



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR
CAMPO DE CONOCIMIENTO: INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD

“Análisis y correlación de marcadores epigenéticos moleculares (microRNAs) entre la enfermedad hígado graso no alcohólico (HGNA) y el binomio esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)-fibrosis”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACION CLINICA EXPERIMENTAL EN SALUD

PRESENTA:
LÓPEZ SÁNCHEZ GUILLERMO NAHÚM

TUTOR:
DR. MISAEL URIBE ESQUIVEL
UNIDAD DE INVESTIGACION TRASLACIONAL FUNDACION CLINICA MEDICA SUR

Vo.Bo. Dr. Misael Uribe
Tutor académico

Vo.Bo. Dra. Marta A. Menjivar Iraheta
Coodinadora campo Bioquímica Clínica

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MEXICO MAYO 2023



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.

El Programa de Doctorado en Investigación Clínica Experimental en Salud de la Universidad Nacional Autónoma de México pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, en el nivel consolidado.

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Traslacional de la Fundación Clínica Médica Sur. El trabajo de investigación fue patrocinado por la Fundación Clínica Médica Sur y el programa de apoyo a los estudios de posgrado (PAEP) 2020.

Durante el transcurso del doctorado en Investigación Clínica Experimental en Salud, recibí beca otorgada por el CONACYT, con número de becario/CVU 289768, en el período 2017-2021, organismo al que agradezco su apoyo.

Los miembros del jurado, designados por la coordinación del programa de Maestría y Doctorado en ciencias médicas, odontológicas y de la salud En el area de investigación clínica experimental en salud sub area bioquímica clínica de la Universidad Nacional Autónoma de México, aprobaron la tesis titulada: “Análisis y correlación de marcadores epigenéticos moleculares (microRNAs) entre enfermedad hígado graso no alcohólico (HGNA) y el binomio esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)-fibrosis”,

Que presenta Guillermo Nahúm López Sánchez con fecha de examen: Mayo 2023.

Miembros del jurado:

Presidente:	Dra. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes
Secretario:	Dra. María del Carmen García de León Méndez
Vocal:	Dr. Misael Uribe Esquivel
Vocal:	Dra. Martha Guevara Cruz
Vocal:	Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Comité Tutor:

Dra. Natalia Nuño Lámbarri

Dra. Claudia Huesca Gómez

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

Dr. Misael Uribe Esquivel

Dr. Carlos Pérez Monter

AGRADECIMIENTOS

“Mientras el río corra, los montes hagan sombra y en el cielo haya estrellas, debe durar la memoria del beneficio recibido en la mente del hombre agradecido”

A mi familia, pequeña, pero siempre atenta y ofreciendome su apoyo y amor incondicional, este logro es para ustedes.

A Ness, sin tu presencia y apoyo no estaría en este lugar privilegiado, este trabajo existiría de no ser por ti

A ti Abue, mi ángel, el motor y combustible que siempre impulsarán mi camino, todos mis logros siempre serán tuyos y mi amor y agradecimiento eterno.

A Natalia, por tu entusiasmo, por creer en mí.

Agradezco también a mi tutor el Dr. Misael Uribe, al Dr. Norberto Chavéz, a todos los miembros de la Unidad de Investigación Traslacional y de la Fundación Clínica Médica Sur por su apoyo y consejos para lograr este trabajo, mi deseo es continuar creciendo juntos en nuestra área de investigación consolidar nuestras líneas de investigaciones y ser los ¡mejores investigadores del país!

RESUMEN

El hígado graso no alcohólico (HGNA), se ha convertido en un problema de salud pública de proporciones epidémicas en todo el mundo, es la principal hepatopatía a nivel global, seguida por la cirrosis alcohólica y la cirrosis viral. Su incidencia en el país es del 25% y en otros lugares del mundo alcanza cifras tan elevadas como hasta el 40% de prevalencia. Se trata de una entidad patológica que en su estado inicial es benigna, que si no recibe tratamiento oportuno y adecuado puede evolucionar a estadios más agresivos y tener un desenlace fatal en el paciente.

HGNA se define por la presencia de esteatosis macro y micro vesicular en más del 5% de los hepatocitos, en individuos sin consumo significativo de alcohol (≥ 30 g/día para hombres y ≥ 20 g/día para mujeres) u otra causa conocida de enfermedad hepática crónica. El subsecuente estadio de progresión de la enfermedad se conoce como esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), caracterizada por esteatosis, lipotoxicidad, inflamación y fibrosis, que puede evolucionar a una etapa final irreversible denominada cirrosis metabólica o en carcinoma hepatocelular.

Se han reportado diversos mecanismos para explicar la enfermedad del hígado graso asociada a disfunción metabólica, la evidencia experimental sugiere que la resistencia a la insulina sistémica/hepática es el mecanismo iniciador de la patogénesis, seguido por la activación de vías inflamatorias debido a la disfunción y sobrecarga lipídica intrahepática que propicia un microambiente de lipotoxicidad mediante la liberación de agentes proinflamatorios, pro-coagulantes y pro-fibrogénicos que ocasionan daño hepático y daño tisular extrahepático.

Las vías celulares implicadas en esta serie de eventos no están elucidadas y los mecanismos implicados en la activación de la respuesta inflamatoria no quedan claros aún. Debido a que el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad es complejo y multifactorial, el microambiente celular juega un papel clave.

Todas las células del cuerpo humano contienen el mismo código genético, influenciado por los diferentes mecanismos genéticos y epigenéticos, los cuales regulan la expresión génica como un mecanismo adaptativo y que no está relacionado con alteraciones de la secuencia primaria de ADN. Estos mecanismos pueden interactuar dinámicamente y superponerse entre sí; pero, un desbalance en estos mecanismos juega un papel clave en el desarrollo de varias enfermedades, incluida el HGNA.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue explorar e identificar la existencia de un perfil de expresión diferencial de microRNAs (miRNAs), en las distintas etapas de la enfermedad (HGNA-esteatosis simple; EHNA).

Para lograr determinar este perfil, el primer objetivo fue reclutar pacientes que previamente se programaron para la realización de una colecistectomía laparoscópica por previo diagnóstico de litiasis vesicular. Los pacientes que aceptaron participar firmaron el consentimiento informado y se obtuvo una biopsia hepática y muestra sanguínea para el estudio. Posteriormente el tejido hepático fue analizado y clasificado por 2 patólogos expertos mediante la escala NAS (NAFLD Activity Score), clasificando a los pacientes en 3 grupos: control (sin HGNA) HGNA y EHNA.

Posterior a la clasificación de los pacientes, se obtuvo RNA de las muestras hepáticas y se exploró el perfil de expresión diferencial de los miRNAs por medio de un ensayo de microarreglos. Tanto los grupos HGNA como EHNA mostraron un perfil de expresión diferencial cuando son comparados contra el grupo control; 25 miRNAs desregulados conforman el perfil de expresión diferencial, del grupo HGNA cuando es comparado con el grupo control, 23 positivamente y 2 negativamente; mientras que cuando se compara el grupo EHNA contra el grupo control, 21 miRNAs se encuentran desregulados todos de manera negativa.

Para validar este perfil, de los miRNAs desregulados se seleccionaron cinco al azar, los cuales se validaron por medio de ensayos qRT-PCR en un grupo de muestras de RNA proveniente de biopsias hepáticas distintas a las utilizadas en el microarreglo. Cuatro de estos miRNAs mostraron el mismo patrón de desregulación reportado por el ensayo de expresión diferencial. Para determinar los potenciales blancos de reconocimiento de los cinco miRNAs con mayor tasa de cambio (positiva o negativa), se realizó un análisis bioinformático de enriquecimiento, comparando los sitios de reconocimiento de la región semilla de cada uno de los cinco miRNAs para identificar elementos comunes y determinar una posible interacción de estas moléculas en vías metabólicas asociadas a la enfermedad. El resultado de análisis de interacción entre los blancos de los miRNAs no identificó una vía específica implicada en la enfermedad con plausibilidad biológica.

Finalmente, con el suero de los pacientes, nosotros exploramos los niveles circulantes de las moléculas propuestas como potenciales biomarcadores diferenciales de la HGNA, donde solo IL-32 presentó niveles elevados en nuestra población con EHNA. Nosotros proponemos al miRNA hsa-miR-148-5p como un candidato auxiliar para el diagnóstico de HGNA y al

miRNA hsa-miR-3148 como candidato para el diagnóstico de EHNA; o al menos como moléculas involucradas en la complejidad de la enfermedad.

SUMMARY

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which has become a public health problem of epidemic proportions worldwide, is the leading liver disease globally, followed by alcoholic cirrhosis and viral cirrhosis. Its incidence in the country is 25% and in other parts of the world it reaches figures as high as up to 40% of prevalence. It is a pathological entity that in its initial state is benign, which if it does not receive timely and adequate treatment can evolve to more aggressive stages and have a fatal outcome in the patient.

NAFLD is defined by the presence of macro- and microvesicular steatosis in more than 5% of hepatocytes, in individuals without significant alcohol consumption (≥ 30 g/day for men and ≥ 20 g/day for women) or another known cause of chronic liver disease. The subsequent stage of disease progression is known as nonalcoholic steatohepatitis (NASH), characterized by steatosis, lipotoxicity, inflammation and fibrosis, which can progress to an irreversible final stage called metabolic cirrhosis or hepatocellular carcinoma.

Several mechanisms have been reported to explain fatty liver disease associated with metabolic dysfunction, experimental evidence suggests that systemic/hepatic insulin resistance is the initiating mechanism of pathogenesis, followed by the activation of inflammatory pathways due to intrahepatic lipid dysfunction and overload that promotes a lipotoxicity microenvironment through the release of pro-inflammatory agents, pro-coagulants and pro-fibrogenics that cause liver damage and extrahepatic tissue damage.

The cellular pathways involved in this series of events are not elucidated and the mechanisms involved in activating the inflammatory response are not yet clear. Because the pathophysiological mechanism of the disease is complex and multifactorial, the cellular microenvironment plays a key role.

