, while TLR2 protein levels gradually increased with NAFLD severity, differences were not statistically significant ($P = 0.170$, Fig. 4A–C). Although the human *TLR2* gene is predicted to contain a miR-144 binding site, miR-144 levels did not significantly correlate with TLR2 mRNA or protein levels (Table 4).

Discussion

Although NAFLD is typically characterized by hepatic triglyceride accumulation, cholesterol homeostasis has been implicated in more advanced NAFLD stages (NASH and fibrosis) (4, 5, 9, 23). Cholesterol efflux plays a critical role, not only in lipid metabolism and normal liver physiology, but also in several pathological processes including NAFLD (24, 25). In this study, we analysed the relationships between the hepatic expression of ABCA1/G1 transporters, miR-33 and miR-144 with NAFLD in morbidly obese Mexican individuals.

ABCA1 protein levels were significantly decreased in NASH subjects. There are relatively few studies analysing ABCA1 expression in NAFLD, with inconsistent results. Our results are in agreement with observations in the murine model, where steatosis was associated with decreased ABCA1 protein expression and increased

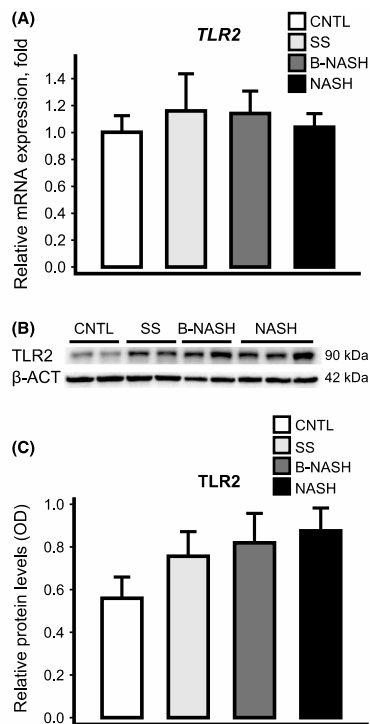


Fig. 4. Relationship of TLR2 expression levels with NAFLD. (A) TLR2 mRNA levels in different NAFLD stages ($n = 9$ controls; $n = 14$ simple steatosis; $n = 14$ B-NASH, and $n = 29$ NASH patients). (B) Representative examples of TLR2 immunoblotting in hepatic tissue of control, Simple Steatosis, B-NASH and NASH individuals. (C) Comparison of TLR2 protein levels in control, Simple Steatosis, B-NASH and NASH subjects. TLR2 mRNA expression normalized to β -actin. TLR2 protein levels normalized to β -actin. Control (CNTL), Simple Steatosis (SS), Borderline NASH (B-NASH), Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH). Data are expressed as mean \pm SEM.

Table 4. Correlation of hepatic miR-144 levels with TLR2 expression

	miR-144	
	Correlation coefficient	<i>P</i> value
TLR2 mRNA	0.132	0.293
TLR2 Protein	0.023	0.856

Correlations were obtained by performing a Spearman's test, ($n = 66$).

hepatic lipid storage, while ABCA1 overexpression resulted in increased cholesterol efflux and decreased hepatic lipid contents (25, 26). In contrast, a study including mainly overweight individuals reported

increased ABCA1 expression in NAFLD (27). This discrepancy could be related to differences in study populations, as our included class III obese individuals with NAFLD, which represent a distinct pathophysiological entity (28).

We also observed decreased ABCG1 protein expression in NASH biopsies, but no significant differences in ABCG1 mRNA expression among study groups. Only two previous studies have reported ABCG1 expression in human NAFLD. This study by Min *et al.* (9) is consistent with our results regarding ABCG1 protein, but not mRNA expression. Caballero *et al.* (5) reported increased mRNA ABCG1 levels in NAFLD biopsies, however, protein levels were not determined. Further studies are required to clarify the post-transcriptional regulation of ABCG1 in NAFLD, and to solve these discrepancies.