All cells of the human body contain the same genetic code, influenced by different genetic and epigenetic mechanisms, which regulate gene expression as an adaptive mechanism, and which is not related to alterations of the primary DNA sequence. These mechanisms can interact dynamically and overlap each other; but an imbalance in these mechanisms plays a key role in the development of several diseases, including NAFLD.

Therefore, the objective of this study was to explore and identify the existence of a microRNAs (miRNAs) differential expression profile, in the different stages of the disease (NAFLD-simple steatosis; NASH).

In order to determine this profile, the first objective was to recruit patients who were previously scheduled to perform a laparoscopic cholecystectomy due to a previous diagnosis of vesicular lithiasis. Patients who agreed to participate signed the informed consent and a liver biopsy and blood sample were obtained for the study. Subsequently, the liver tissue was analyzed and classified by 2 expert pathologists using the NAS scale (NAFLD Activity Score), classifying patients into 3 groups: control (without NAFLD) NAFLD and NASH.

After the classification of the patients, RNA was obtained from the liver samples and the differential expression profile of the miRNAs was explored by means of a microarray assay. Both the NAFLD and NASH groups showed a differential expression profile when compared against the control group; 25 dysregulated miRNAs make up the differential expression profile of the NAFLD group when compared with the control group, 23 positively and 2 negatively; while when comparing the NASH group against the control group, 21 miRNAs are all negatively dysregulated.

To validate this profile, five of the deregulated miRNAs were randomly selected, which were validated by qRT-PCR assays in a group of RNA samples from liver biopsies other than those used in the microarray. Four of these miRNAs showed the same pattern of dysregulation reported by the differential expression assay. To determine the potential recognition targets of the five miRNAs with the highest rate of change (positive or negative), a bioinformatic enrichment analysis was performed, comparing the recognition sites of the seed region of each of the five miRNAs to identify common elements and determine a possible interaction of these molecules in metabolic pathways associated with the disease. The result of interaction analysis between miRNA targets did not identify a specific pathway involved in the disease with biological plausibility.

Finally, with the serum of the patients, we explored the circulating levels of the molecules proposed as potential differential biomarkers of NAFLD, where only IL-32 presented elevated levels in our population with MASH. We propose the miRNA hsa-miR-148-5p as an auxiliary candidate for the diagnosis of NAFLD and the miRNA hsa-miR-3148 as a candidate for the diagnosis of NASH or at least as molecules involved in the complexity of the disease.

INDICE

Resumen	6
Summary	9
Índice	11
Capítulo I: Entorno conceptual (Introducción)	13
1. Conceptos generales	13
1.1 De NAFLD a MAFLD	13
1.2 Prevalencia de la enfermedad	14
1.3 Fisiopatología de HGNA y NASH	15
1.4 Diagnóstico	17
1.5 NAFLD y el microambiente	19
1.6 Epigenética	19
1.7 MicroARN	20
1.8 Biogénesis de los microRNAs	21
1.9 Mecanismo de control de la expresión génica	21
1.10 MicroARNs e Hígado	22
Capítulo II: Metodología	26
2.1 Planteamiento del problema	26
2.2 Justificación	26
2.3 Pregunta de investigación	26
2.4 Hipótesis	26
2.5 Objetivos	27
2.6 Diseño metodológico	27
2.7 Tamaño de muestra	27
2.8 Criterios de selección de pacientes	28
2.9 Descripción de procedimientos	28
2.9.1 Evaluación clínica	29
2.9.2 Elastografía de transición con vibración controlada (VCTE)	29
2.9.3 Biopsia hepática transoperatoria	29
2.9.4 Extracción de RNA	30
2.9.5 Ensayo por microarreglos	30
2.9.6 Ensayo cuantitativo de la RT-PCR en tiempo real	31
2.9.7 Análisis de enriquecimiento	31
2.9.8 Inmunoensayos enzimáticos	32
2.9.9 Plan de análisis estadístico	32
Capítulo III: Resultados	33
3.1 Características epidemiológicas de la cohorte	33
3.2 Histologías hepáticas	34
3.3 Ensayo de expresión diferencial de microRNAs	37
3.4 Validación del perfil de expresión diferencial	40
3.5 Análisis de enriquecimiento	40
3.6 Cuantificaciones séricas de otros marcadores experimentales de HGNA	50
Capítulo IV: Discusión	51
Capítulo V Conclusiones	57
Referencias Bibliográficas	58
Bibliografía	75

Apéndice A: Abreviaturas
Apéndice B: Lista de figuras
Apéndice C: Lista de tablas
Apéndice D: Cuestionario de consumo de alcohol (prueba AUDIT)
Apéndice E: Escala de actividad de NAFLD (NAS)
Apéndice F: Publicaciones derivadas de este trabajo

CAPÍTULO I: ENTORNO CONCEPTUAL (INTRODUCCIÓN)

1. Conceptos Generales.

Actualmente existe una necesidad urgente de abordar la creciente epidemia de la enfermedad hígado graso no alcohólico (HGNA) en todos aspectos clínicos, que van desde la investigación y desarrollo de nuevos biomarcadores de diagnóstico y progresión no invasivos hasta tratamientos específicos para la enfermedad. Las proyecciones más recientes estiman que para 2030, más de 100 millones de adultos solo en los Estados Unidos tendrán HGNA, y si no se actúa, se estima que la incidencia de la descompensación y progresión a estadios terminales como el carcinoma hepatocelular y la muerte aumentará más del 130 % (1-3).

La HGNA afecta cerca de un tercio de la población mundial y la prevalencia de factores de riesgo para esta enfermedad en la población mexicana es elevada (ENSANUT 2020) proyectándose una prevalencia superior al 50%, por lo que la HGNA se considera un problema de salud nacional (3-5). El campo de HGNA es actualmente un blanco de interés en investigación clínica, básica y traslacional.

1.1 De *NAFLD* a *MAFLD*

La enfermedad hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés, Nonalcoholic Fatty Liver Disease) fue descrita por primera vez por Ludwig en 1980, quien en una serie de casos de mujeres con cirrosis sin antecedente de abuso del alcohol encontró un patrón morfológico de lesión hepática histológicamente similar a los que se observan en la esteatosis alcohólica, y cuyas características en común de estos casos fueron la presencia de obesidad y diabetes mellitus (6).

La Asociación Mexicana de Gastroenterología define a la HGNA como un trastorno metabólico que se caracteriza por la acumulación de grasa en los hepatocitos de individuos sin consumo significativo de alcohol, de medicamentos hepatotóxicos, ni otras causas conocidas de esteatosis secundaria (7). La HGNA se considera una enfermedad compleja sigilosa debido a que durante muchos años se puede cursar asintomática hasta la aparición de enfermedad manifiesta avanzada. La afección está asociada con una morbilidad y mortalidad sustanciales y, actualmente, sus estadios más severos son la principal causa de trasplante de hígado en países desarrollados (8-9).

La HGNA comprende un espectro de lesiones hepáticas que van desde la esteatosis simple, que se define como la infiltración de lípidos en más del

5% del parénquima hepático con un patrón histológico en mosaico conformado por macro y micro vesículas grasas intracelulares, hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)(7,10), un estadio más severo definida además de la esteatosis hepática, por la presencia de infiltrado inflamatorio, balonamiento morfológico de los hepatocitos acompañado de inflamación lobular con o sin fibrosis que, puede progresar a una enfermedad hepática de mayor gravedad, como cirrosis e insuficiencia hepática o hepatocarcinoma y llevar al paciente a la muerte(9,11-12) (Figura 1).

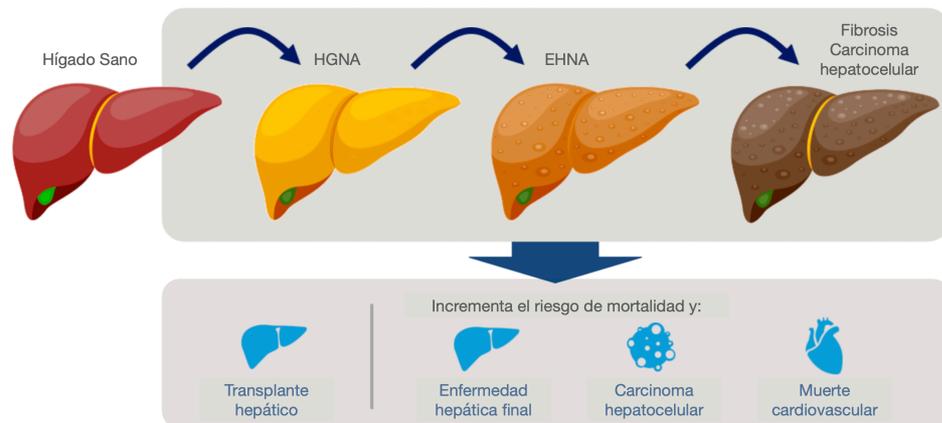


Figura 1. Estadios de la enfermedad por Hígado graso no alcohólico (HGNA) y los desenlaces de riesgo asociados a dicha patología. (9-12)

Recientemente, un panel internacional de expertos recomendó cambiar el nombre de Hígado Graso No Alcohólico a Hígado Graso Asociada a Disfunción Metabólica (MAFLD, por sus siglas en inglés), ante ello, actualmente existe un debate en la comunidad científica y médica sobre la nueva definición, en comparación con la definición de enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD acrónimo en inglés), esta nueva definición se basa en un diagnóstico de inclusión que conjunta factores de riesgo metabólicos y la presencia de esteatosis hepática. Ningún estudio ha examinado las dos definiciones en cohortes clínicas bien definidas. El debate que busca lograr el consenso de las comunidades científicas y medicas globales en el momento de la publicación de esta tesis continua, por lo cual la definición de Hígado Graso No Alcohólico o NAFLD será utilizada. (13-14).

1.2 Prevalencia de la enfermedad

La información disponible más recientes reporta que más de una cuarta parte de la población mundial está afectada por HGNA, algunos estudios demuestran que la prevalencia de la enfermedad varía según la etnicidad de la población estudiada, e incluso es mayor en cierta población que padece alguna comorbilidad (9), por ejemplo, la tasa de prevalencia de

HGNA pacientes con diabetes tipo 2 (T2DM) llega al 55 % (15). Datos provenientes de una reciente revisión sistemática reportan una prevalencia global estimada de HGNA de 50.7% (IC95%: 46.9 - 54.4) en adultos con sobrepeso/obesidad, independientemente de las técnicas de diagnóstico, los hombres con obesidad tuvieron una prevalencia significativamente más alta (59%) que las mujeres con el mismo fenotipo (47.5%) (16). La prevalencia estimada de comorbilidades como T2DM y síndrome metabólico fue del 19.7% y del 57.5% respectivamente en este tipo de pacientes (17).

En cuanto a los datos regionales la prevalencia estimada de HGNA en América Latina es del 31 %, cifra mayor a la media global (25%) reportada (18), aunque las estimaciones para la región son imprecisas, debido a la variación de la metodología de diagnóstico y a que varios países de la zona no tiene una cifra oficial, Brasil (35,2%), Colombia (26,6%) y Chile (23%) son los países que han reportado las cifras oficiales de prevalencia más altas hasta ahora (9), mientras que México reporta una prevalencia de HGNA del 17%, esta se considera sub diagnosticada, debido a que esta enfermedad ha mostrado una correlación proporcional al crecimiento de las tasas de T2DM y de obesidad que en el país se encuentran entre las más altas del mundo (7,19). La creciente carga global de HGNA ha estimulado la investigación y ampliado la comprensión, no solo de la fisiopatología, sino también de la carga que impone a las personas, la sociedad y los sistemas de salud de todo el mundo.

1.3 Fisiopatología de HGNA y EHNA

En condiciones normales, los hepatocitos captan ácidos grasos libres (AGL) del torrente circulante derivados de la dieta a través de la absorción intestinal y el metabolismo extrahepático a través de quilomicrones. La secreción de insulina posterior a la ingesta de alimentos, estimulan la captación y conversión de glucosa en ácidos grasos a través de la lipogénesis de Novo (LDN) en los hepatocitos (10). Los AGL y los generados por LDN se esterifican en triacilglicéridos, ésteres de colesterol, estables y poco reactivos que permiten su almacenamiento intrahepático en forma de gotas de lípidos, así como su exportación a otros órganos como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Durante el ayuno, los ácidos grasos no se procesan en triglicéridos (TG), sino que se metabolizan a través de la oxidación beta para servir como fuente de energía (10,20-21). El desarrollo de HGNA es un proceso complejo y no completamente comprendido, diversas investigaciones se llevan a cabo para dilucidar los mecanismos fisiopatológicos moleculares involucrados en el proceso de HGNA y EHNA.

La presencia de lípidos intrahepáticos en ausencia de otras causas de enfermedad hepática o consumo excesivo de alcohol representa la forma inicial HGNA, denominada como esteatosis simple, la cual se considera la manifestación benigna y reversible de la patología(22-23). La palabra esteatosis proviene de la palabra griega “*steato*” que significa grasa o sebo, esta acumulación de lípidos se considera una manifestación hepática de la obesidad y sus trastornos metabólicos relacionados, como la diabetes y la resistencia a la insulina(23-24).

Esta acumulación anormal y significativa de lípidos intrahepáticos es el resultado de un incremento considerable en el flujo de AGL al órgano. Se plantea la hipótesis que el HGNA es consecuencia de múltiples agresiones clínicas y moleculares al hígado y que estos golpes críticos están relacionados con los componentes del síndrome metabólico, especialmente la obesidad visceral y la resistencia a la insulina(25-26). La acumulación y la desregulación del metabolismo de los lípidos y la glucosa provocan una disfunción hepática que crea un microambiente que promueve la inflamación y conduce al balonamiento de hepatocitos y a su necrosis (27). Este proceso puede activar en última instancia las células estelares, lo que conduce a la acumulación de colágeno y fibrosis hepática en la EHNA. A medida que empeora la etapa de la fibrosis, se puede establecer cirrosis que pone a los pacientes en riesgo de insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular (HCC)(28).

Se plantea entonces, que el primer golpe crítico para el desarrollo de esta enfermedad es consecuencia de la disfunción metabólica propiciada por el sobrepeso y obesidad que provocan alteraciones en las señales pos-receptor de la insulina(29-30). Como se señaló anteriormente, la EHNA es la forma potencialmente progresiva de HGNA, que se define como la evidencia histológica de esteatosis hepática acompañada de inflamación lobular, balonización de hepatocitos con o sin fibrosis peri celular y cuerpos de Mallory-Denk; alrededor del 15-20 % de los pacientes con EHNA pueden progresar a cirrosis, HCC y puede requerir de trasplante hepático(31,28). En algunos individuos la sobrecarga de lípidos intrahepáticos propicia un microambiente que promueve la inflamación y necrosis de los hepatocitos(32).

En pacientes con EHNA la actividad de la cadena respiratoria se encuentra reducida, como consecuencia de la resistencia a la insulina y a la disminución de la captación intrahepática de glucosa, disminuyendo considerablemente el adenosintrifosfato (ATP) hepático de forma transitoria, lo que estimula la activación de vías alternas para la obtención de energía(33). La consecuencia de este desbalance genera estrés oxidante que ha sido reconocido como el mecanismo clave responsable de la progresión del daño de la enfermedad, este estrés oxidante es consecuencia

de las alteraciones metabólicas debido a la sobrecarga lipídica y a la resistencia a la insulina presentes en los pacientes con HGNA(33,29).

La lipoperoxidación, consecuencia del daño oxidante provoca daño ultraestructural a las mitocondrias del hígado lo que lleva al incremento de especies reactivas de oxígeno (EROS) debido a la ineficiencia en el acoplamiento de la oxidación con la fosforilación en la mitocondria, lo cual estimula la vía de la beta oxidación mitocondrial(34,12). La generación de EROS en la mitocondria puede tener consecuencias adversas adicionales como oxidación del ADN mitocondrial y aumento en la producción de TNF- α . Este incremento de EROS, se considera como el segundo golpe crítico en el desarrollo de la enfermedad. El estrés oxidante es el mecanismo clave responsable de la progresión del daño en HGNA y EHNA(29).

La EHNA se considera una etapa fundamental en la progresión de HGNA pues puede progresar a fibrosis, proceso que involucra la activación y transformación de células estelares a miofibroblastos, lo que conduce a la acumulación de colágeno y fibrosis(29,34). Si la proporción de tejido cicatricial reemplaza una porción significativa de los hepatocitos, la función del hígado puede verse afectada y provocar cirrosis y pérdida parcial de la función hepática(28,12).

La disfunción mitocondrial, también desencadena varios procesos procarcinogénicos: cambios en el metabolismo de los lípidos, cambios en las vías de crecimiento y desarrollo, y cambios en el sistema inmunitario, los cuales abordaremos brevemente, pues son los mecanismos asociados a la etapa terminal de la enfermedad(12).

1.4 Diagnóstico

La biopsia hepática es el estándar de referencia para diagnóstico de HGNA, en especial para el correcto diagnóstico de EHNA(35). Sin embargo, se asocia con limitaciones de sesgo asociadas a la correcta toma de muestra, la variabilidad intra-observador, su alto costo, el riesgo de complicaciones ya que se trata de un método invasivo y doloroso, lo que limita su uso generalizado(7,36).

Las pruebas no invasivas tienen el potencial de abordar las limitaciones asociadas con a la biopsia hepática. Se clasifican como pruebas no invasivas basadas en imagen o pruebas no invasivas basadas en sangre/suero, que puede diagnosticar a aquellos pacientes con un alto riesgo de esteatosis o fibrosis, pero con la gran limitante de no poder diferenciar entre esteatosis simple de esteatohepatitis no alcohólica. (7,37) La ecografía es la primera línea para el diagnóstico de HGNA recomendado por la asociación mexicana de gastroenterología, debido a su

costo y disponibilidad(36). En sujetos con obesidad y/o síndrome metabólico, la búsqueda de HGNA por ultrasonido o alteraciones en los niveles de enzimas hepáticas debe ser parte del examen de rutina. El ultrasonido evalúa la ecogenicidad del hígado, la esteatosis se caracteriza por aumento del brillo hepático en comparación con la corteza renal(38). El ultrasonido, es más confiable cuando el grado de esteatosis hepática se encuentra entre los grados moderado a severo, cuando la acumulación de grasa intrahepática es igual o menor al 20% la sensibilidad de la herramienta se ve muy comprometida(39).

La imagen de la fracción grasa por densidad protónica por resonancia magnética (MRI-PDFF), es otra prueba basada en imagen que proporciona una estimación cuantitativa de la esteatosis mediante la detección de protones. La fracción grasa se calcula como la relación entre la densidad de protones de los triglicéridos comparada con la densidad total de protones de triglicéridos y agua. MRI-PDFF es la herramienta más precisa para cuantificar el contenido de grasa, pero su uso está limitado en entornos clínicos debido a su alto costo(40-41).

La elastografía de transición (FibroScan®), es otro método de imagen para el análisis cuantitativo y la evaluación del riesgo de fibrosis y esteatosis, combinando dos técnicas: elastografía transitoria por vibración controlada y el parámetro de atenuación controlada(42). La velocidad de propagación de las ondas transversales de ultrasonido y la atenuación se miden a medida que pasan por el hígado para cuantificar la elasticidad tisular y la esteatosis(40-43).

Otra técnica de imagen para estimar la rigidez hepática (fibrosis) es la elastografía por resonancia magnética (MRE)(44,38). Es similar a la elastografía transitoria por vibración controlada pero esta técnica genera un mapa más fino de las zonas de elasticidad del hígado. La MRE es más precisa que las técnicas basadas en ultrasonido, pero tiene disponibilidad limitada por sus costos(45).