In accordance with previous studies, HTC and HFC levels were increased in NASH individuals (4, 5). Free cholesterol loading is known to be highly cytotoxic, causing mitochondrial and endoplasmic reticulum (ER) membrane disruption, mitochondrial oxidative injury and ER stress (5, 24, 29). Since ABCA1 expression increases hepatic cholesterol efflux and plasma HDL-C levels, a negative correlation with hepatic cholesterol content would be anticipated. However, even though ABCA1 protein levels were decreased and HFC content was increased in NASH liver biopsies, unexpectedly both parameters showed a positive and significant correlation. Several lines of evidence have shown that ABCA1 function may affect cholesterol metabolic pathways other than cholesterol efflux in hepatocytes. In the murine model, hepatic ABCA1 over-expression increased hepatic cholesterol content, apparently mediated by increased expression of genes known to elevate hepatic cholesterol, including 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (*HMGCR*), low density lipoprotein receptor and LDL receptor-related protein (30). Moreover, *HMGCR* over-expression seems to be a key factor driving the accumulation of HFC in human NAFLD and NASH (9), which could explain the positive correlation between ABCA1 protein levels and HFC in NASH biopsies observed in this study. Additional studies are required to further understand the role of ABCA1 in human hepatic cholesterol metabolism, both in normal and pathological conditions.

The direct correlation between serum adiponectin levels and ABCA1 hepatic protein levels in NAFLD subjects observed here is consistent with the well-known role of adiponectin in regulation of ABCA1 expression (31). However, the association of ABCA1 protein levels with NASH remained significant after adjustment by serum adiponectin levels ($P = 0.035$). This suggests the involvement of other processes modulating ABCA1 expression. Interestingly, we found decreased ABCA1/G1 protein, but not mRNA levels in NASH, suggesting the involvement of post-transcriptional mechanisms. Several studies have reported that miR-33 repressed

ABCA1 protein expression in cells of mouse and human origin, and repressed *ABCG1* 3'UTR activity only in murine cells (10, 32). Our data demonstrate that miR-33a showed a significantly inverse correlation with ABCA1 protein expression, but only a trend with ABCA1 mRNA expression. These results are in line with observations in non-human primate liver biopsies, where a modest effect of anti-miR-33 on ABCA1 mRNA, and a robust increase in hepatic ABCA1 protein were observed (33). These observations are consistent with a translational effect of miR-33, although further studies are required to elucidate whether miR-33a is a translational repressor. As expected, miR-33a was not correlated with *ABCG1* protein levels in human liver biopsies, in consistency with its lack of a conserved *ABCG1* gene target in primates (32).

Notably, miR-33b showed a highly significant inverse correlation with *ABCA1/G1* mRNA, but no correlation with *ABCA1/G1* protein levels. These findings are similar to observations in non-human primates, where anti-miR-33b increased hepatic expression of ABCA1 (34). miRNAs are known to induce degradation of their target mRNAs when recognizing them with incomplete complementarity (35). As the isoforms miR-33a and miR-33b differ by only 2 nucleotides in their mature sequences, although identical in their seed sequence (11), miR-33b could recognize putative binding sites in the 3' UTR of *ABCA1* and *ABCG1*, resulting in degradation or destabilization of target mRNA. Further studies are required to discern why miR-33b levels correlate with *ABCA1/G1* mRNA levels, but not with their protein levels.

It is known that miR-144 also regulates ABCA1 expression in murine models and human macrophages, attenuating cholesterol efflux to apo-A1 (12). This is consistent with the association of miR-144 with ABCA1 protein levels, and with NASH observed in this study. Together, our findings suggest that disruption of both miR-33a and miR-144 levels may contribute to the development of NAFLD through ABCA1 inhibition.

We also found that reduced *ABCA1/G1* levels are associated with the severity of liver fibrosis. Recent research suggests that free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells aggravates liver fibrosis in NASH in the murine model, possibly by increasing miR-33a levels which in turn would suppress ABCA1 levels (23). Further studies in hepatic stellate cells may help define whether this mechanism is involved in the progression from steatohepatitis to liver fibrosis in humans.

Interestingly, the association of miR-33a with NAFLD remained significant after adjusting for ABCA1 protein levels, suggesting that miR-33a could play a role in NAFLD by regulating other targets, such as transcripts encoding proteins involved in cellular fatty acid β -oxidation, fatty acid degradation and inflammation (11, 13). Several genes involved in fatty acid oxidation have predicted targets for miR-33, including *CROT* and *HADHB* (11). In this regard, we found an inverse relationship of miR-33a with hepatic *CROT*

and *HADHB* mRNA and protein levels, and a modest decrease in the hepatic *HADHB* mRNA and *CROT* protein levels in steatosis subjects. These findings are consistent with previous studies indicating that miR-33 can inhibit *CROT* and *HADHB* expression, limiting fatty acid oxidation in murine and human liver cells (11, 13). Thus, it seems that targeting of *HADHB* by miR-33a could play a role in steatosis, but probably not in progression to NASH.