La fibrosis es el principal indicador pronóstico de la enfermedad para trasplante hepático y aumento de la mortalidad por estadios finales como carcinoma hepatocelular, un marcador de fibrosis comúnmente utilizado es la escala Fib-4, un indicador basado en un panel de datos clínicos ampliamente disponibles: edad del paciente, recuento de plaquetas y los niveles de aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa. La escala Fib-4 estratifica a los pacientes en grupos de bajo y alto grado de riesgo para fibrosis avanzada(46-47).

La escala mejorada de fibrosis hepática (ELF) es un panel de biomarcadores séricos utilizados para evaluar a pacientes con alto riesgo

de fibrosis y cirrosis. A diferencia de Fib-4, ELF utiliza biomarcadores específicos de recambio de la matriz extracelular: ácido hialurónico, inhibidor tisular de metaloproteinasas-1, propéptido amino-terminal del procolágeno tipo III. La elastografía y los biomarcadores son aceptables para descartar fibrosis avanzada y pueden combinarse para conferir diagnóstico más preciso. Sin embargo, no pueden diagnosticar el estadio de esteatohepatitis y el estadio fibrosis avanzada debe ser confirmado por biopsia hepática(48).

La biopsia hepática, a pesar de sus limitaciones, continúa siendo el estándar de oro, es la única herramienta clínica para el diagnóstico de esteatohepatitis no alcohólica cuyo hallazgo histológico de mayor impacto es la fibrosis hepática por su asociación con un incremento en la mortalidad por enfermedad hepática y a la necesidad de trasplante hepático(7).

1.5 HGNA y el microambiente

Durante la última década, el papel de los mecanismos genéticos y epigenéticos en la patogénesis de HGNA han sido cada vez más reconocidos. Al tratarse de un enfermedad compleja, silenciosa y multifactorial, el ambiente que rodea al hepatocito juega un papel importante en la historia natural de la enfermedad. Este microambiente se encuentra regulado por la influencia de la homeostasis y dinámica hormonal como por la dinámica genética gobernada por la epigenética de cada individuo. La epigenética y los mecanismos involucrados en la patogénesis del HGNA representan un área de investigación que se encuentra en profundo desarrollo, tanto por el impacto a largo plazo que implica en los sistemas de salud mundiales como por la exploración y desarrollo de biomarcadores, sobre todo para la identificación del estadio EHNA(49).

1.6 Epigenética.

La secuencia de ADN no es el único factor que determina la herencia y la expresión genética, la epigenética explica los mecanismos por medio de los cuales las células pueden expresar unos genes y silenciar otros, para conformar así sus características particulares, que posibilitan el desarrollo de organismos multicelulares al permitir la diferenciación de las células a partir de secuencias idénticas de ADN (50). Los mecanismos epigenéticos son procesos que involucran modificaciones químicas covalentes del ADN que persisten a través de la mitosis y la meiosis. Estas modificaciones en la estructura del ADN o “marcas” afectan la actividad transcripcional de los genes y una vez establecidas son relativamente estables haciéndolas heredables. (51) Estos cambios en la expresión génica implican cambios

en el fenotipo y pueden convertirse en factores de riesgo o susceptibilidad a enfermedades, como el HGNA.

Los mecanismos tradicionales de regulación epigenética incluyen metilación del ADN, modificaciones postraduccionales de histonas (proteínas encargadas de empaquetar el ADN) y diversas especies de ARN no codificantes (ncRNA). (51–53) Estos mecanismos regulan importantes aspectos de la homeostasis celular como reproducción, crecimiento, desarrollo entre otros, representando posibles respuestas celulares heredables a las señales ambientales en la ausencia de alteraciones detectables en la secuencia del ADN.(27,50,54–56)

1.7 MicroARNs.

Los ácidos ribonucleicos (RNA) no codificantes (ncRNA) representan una compleja red de factores que interactúan entre sí para modular la expresión génica. Entre los ncRNA se encuentran los microRNAs (miRNAs), ARN largos no codificantes (lncRNA) y ARN circulares (circRNAs), los cuales están involucrados en la regulación transcripcional a diferentes niveles.(57) En 2001 se reportó el rol de los ncRNAs en el desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans* que demostró la importancia en el control de la expresión génica de los miRNAs (58,59). Los miRNAs, como lo dice su nombre son fragmentos muy cortos de ARN de aproximadamente 19 a 25 nucleótidos, que tienen la capacidad de regular la expresión génica mediante interacciones con ARN mensajeros para inhibir su traducción o inducir su degradación (60-61). Los genes que generan los miRNAs están conservados evolutivamente y pueden estar situados dentro de intrones o exones de genes que codifican proteínas o en áreas intergénicas. La mayor parte de los miRNAs (intrónicos o exónicos) se orientan en paralelo con su gen anfitrión, lo que sugiere que se transcribe de forma simultánea, mientras que el grupo restante de miRNAs se transcribe de regiones intergénicas o de genes que componen unidades independientes de transcripción.(60)

Los miRNAs son moléculas que juegan un papel central en la regulación de diversos procesos celulares, como diferenciación, invasión y muerte celular; debido a esto, han generado un interés particular en determinar el rol que juegan en las enfermedades, sobre todo en aquellas enfermedades complejas sujetas a la influencia del medio ambiente. Se han identificado que los miRNAs juegan un papel clave en el control post-transcripcional dentro de las redes de regulación génica. (62-63)

1.8 Biogénesis de los microRNAs

Los miRNAs proceden de un transcrito de alrededor de 70 a 90 nucleótidos, que presenta la particularidad de tener una estructura de tallo

y asa, la cual es blanco de acción de la ARN polimerasa II, (aunque, reportes recientes indican que también puede ser procesada por la ARN polimerasa III) (60). Una estructura de tallo y asa es una secuencia de nucleótidos que son complementarios entre ellos y que, si las condiciones del medio circundante son las adecuadas, sufre un plegamiento formando una estructura de doble hélice que presenta complementariedad imperfecta en la secuencia, dejando un extremo 5' libre protegido por una 7-metilguanosina, y en el extremo opuesto una cola poli-(A) (61-64). Esta estructura recibe el nombre de pri-miRNA, el cual es modificado en el interior del núcleo por acción de la enzima RNAsa-II (Drosha) en conjunto con la proteína de unión a región crítica de doble cadena de ARN, (DGCR8) cuya acción catalítica da origen a una cadena más corta llamada precursor miRNA (pre-miRNA) de aproximadamente 70 nucleótidos, el pre-miRNA es transportado al citoplasma por medio del factor de exportación nuclear (Exportina-5/Ran-GTP). En el citoplasma el pre-miRNA se procesa por acción del complejo endonucleasa RNAsa III, Dicer-TRBP y la proteína Argonauta 2 (Ago2) para generar un miRNA de doble cadena de 17-25 pb. El miRNA duplex es procesado por la helicasa A quedando un miRNA maduro de cadena simple (60,61,64-66).

1.9 Mecanismos de control de la expresión génica de los miRNAs

Una vez en el citoplasma el miRNA maduro se incorpora al complejo proteico de silenciamiento inducido por RNA (RISC), como hebra guía del complejo que reconoce la región 3' no traducida (3'-UTR) del RNAm blanco, es mediante la complementariedad de las bases tanto del miRNA como del RNAm diana la que define el tipo de mecanismo por medio del cual se da el control de la expresión génica (67). La especificidad del miRNA está dada por la complementariedad de la secuencia entre los sitios de interacción del RNAm y la secuencia de nucleótidos de la posición 2-8 en el extremo 5' del miRNA, esta es conocida como "región semilla" (seed). Si la región semilla del miRNA presenta complementariedad perfecta, el complejo RISC actuara mediante la degradación del RNAm, por otro lado, si la secuencia de interacción de la región semilla con la secuencia del RNAm presenta complementariedad parcial, (4-6 nucleotidos) RISC actuara mediante la inhibición de la traducción del RNAm (68). En consecuencia, los niveles de proteína del gen objetivo se pueden ver reducidos, mientras que los niveles de RNAm pueden o no estar disminuidos. En los seres humanos, los miRNAs principalmente actúan inhibiendo la traducción de proteínas de los genes blanco (67-69).

1.10 miRNAs y enfermedades hepáticas.

En la última década, el número de genes humanos que se sabe son regulados por miRNAs ha aumentado rápidamente, varios reportes han demostrado la existencia de patrones de expresión diferencial asociados a

diversos tipos de cáncer (49,70). Los RNAm que son reconocidos por los miRNAs, pueden ser monogénicos o poligénicos (multifuncionales) lo que demuestra que tienen una capacidad reguladora considerable y un profundo impacto en la salud y la enfermedad, incluso varios miRNAs pueden reconocer e interactuar con un mismo RNAm (fenómeno conocido como redundancia), y de esta manera regular la expresión génica de una forma estricta. (69)

El papel de los miRNA como moléculas reguladoras de diferentes mecanismos críticos para el desarrollo de HGNA, como la resistencia a la insulina y sus alteraciones post-receptor, así como la regulación de la síntesis de *Novo* de ácidos grasos como la exportación de estos dentro del hepatocito se han explorado en diferentes modelos experimentales (71-72). El miR-122 es el miRNA hepático más abundante y estudiado, representa el 70% del total de los miRNA hepáticos y está involucrado en la proliferación y maduración de los hepatocitos al estimular la expresión de aproximadamente 24 genes específicos, incluido el factor 6 nuclear del hepatocito (HNF6) (73). Interactúa con numerosos genes implicados en el metabolismo de los lípidos y el colesterol. Los niveles circulantes de hsa-miR-122 se correlacionan con los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) en pacientes con HGNA y son un mejor indicador de la gravedad de la EHGNA que los marcadores clásicos de la función hepática, incluidos el aspartato aminotransferasa (AST) y la citoqueratina-18 (CK-18)(74-75). La inhibición del miR-122 con oligonucleótidos anti sentido en ratones, disminuye la síntesis de ácidos grasos y colesterol, así como la oxidación de ácidos grasos hepáticos, lo que disminuye los niveles de colesterol plasmático. Los ácidos grasos saturados aumentan los niveles circulantes de miR-122 y reducen sus niveles intrahepáticos.(76-77)

Por otro lado, el miR-33a y el miR-33b se co-transcriben con la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1 (SREBP1) y SREBP2, que son reguladores de la lipogénesis de *Novo* y la biosíntesis de colesterol (78). Se han relacionados con la represión del miembro 1 del transportador del casete de unión a ATP de la subfamilia de transportadores humanos (ABCA1), que es esencial para la síntesis de HDL a través de la regulación de la unión de ApoA1 y colesterol, por lo tanto, contribuyen a la modulación de las vías del metabolismo de los ácidos grasos y el colesterol (79). La inhibición de estos miRNAs aumenta la sensibilidad a la insulina, la β -oxidación y los niveles circulantes de HDL, así como la reducción de la acumulación de lípidos en las placas arteriales en modelos *in vitro* e *in vivo*, por lo que se proponen como posibles dianas terapéuticas no solo para la HGNA sino también para el manejo del síndrome metabólico (80).

El miR-21 es otro de los miRNAs que más ha sido estudiado en modelos de EHNA-fibrosis (81). La actividad del miR-21 aumenta en ratones

alimentados con una dieta rica en grasas; sin embargo, la eliminación del miR-21 induce la transcripción de p53, lo que reduce la expresión de genes que regulan la lipogénesis y el ciclo celular. (82) En el HGNA, el miR-21 regula los niveles de triglicéridos, colesterol libre y colesterol total, a través de la inhibición de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCR). Por otro lado, la elevación del miR-21 inhibe a la proteína de unión a ácidos grasos 7 (FABP7) la cual induce la captación de ácidos grasos y la acumulación de lípidos dentro del hepatocito (83). El miR-21 también se dirige al homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), que altera la fosforilación de la cinasa de adhesión focal y la expresión de las metaloproteasas de matriz 2 y 9, ambos mediadores del crecimiento, la migración e invasión celular, que son características fenotípicas de las células malignas. El miR-21 también disminuye la expresión del receptor alfa activado por el proliferador de peroxisomas alfa (PPAR α) que induce inflamación y progresión de fibrosis (84).

Otro miRNA asociado al HGNA es el mir-192, se ha demostrado que una disminución en sus niveles está asociada con la acumulación de lípidos hepáticos inducida por bisfenol A como resultado de la regulación positiva de SREBP1, debido al procesamiento defectuoso de DROSHA (85). Además, el miR-23b es capaz de inhibir la expresión de la sirtuina 1, una desacetilasa dependiente de NAD, lo que da como resultado la deposición de TG en el citoplasma (86). El miR-26a aumenta la apoptosis celular y la sobrecarga de triglicéridos y colesterol debido a un aumento en su metabolismo (87). El miR-34a inhibe la secreción hepática de VLDL y promueve la esteatosis a través de la interacción con HNF4 α en pacientes con EHNA (88,89). Por otra parte, el miR-451a es capaz de regular la expresión de la proteína de respuesta a la hormona tiroidea 14, que tiene un papel fundamental como regulador negativo de la lipogénesis de *Novo*(90), mientras que el miR-378 ejerce una acción adversa sobre la expresión de Nrf-1, la cual regula el metabolismo de los lípidos (91). La inhibición del miR-375 aumenta la expresión de adiponectina, previene la acumulación de lípidos intracelulares y disminuye los niveles de leptina y citocinas inflamatorias (92). Los miR-190b, miR-27a, miR-194 y miR-181b se han denominado reguladores negativos implicados en el desarrollo de HGNA, ya sea por ser inductores de la síntesis de ácidos grasos de *Novo* o por inducir resistencia a la insulina (93–97).

Respecto a la resistencia a la insulina asociada a HGNA, actualmente se han reportado varios miRNAs que modulan el metabolismo de la glucosa, así como la resistencia a la insulina; la familia miR-29 y miR-122 se han asociado como inductores de la resistencia a la insulina relacionada con el HGNA (98). El miR-33 es capaz de inhibir la gluconeogénesis mediante la activación del fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PCK1) y la glucosa-6-fosfatasa (G6PC), alterando la homeostasis de la glucosa e induciendo un

incremento de ácidos grasos hepáticos (78,80,99). Por otro lado, el miR-375 regula la homeostasis de la glucosa, algunos informes lo asocian con niveles elevados en pacientes con EHNA en comparación con pacientes con esteatosis simple (100,101). El miR-30b está elevado en ratas con resistencia a la insulina e HGNA, y se demostró que es un regulador del Ca^{+2} -ATPasa2b del retículo endoplasmático (102).

Algunos miRNAs han sido asociados como mediadores de progresión de la enfermedad debido a su relación con moléculas inflamatorias, el miR-34a es el regulador de la Sirtuina-1 (SIRT1), proteína miembro de la familia de sirtuinas de histonas/proteínas deacetilasas (HDAC) dependiente de NAD, cuyo papel en la desacetilación de los factores de transcripción Foxo3 y el receptor huérfano gamma similar al receptor de ácido retinoico tímico (ROR γ t), puede promover la producción y las funciones de las células reguladoras T de y al mismo tiempo disminuir la diferenciación de las células proinflamatorias Th17 (88,103). El silenciamiento del miR-34a restaura la expresión de SIRT-1 y el receptor alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR α), lo que resulta en una mejora de la esteatosis (103). Por el contrario, la inducción del miR-34a está relacionada con mayor actividad proinflamatoria de las células B activadas (104). El miR-155 es otro miRNA proinflamatorio relacionado a la inmunidad innata y adaptativa en el HGNA, ya que está elevado en hepatocitos y células de Kupffer de modelos *in vivo* alimentados con una dieta deficiente en metionina (105). El miR-140 se ha asociado a una mayor actividad inflamatoria a través de la vía TLR4/NF κ B, que promueve la progresión del HGNA y el desarrollo de fibrosis (106). Por otro lado, el miR-223 se ha propuesto como parte del conjunto maestro que regula la función del inflammasoma; estudios recientes han demostrado que la expresión de miR-223 está desregulada en varias enfermedades hepáticas, incluidas las infecciones por hepatitis viral, el daño hepático inducido por el alcohol o las drogas, la enfermedad del hígado graso no alcohólico, la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (107).

Generalmente, los miARNs se unen a proteínas, principalmente AGO 2 o lipoproteínas de alta densidad (HDL), evitar su degradación por acción de las ARNasas circulantes (108). La liberación de los miRNAs a la circulación puede ocurrir a través de un proceso activo por liberación de microvesículas celulares (exosomas) o por un proceso pasivo durante la muerte celular. Por ejemplo, se ha demostrado que el miR-122, específico del hígado se encuentra principalmente en los exosomas derivados de lesión hepática alcohólica y no alcohólica, mientras que, en la lesión hepática tóxica inducida por paracetamol, la mayor parte del miR-122 se une a las proteínas (77,109).

Los perfiles de expresión de los miRNAs presentan niveles consistentes y reproducibles que los hace cuantificables, lo que las convierte en importantes dianas para encaminarnos hacia una medicina personalizada (principalmente en el campo de la oncología) y como potenciales biomarcadores para el diagnóstico clínico y posibles dianas terapéuticas (110). La hipótesis de la existencia de un perfil de expresión diferencial de miRNAs y el papel de la epigenética dentro de la complejidad de la enfermedad actualmente es un área de investigación que se encuentra en constante desarrollo.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, la pandemia de obesidad y la alta incidencia de HGNA, obligan tanto a la comunidad científica como a los gobiernos mundiales a llevar a cabo investigaciones que nos permitan comprender de una manera clara la fisiopatología de esta enfermedad y explorar a detalle el papel de todos los factores de riesgo que han sido asociados a esta patología hepática, incluyendo el impacto de los mecanismos epigenéticos y sus alteraciones. Investigar el papel de los miRNA nos permitió obtener información relevante para el entendimiento de la fisiopatología de esta enfermedad y al mismo tiempo explorarlos como posibles herramientas de diagnóstico, pronóstico o terapéutico.

Es importante hacer investigación relacionada a la enfermedad de hígado graso no alcohólico y los miRNA en distintas poblaciones debido a que la expresión de estas moléculas esta influenciada por factores ambientales, la búsqueda de un perfil de expresión o inclusive de un único miRNA común en la mayoría las poblaciones con HGNA es explorado actualmente por consorcios como el LITMUS de la unión europea.

2.2. JUSTIFICACION

México es uno de los países con altas tasas de incidencia de HGNA, si la tendencia continua, las complicaciones derivadas de esta enfermedad pueden comprometer las funciones del sistema de salud nacional. Con esta investigación se busca identificar el perfil de expresión de los microRNAs asociados al HGNA y EHNA, y sus posibles mecanismos de regulación, lo cual impactaría en el diagnóstico y manejo de la enfermedad.

2.3 PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuáles son los microRNAs desregulados en pacientes con HGNA y pacientes con EHNA comparados con pacientes sin la enfermedad, que posiblemente determinan el daño de la enfermedad?

2.4. HIPOTESIS

H1: “Existen un perfil de expresión diferencial de miRNA en pacientes con HGNA y pacientes con EHNA comparados contra un grupo control sin HGNA que determinan la progresión de la enfermedad y el daño hepático”

Ho: “No Existen un perfil de expresión diferencial de miRNA en pacientes con HGNA y pacientes con EHNA comparados contra un grupo control sin HGNA que determinan la progresión de la enfermedad y el daño hepático ”

2.5 OBJETIVOS

General:

Determinar el perfil de expresión diferencial de los miRNAs en pacientes con HGNA y pacientes con EHNA comparados con un grupo control sin la enfermedad.