On the other hand, a recent study showed that down-regulation of miR-144 could enhance proinflammatory cytokine production by targeting TLR2, and contributes to the progression of NASH in a rat model (14). Although the human *TLR2* gene is predicted to contain a miR-144 binding site, we did not find a significant correlation between miR-144 and *TLR2* mRNA or protein levels. *TLR2* has only one miR-144 binding site, as compared to *ABCA1* having 7 miR-144 binding sites (12). Thus, this lack of correlation could be explained by insufficient miR-144 expression, unable to exert its regulating function on *TLR2* expression (36).

Several limitations of this study must be acknowledged. As this study included only morbidly obese individuals, our results may not be applicable to other classes of obesity or normal weight individuals. Another unavoidable limitation stems from the lack of experimental data confirming the negative regulation of miR33/144 on its targets in NAFLD. Moreover, the expression of miR33/144 target genes that may participate in NAFLD other than *ABCA1/G1*, *CROT*, *HADHB* and *TLR2* were not measured (11).

In conclusion, our results show that miR-33a/144 hepatic expression and their target *ABCA1* are associated with NASH in patients with morbid obesity.

Acknowledgements

Joel Vega-Badillo is in the Ciencias Bioquímicas PhD program (UNAM) and supported by CONACyT scholarship No. 256502. RGV, PLM and HVR were supported by CONACyT scholarships. HAHP was supported by a DGAPA-UNAM postdoctoral fellowship.

Conflict of interest: The authors declare they have no competing interests.

Financial support: This study was supported by grants from CONACyT (SALUD-2012-01-182801), PAPIIT-UNAM (IA202413), and the Fundación Miguel Alemán, A.C.

References

1. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, *et al.* Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; **40**: 1387–95.
2. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; **346**: 1221–31.
3. Harrison SA, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2004; **8**:861–79, ix.

4. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, *et al.* A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2007; **46**: 1081–90.
5. Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, *et al.* Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol* 2009; **50**: 789–96.
6. Van Rooyen DM, Larter CZ, Haigh WG, *et al.* Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2011; **141**:1393–403, 1403.e1–5.
7. Glissen IC, Harris M, Rye K-A, *et al.* ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26**: 534–40.
8. Timmins JM, Lee J-Y, Boudyguina E, *et al.* Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1333–42.
9. Min H-K, Kapoor A, Fuchs M, *et al.* Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab* 2012; **15**: 665–74.
10. Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, *et al.* MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 2010; **328**: 1570–3.
11. Dávalos A, Goedeke L, Smibert P, *et al.* miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 9232–7.
12. Ramírez CM, Rotllan N, Vlassov AV, *et al.* Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144. *Circ Res* 2013; **112**: 1592–601.
13. Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, *et al.* Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest* 2011; **121**: 2921–31.
14. Li D, Wang X, Lan X, *et al.* Down-regulation of miR-144 elicits proinflammatory cytokine production by targeting toll-like receptor 2 in nonalcoholic steatohepatitis of high-fat-diet-induced metabolic syndrome E3 rats. *Mol Cell Endocrinol* 2015; **402**: 1–12.
15. Gastrointestinal surgery for severe obesity. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. *Am J Clin Nutr* 1992; **55**: 615S–9S.
16. León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Compañán M, *et al.* Contribution of common genetic variants to obesity and obesity-related traits in Mexican children and adults. *PLoS ONE* 2013; **8**: e70640.
17. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; **28**: 412–9.
18. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010; **33**(Suppl 1): S62–9.
19. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; **41**: 1313–21.
20. Folch J, Lees M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; **226**: 497–509.
21. Patel DC, Albrecht C, Pavitt D, *et al.* Type 2 diabetes is associated with reduced ATP-binding cassette transporter A1 gene expression, protein and function. *PLoS ONE* 2011; **6**: e22142.
22. Ozasa H, Ayaori M, Iizuka M, *et al.* Pioglitazone enhances cholesterol efflux from macrophages by increasing ABCA1/ABCG1 expressions via PPAR γ /LXR α pathway: findings from in vitro and ex vivo studies. *Atherosclerosis* 2011; **219**: 141–50.
23. Tomita K, Teratani T, Suzuki T, *et al.* Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2014; **59**: 154–69.
24. Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog Lipid Res* 2013; **52**: 175–91.
25. Liu W, Qin L, Yu H, Lv F, Wang Y. Apolipoprotein A-I and adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1 expression alleviates lipid accumulation in hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; **29**: 614–22.
26. Yang Y, Jiang Y, Wang Y, An W. Suppression of ABCA1 by unsaturated fatty acids leads to lipid accumulation in HepG2 cells. *Biochimie* 2010; **92**: 958–63.
27. Ahn SB, Jang K, Jun DW, Lee BH, Shin KJ. Expression of liver X receptor correlates with intrahepatic inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 2014; **59**: 2975–82.
28. Tran A, Gual P. Non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013; **37**: 17–29.
29. Marí M, Caballero F, Colell A, *et al.* Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* 2006; **4**: 185–98.
30. Basso F, Freeman L, Knapper CL, *et al.* Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J Lipid Res* 2003; **44**: 296–302.
31. Tsubakio-Yamamoto K, Matsuura F, Koseki M, *et al.* Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing cholesterol efflux from macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **375**: 390–4.
32. Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldán A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 12228–32.
33. Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, *et al.* Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature* 2011; **478**: 404–7.
34. Rottiers V, Obad S, Petri A, *et al.* Pharmacological inhibition of a microRNA family in nonhuman primates by a seed-targeting 8-mer antimiR. *Sci Transl Med* 2013; **5**:212ra162.
35. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* 2005; **11**: 1753–61.
36. Brown BD, Gentner B, Cantore A, *et al.* Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat Biotechnol* 2007; **25**: 1457–67.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.13109/suppinfo