Específicos:

1. Determinar la expresión de microRNAs en tejido hepático de pacientes sin HGNA y pacientes con HGNA y pacientes con EHNA por medio de un análisis de microarreglos.
2. Validar el perfil de expresión de los miRNAs obtenidos por microarreglos, basados en ensayos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) de tejido hepático.
3. Determinar los potenciales blancos de interacción-regulación de los microRNAs del perfil de expresión diferencial por medio de herramientas bioinformáticas.

2.6 Diseño metodológico

- a) Manipulación por el investigador: Estudio Observacional.
- b) Por seguimiento del paciente a través del tiempo: Estudio Transversal.
- c) Direccionalidad en la obtención de la información: Prolectivo
- d) Por búsqueda de asociación entre variables: Comparativo

Se trata de un estudio observacional, transversal, prolectivo y comparativo entre los grupos casos y controles.

2.7 Tamaño de la muestra

El universo estudiado se trató de pacientes que se sometieron a colecistectomía electiva programada (por previo diagnóstico de coleditiasis) y que aceptaron participar en la investigación provenientes del

servicio de cirugía hepato-pancreato-biliar del Hospital General de México Eduardo Liceaga.

El tamaño de muestra no probabilística, por disponibilidad para un estudio clínico de casos y controles para los ensayos de detección de microRNAs por microarreglos y para la validación por qRT-PCR, fue de un tamaño de 10 pacientes para el grupo controles (sin HGNA) vs 20 pacientes casos (10 pacientes para el grupo HGNA y 10 pacientes para el grupo EHNA). Se considerará el 10% de pérdidas debido a lo expuesto en la sección 5 del FAEP.

2.8 Criterios de Selección

Inclusión:

- Que acepten participar en el protocolo de investigación con la firma del consentimiento informado por escrito
- Hombres y mujeres mayores de 18 años y menores de 60 años
- Que se sometan a colecistectomía laparoscópica electiva y acepten la obtención de biopsia hepática
- Que llenen el cuestionario AUDIT-CAGE

Exclusión:

- Presentar infección por VHB/VHC
- Que presenten alguna hepatopatía previa conocida
- Que su consumo de alcohol sea mayor a 30g por semana (en caso de sexo masculino) o mayor a 20g por semana (en caso de sexo femenino)

Eliminación

- Que quiera salir del protocolo de investigación

2.9 Descripción de Procedimientos

Se reclutaron pacientes programados a cirugía electiva en el servicio de cirugía de la unidad hepato-pancreato-biliar del Hospital General de México, Eduardo Liceaga. Se les explicó el estudio y, una vez que aceptaron participar, se les solicitó firmar el consentimiento informado para la obtención de biopsia hepática transoperatoria y muestra de sangre periférica. Previo a la cirugía se les realizó una elastografía hepática de transición de vibración controlada (VCTE), o ultrasonido abdominal con evaluación del hígado. Se descartó la presencia de otras hepatopatías, tales como virales, autoinmunes, toxicológicas, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, así como que la ingesta de alcohol no fuese superior a 20g diarios en mujeres y 30g diarios en hombres por medio del cuestionario de evaluación para la detección de desórdenes asociados al abuso de consumo de alcohol (AUDIT).

2.9.1 Evaluación clínica

Las variables antropométricas como edad (años), peso (Kg) antecedentes personales no patológicos y patológicos (Diabetes Mellitus tipo 2(DM2), Hipertensión Arterial Sistémica (HAS), Dislipidemia) se obtuvieron por interrogatorio directo o se obtuvieron de su expediente clínico. Con la muestra sanguínea, la cual se centrifugó a 1500 rpm para extraer el suero fueron determinados los siguientes marcadores bioquímicos: alanino-amino transferasa (ALT), aspartato-amino transferasa (AST), gammaglutamil transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (FA), albúmina, colesterol total (CT), triacilgliceridos (TG), citoqueratina-18 (CK-18), apolipoproteína-B (APO-B), interleucina 6 (IL-6), interleucina 32 (IL-32) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Todos los pacientes reclutados durante el interrogatorio directo confirmaron que nacieron en México y que sus 2 generaciones inmediatas anteriores también.

2.9.2 Elastografía de transición con vibración controlada (VCTE)

La elastografía de transición se realizó con el Fibroscan® Touch 502 (Echosense, Francia) con un mínimo de 4 horas de ayuno, con la sonda M o XL. El paciente se colocó en decúbito supino con el brazo derecho en aducción y la mano debajo de la cabeza; el resto de las extremidades extendidas. A continuación, se trazó una línea imaginaria entre la apófisis xifoides y la línea medio clavicular, sobre la que se buscó un espacio intercostal óptimo, y se colocó el transductor. El estudio se completó con las siguientes características: al menos diez mediciones válidas, 60% de éxito (medidas válidas/medidas no válidas) y el rango intercuartílico/mediano fue del 30%. Se obtuvo la mediana del Parámetro de Atenuación Controlada (CAP) en decibels por metro dB/m, la mediana de la rigidez hepática en kPa y el rango intercuartílico. Se determinó el grado de esteatosis según el CAP, cortes donde S0: <232 dB/m, S1: 232-256 dB/m, S2: 257-290 dB/m, S3: \geq 290 dB/m, y el grado de fibrosis hepática fue determinado según LSM, donde F2 \geq 7,0 kPa, F3: \geq 8,7 kPa, F4: \geq 10,3 kPa. (111)(112)

2.9.3 Biopsia hepática transoperatoria

Las biopsias de hígado fueron obtenidas por proceso transoperatorio durante la colecistectomía. Proviene del lóbulo hepático derecho con un tamaño aproximadamente de 0.5-1.0 cm³. Una porción se fijó con formalina y se incluyó en parafina para posteriormente ser sometidas a procesos de tinción con hematoxilina-eosina y tricromica de Masson. Dos patólogos expertos evaluaron de forma independiente las muestras sin

conocer los datos clínicos de los pacientes. En caso de discordancia en los resultados un tercer patólogo fue invitado a revisar los resultados para determinar el tipo de paciente. La escala de actividad de hígado graso no alcohólico (NAS) fue utilizada para el reporte los tres parámetros semicuantitativos, que se suman para obtener una puntuación de 0 a 8 puntos: esteatosis según el porcentaje de hepatocitos con vesículas de lípidos (grado 0: <5%, 1: 5-33%, 2:33 –66% y 3:> 66%), inflamación lobulillar medida en focos por campo (grado 0: ninguno, 1: <2, 2: 2-4, 3: >4), balonización de los hepatocitos (grado 0: ninguno, 1: pocas células, 2: muchas células). También se evaluó la fibrosis hepática (grado 1: perisinusoidal o periportal, 1A: fibrosis perisinusoidal leve en zona 3, 1B: fibrosis perisinusoidal moderada en zona 3, 1C: solo fibrosis portal/periportal, 2: fibrosis perisinusoidal en zona 3, con fibrosis portal/fibrosis periportal, 3: puentes de fibrosis, 4: cirrosis) (113). Una segunda porción de la biopsia se embebió inmediatamente el reactivo All Protect (Qiagen, EE.UU) para estabilizar y proteger tanto proteínas como ácidos nucleicos y se almacenó en ultracongelación a -70°C.

2.9.4 Extracción de RNA

RNA total fue extraído del tejido hepático siguiendo el protocolo de extracción del reactivo TRIzol (Invitrogen, EE. UU.) y cloroformo. Después de ello, la calidad, pureza y concentración de los ácidos nucleicos fueron determinados por medio del bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologie, China).

2.9.5 Ensayo por microarreglos

Para determinar el perfil de expresión diferencial de miRNAs, se extrajo RNA total de 32 biopsias hepáticas que fueron seleccionadas basadas en su histología y clasificadas en los grupos “HGNA” (n=12), “EHNA” (n=10) y “Control” (n=10), para ser analizadas por medio de ensayo por microarreglos. Se utilizó el microarreglo GeneChip microARN 4.0 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) para analizar 2588 sondas de miRNA basados en miRBase (release 21).

A las muestras de RNA se les incorporó una cola de poli-A en el extremo 3', seguido de una reacción de biotilación. Cada muestra de RNA marcada con biotina se hibridó en la matriz del microarreglo y se detectó con el conjugado Avidina-Estreptavidina-Ficoeritrina. El chip se sometió a un proceso de hibridación a 48°C con rotación de 60 rpm durante 16 horas. Posterior a ello, se realizaron los pasos de lavado y teñido para finalmente, analizar el GeneChip.

2.9.6 Ensayo cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real acoplado a transcripción reversa

Para validar la expresión diferencial del perfil, se aisló RNA total de 30 biopsias hepáticas de los grupos etiquetados como control (10), HGNA (10) y EHNA (10). Se realizó el ensayo de transcripción reversa utilizando los reactivos de microARN TaqMan (Applied Biosystems, USA); agregando el RNA pequeño nucleolar RNU-48 como control interno. Para la validación del perfil de microRNA se utilizó el kit Taqman Universal MasterMix NO UNG y las sondas Taqman para cada uno de los microRNA seleccionados del perfil, los cuales fueron: hsa-miR-122-3p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-148-5p, hsa-miR-3064-5p, hsa-miR-3148 (Applied Biosystems, USA). El ensayo se realizó por triplicado y la cantidad relativa de cambio de cada microRNA se calculó utilizando la ecuación $2^{-(\Delta CT)}$, donde $\Delta CT = Ct(\text{miRNA HGNA} - CtRNU48\text{-HGNA}) - Ct(\text{miRNA Control} - CtRNU48\text{-Control})$ y $(\text{miRNA EHNA} - CtRNU48\text{-EHNA}) - Ct(\text{miRNA Control} - CtRNU48\text{-Control})$. Con ello calculamos la tasa de cambio, y el valor p.

2.9.7 Análisis de enriquecimiento

Los datos obtenidos en el ensayo de microarreglos se analizaron mediante el software Transcriptome Analysis Console (TAC) (Affymetrix), tanto para los procesos de normalización y el control de calidad de la señal de datos, como para la determinación de los microRNAs desregulados, y con ello establecer el perfil de expresión diferencial.

Las condiciones utilizadas en el programa TAC fueron las siguientes:

- a) Tasa de cambio (Fold Change) = ≥ 2 ó ≤ -2
- b) Valor p (P value) = ≤ 0.001
- c) Tasa de descubrimientos falso (FDR p-value) = ≤ 0.05 , para controlar el efecto del tamaño de muestra pequeño.

Los cinco microRNAs con la mayor tasa de cambio (FC) (positiva o negativa) obtenidos en el análisis de expresión diferencial se utilizaron para el análisis de enriquecimiento; y con ello inferir los potenciales blancos de regulación de estos microRNAs y sus posibles implicaciones en la enfermedad.

El primer paso del análisis consistió en identificar los posibles genes de interacción de los microRNAs, basados en los sitios de reconocimiento de la región semilla, utilizando el software libre MIENTURNET(114). Para

determinar los blancos genéticos validados la herramienta TarBase (v.8)(115), fue utilizada bajo los siguientes parámetros: un p-valor ≤ 0.01 y un FDR p valor: ≤ 0.05 .

Para el análisis de enriquecimiento funcional nos basamos en los genes identificados del software Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems Inc., USA), fue empleado bajo las condiciones:

1. gene expression fold change of -1.5 to +1.5
2. p value ≤ 0.01 ”.

2.9.8 Inmunoensayos enzimáticos

Exploramos el perfil bioquímico de los marcadores serológicos citoqueratina-18 (CK-18), apolipoproteína B (APO-B), interleucina-6 (IL-6), interleucina-32 (IL-32), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a) por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) siguiendo las instrucciones del kit (R&D systems, Minneapolis, MN), utilizando suero de pacientes de los grupos HGNA, EHNA y control.

2.9.9 Plan de análisis estadístico

Las variables bioquímico-clínicas de los grupos, fueron analizadas utilizando el software SPSS para Macintosh v24.0 (IBM, EE. UU.). Las variables categóricas cualitativas se describen mediante frecuencias y porcentajes. Las variables cuantitativas se describen mediante la media y desviación estándar, medianas o porcentaje dependiendo de su distribución poblacional que fue determinada mediante la prueba de Kolmogorv Smirnov (K- S).

Para establecer la correlación entre las variables las prueba de de correlación de Pearson y Spearman se utilizaron. Para determinar diferencias entre las medias la prueba T-student fue aplicada para variables cuantitativas con un comportamiento paramétrico, mientras que para las variables con una distribución no paramétrica y variables cualitativas la prueba U-Mann-Whitney o Chi cuadrada fueron utilizadas. Para el análisis de grandes de datos como los microarreglos, PCR en tiempo real y análisis de enriquecimientos la pruebas de igualdad de varianzas, se basaron en estadística de tipo bayesiana. La significancia estadística se definió como $p \leq 0,05$.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Características epidemiológicas de la cohorte.

Un total de 117 pacientes se logró con éxito la obtención de la biopsia hepática, proveniente del lóbulo hepático derecho (0.5-1.0cm³).

El 77.7% (n=91) de la cohorte de pacientes fueron mujeres y el 22.2% (n=26) fueron hombres. La edad promedio de la población en el estudio fue 42.65 (\pm 12.6) años, en términos de peso corporal el promedio fue 70.1 (\pm 12.86) Kg, el IMC promedio fue 27.9 (\pm 4.29) Kg/m².

La prevalencia de HGNA en este estudio se calculó utilizando la siguiente fórmula: % De prevalencia = (número de casos encontrados) / (muestra total). Las biopsias hepáticas de los 117 pacientes muestran una prevalencia general de HGNA de 71.7%, donde el 87.5% de este grupo presentó un IMC mayor a 25kg/m². Del total de los pacientes de la cohorte, el 77.8% fueron mujeres, y de los casos con HGNA, el sexo femenino representó el 84.4%.

33 pacientes (28.2%) no presentaron anomalías microscópicas en la biopsia hepática y conformaron el grupo control, su media de edad fue de 42.5(\pm 5.6) años, con un peso corporal de 69.6(\pm 5.52) Kg, un IMC de 26.8(\pm 2.6) Kg/m² y el 75.76% (n = 25) fueron mujeres. Los pacientes en estadio de esteatosis simple representaron el 54.7% (n=64), y conformaron el grupo HGNA con una edad promedio de 43 años, un peso corporal de 70.1(\pm 7.13) Kg, un IMC de 27.9(\pm 1.8)Kg/m² y el 77.7% (n=50) fueron mujeres. Finalmente, los pacientes con EHNA fueron el 17% (n=20) de la población, con una mediana de edad de 40 años, un peso corporal de 75.9(\pm 6.52) Kg, un IMC de 30.0(\pm 1.6) kg/m² y el 81.82% (n= 16) fueron mujeres. El resto de las características bioquímicas de los pacientes se resumen en la Tabla 1. Solo el IMC y los parámetros de la elastografía de transición fueron diferentes entre los grupos.

Tabla 1. Características antropométricas y bioquímicas de la cohorte de pacientes del estudio.

	Grupo Control (n= 33)	Grupo HGNA (n= 64)	Grupo EHNA (n= 20)	Valor "p"
Edad (Años)	42.5(±5.6)	43(±2.5)	40(±3.1)	0.221
Peso (Kg)	69.6(±5.52)	70.1(±7.1)	75.9(±6.52)	0.01
Índice de masa corporal (Kg/m²)	26.8(±2.6)	27.9(±1.8)	30(±1.6)	0.01
Glucosa en ayuno (mg/dL)	95.4(±8.3)	99(±8.6)	100.4(±5.8)	0.316
Triglicéridos (mg/dL)	177.7(±9.5)	178.1(±12)	189.5(±22)	0.9
Colesterol total (mg/dL)	184.6(±10.8)	193.3(±5.8)	189.1(±8.8)	0.862
Alanina aminotransferasa (ALT) (U/L)	24.3(±2.4)	29.7(±7.2)	33.7(±29.2)	0.684
Aspartato aminotransferasa (AST) (U/L)	24.3(±3.0)	24.4(±3.9)	27.4(±8.3)	0.953
Gamma-glutamil transferasa (GGT) (U/L)	33.8(±3.5)	40.9(±5.7)	39.8(±1.3)	0.262
Lactato deshidrogenasa (LDH) (U/L)	179.2(±10.5)	180(±3.1)	184.1(±9.1)	0.17
Fosfatasa Alcalina (FA) (U/L)	73.7(±8.8)	72.36(±4.4)	76.23(±10.4)	0.521
Albumin (mg/dL)	4	4.3	4.2	0.684
Parámetro de atenuación controlada (DB/s)	142 (±2.4)	333.7 (±4.1)	353.7 (±1.1)	0.001
Rígidez hepática (skPa)	4.9 (±0.4)	5.2 (±0.2)	6.1 (±0.3)	0.04
CK-18 (pg/mL)	104.1 (±17.5)	230.2(±247.7)	128.9(±172.5)	0.001
APOB (ng/mL)	2941.8 (±1386.7)	3599.8(±1093.4)	2567.7 (1266.8)	0.61
IL-6 (pg/mL)	28.2 (±9.9)	31.3(±27.8)	22.6(±5.5)	0.89
IL-32 (pg/mL)	1291.1 (±496.9)	1348.4(±683.2)	8013.6768(±100 007.4)	0.03
TNF-α (pg/mL)	119.4 (±28.1)	111.8(±22.5)	127.4(±37.4)	0.21

No se encontró asociación entre la colelitiasis y el HGNA, el valor Rho del análisis de correlación entre las características histológicas de las biopsias para el diagnóstico de HGNA fue de 0.23 y el índice Kappa para concordancia entre los valores de los índices predictivos fue de 0.22. Estos datos forman parte de una publicación derivada de esta tesis (116).

3.2 Histologías hepáticas

Los resultados de los análisis patológicos de los tejidos hepáticos que fueron diagnosticados con HGNA, se observa acentuada esteatosis predominantemente macrovesicular (figura 2-B y 2-F), sin la presencia de infiltrado inflamatorio lobulillar. Las muestras de tejido clasificadas como esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) presentan prominente esteatosis de tipo macrovesicular, infiltrado inflamatorio linfocitario y balonización focal de hepatocitos con presencia de cuerpos de Mallory-Denk.(figura 2-C y 2-G). Los estadios de progresión más severa que implica la presencia de fibrosis, distorsión arquitectural, esteatosis leve, acentuado infiltrado inflamatorio y fibrosis acentuada pericelular y periportal, con formación de puentes. (figura 2 E-H).