13 OTRAS PUBLICACIONES

- I. León-Mimila P, **Vega-Badillo J**, Gutiérrez-Vidal R, Villamil-Ramírez H, Villarreal-Molina T, Larrieta-Carrasco E, López-Contreras BE, Kauffer LR, Maldonado-Pintado DG, Méndez-Sánchez N, Tovar AR, Hernández-Pando R, Velázquez-Cruz R, Campos-Pérez F, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S. A genetic risk score is associated with hepatic triglyceride content and non-alcoholic steatohepatitis in Mexicans with morbid obesity. *Exp Mol Pathol*. 2015 Apr;98(2):178-83. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.01.012.

- II. Gutiérrez-Vidal R, **Vega-Badillo J**, Reyes-Fermín LM, Hernández-Pérez HA, Sánchez-Muñoz F, López-Álvarez GS, Larrieta-Carrasco E, Fernández-Silva I, Méndez-Sánchez N, Tovar AR, Villamil-Ramírez H, Mejía-Domínguez AM, Villarreal-Molina T, Hernández-Pando R, Campos-Pérez F, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S. SFRP5 hepatic expression is associated with non-alcoholic liver disease in morbidly obese women. *Ann Hepatol*. 2015 Sep-Oct;14(5):666-74.

- III. León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Comparán M, Villarreal-Molina T, Romero-Hidalgo S, López-Contreras B, Gutiérrez-Vidal R, **Vega-Badillo J**, Jacobo-Albavera L, Posadas-Romeros C, Canizales-Román A, Río-Navarro BD, Campos-Pérez F, Acuña-Alonzo V, Aguilar-Salinas C, Canizales-Quinteros S. Contribution of common genetic variants to obesity and obesity-related traits in

mexican children and adults. PLoS One. 2013 Aug 8;8(8):e70640. doi: 10.1371/journal.pone.0070640.

- IV. **Vega-Badillo J.** Dysregulation in hepatic cholesterol homeostasis and its implications in nonalcoholic steatohepatitis. TIP. 2016 (en prensa).

- V. Villamil-Ramírez H, León-Mimila P, Canizalez-Román A, Villalobos-Comparán M, Kauffer LR, **Vega-Badillo J**, Sánchez-Muñoz F, López-Contreras B, Morán-Ramos S, Villarreal-Molina T, Campos-Pérez F, Huertas-Vazquez A, Bojalil R, Romero-Hidalgo S, Aguilar-Salinas C, Canizales-Quinteros S. A combined linkage and association strategy identifies a variant near the *GSTP1* gene associated with BMI in the Mexican population. Journal of Human Genetics (en revisión).

- VI. Sofia Moran-Ramos, Elvira Ocampo-Medina, Ruth Gutierrez-Aguilar, Luis Macias-Kauffer, Hugo Villamil-Ramírez, Blanca E. López-Contreras, Paola León-Mimila, **Joel Vega-Badillo**, Roxana Gutierrez-Vidal, Ricardo-Villaruel-Vazquez, Erandi Serrano-Carbajal, Blanca del Rio-Navarro, Adriana Huertas-Vazquez, Teresa Villarreal-Molina, Carlos A. Aguilar-Salinas, Isabel Ibarra-Gonzalez, Marcela Vela-Amieva, Samuel Canizales-Quinteros. A serum amino acid signature associated with obesity predicts two-year risk of hypertriglyceridemia in Mexican school-age children. The Journal Clinical Endocrinology and Metabolism (en revisión).