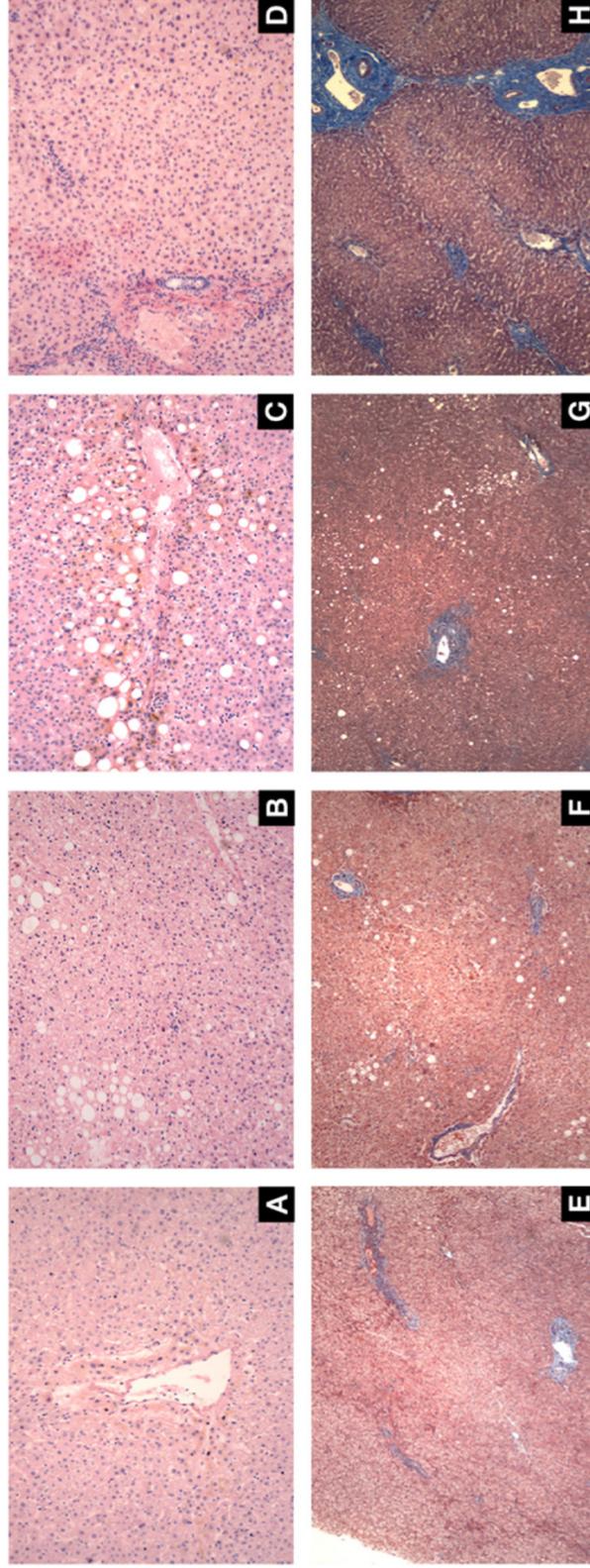


Figura 2. Representaciones histológicas de hígados humanos. A) Imagen representativa de tejido hepático morfológicamente normal. Hepatocitos normotípicos separados por sinusoides hepáticos; que rodean un espacio porta. No se reconoce esteatosis ni infiltrados inflamatorios. B) Hígado con HGNA, tejido hepático con esteatosis predominantemente macrovesicular. C) Hígado con EHNA, tejido hepático con prominente esteatosis de tipo macrovesicular, infiltrado inflamatorio, balonización focal de hepatocitos. D) Hígado con fibrosis, tejido hepático con distorsión arquitectural, esteatosis leve, acentuado infiltrado inflamatorio y fibrosis. Las microfotografías de A a D son tejidos teñidos con H&E. Ampliación original 100X. E) Hígado sin esteatosis, F) Hígado con HGNA (esteatosis simple), G) Hígado con EHNA H) Hígado con fibrosis acentuada pericelular, periportal y con formación de puentes.

3.3 Ensayo de expresión diferencial de microRNAs

En cuanto al perfil de expresión diferencial del grupo HGNA, veinticinco miRNAs se encontraron desregulados, de estas 23 moléculas presentaron una desregulación positiva, y solo 2 se encontraron desregulados negativamente. Los 25 microRNAs que conforman el perfil de expresión diferencial para los pacientes con HGNA se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. MicroRNA desregulados en HGNA			
microRNA	Tasa de cambio	Valor-p	Valor- p FDR
hsa-miR-122-3p	9.09	1.64E-05	0.006
hsa-miR-140-5p	5.83	8.04E-06	0.0044
hsa-miR-200a-3p	4.75	8.58E-05	0.0109
hsa-miR-148b-3p	4.4	4.36E-06	0.0028
hsa-miR-148a-5p	4.17	0.0001	0.0128
hsa-miR-19a-3p	4.01	5.33E-05	0.0098
hsa-miR-3607-5p	3.97	2.80E-06	0.0027
hsa-miR-22-5p	3.96	7.99E-05	0.0104
hsa-miR-455-5p	3.81	4.58E-06	0.0028
hsa-miR-4686	3.8	0.0001	0.0129
hsa-miR-29c-3p	3.61	1.20E-05	0.0053
hsa-miR-505-3p	3.24	4.13E-05	0.0098
hsa-miR-29c-5p	3.24	7.71E-05	0.0104
hsa-miR-1185-1-3p	3.15	0.0003	0.0258
hsa-miR-628-3p	2.76	0.0001	0.0133
hsa-miR-203a	2.64	1.06E-05	0.005
hsa-miR-30c-2-3p	2.51	0.0006	0.0476
hsa-miR-484	2.47	2.34E-05	0.0078
hsa-miR-30b-5p	2.37	5.93E-05	0.0098
hsa-miR-148a-3p	2.31	4.52E-05	0.0098
hsa-miR-30e-3p	2.26	2.35E-05	0.0078
hsa-miR-5589-5p	2.24	0.0006	0.0476
hsa-miR-128-3p	2.15	0.0005	0.0406
hsa-mir-6089-1	-2.08	0.0002	0.0164
hsa-mir-6089-2	-2.08	0.0002	0.0164

En la figura 3-A, se presenta el mapa de calor que muestra los resultados del análisis de grupos jerárquico realizados con la herramienta TAC y la expresión diferencial de los miRNA del tejido hepático del grupo HGNA comparado contra el grupo Control. La correlación en la expresión de los miRNAs evaluados en el microarreglo varía de >6 (valor más alto, en rojo)

$a < 0.7$ (valores más bajos, en azul). Los datos fueron normalizados, se utilizaron distancias euclidianas de disimilitud con el método de amalgamación de Ward. Mientras que la figura 3-B es la representación en gráfica de volcán del análisis de expresión diferencial de miRNA comparando tejido hepático de pacientes del grupo HGNA versus tejido hepático del grupo de pacientes Control. Los puntos rojos y verdes marcan los miRNAs con una expresión significativamente mayor o menor respectivamente, entre el grupo HGNA en comparación con las muestras control (FDR <0,01). El eje X muestra cambios (log2fold) en la expresión y el eje Y las probabilidades logarítmicas de que estos miRNAs se expresen diferencialmente.

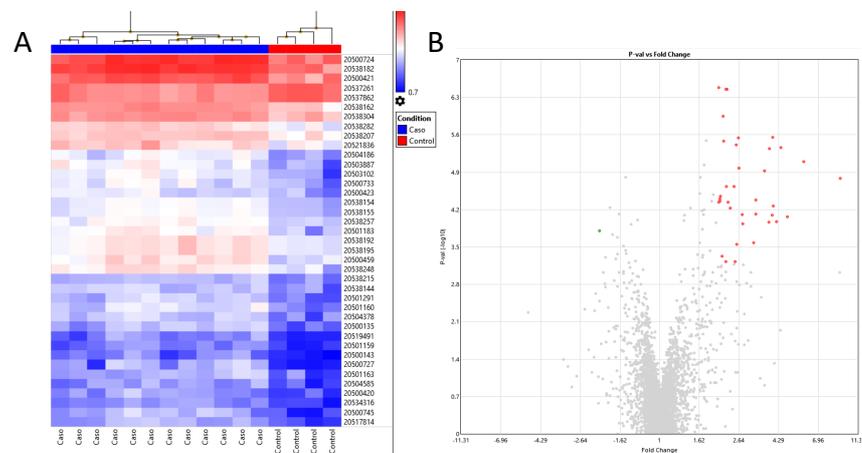


Figura 3. Perfil de expresión diferencial de microRNAs comprando RNA de tejido hepático de pacientes con esteatosis hepática simple contra sujetos sin esteatosis. Veinticinco moléculas se encuentran desreguladas, la gran mayoría de ellos con una tasa de cambio mayor a +3.

En cuanto al ensayo por microarreglos de los pacientes con el diagnóstico de esteatohepatitis no alcohólica, 21 microRNAs fueron identificados como moléculas desreguladas, la tabla 3 muestra las tasas de cambio de cada uno de estos microRNAs, cabe destacar que todos los elementos desregulados presentaron valores negativos en la tasa de cambio.

Tabla 3. MicroRNA desregulados en EHNA			
microRNA	Tasa de cambio	Valor-p	Valor- p FDR
hsa-miR-297	-21.77	1.23E-05	0.0063
hsa-miR-3064-5p	-21.68	1.12E-05	0.0063
hsa-miR-3148	-21.58	3.09E-07	0.0005
hsa-miR-7844-5p	-19.6	2.24E-07	0.0005
hsa-miR-3149	-12.83	2.24E-07	0.0024
hsa-miR-18a-5p	-3.09	0.0142	0.4421

hsa-miR-93-3p	-2.86	0.0107	0.4192
hsa-miR-30b-5p	-2.61	0.0212	0.4813
hsa-miR-362-5p	-2.6	0.0245	0.4952
hsa-miR-500a-5p	-2.6	0.012	0.4226
hsa-miR-30a-3p	-2.59	0.0107	0.4192
hsa-miR-23b-5p	-2.57	0.008	0.3941
hsa-miR-106b-5p	-2.5	0.0047	0.3215
mgh28S-2409	-2.5	0.0318	0.5225
hsa-miR-192-3p	-2.45	0.0417	0.5524
hsa-miR-27b-5p	-2.42	0.0014	0.1589
hsa-miR-1301-3p	-2.37	0.0486	0.5721
hsa-miR-128-3p	-2.35	0.0262	0.5
hsa-miR-505-3p	-2.34	0.0388	0.5368
hsa-miR-224-3p	-2.33	0.0322	0.5225
hsa-miR-5589-3p	-2.25	0.0145	0.444

La figura 4-A es el mapa de calor con la comparación de la expresión de miRNAs entre los grupos EHNA versus control, donde se muestran los resultados de grupos jerárquicos obtenidos en análisis realizado con la herramienta TAC. La relación en la expresión de los miRNAs va de >5 (valor más alto, en rojo) a 0.45 (valores más bajos, en azul). Se normalizaron los datos y se utilizaron distancias euclidianas de disimilitud con el método de amalgamación de Ward. Mientras que la figura 4-B es la representación de la expresión diferencial de miRNAs comparando tejido hepático de pacientes del grupo EHNA versus tejido hepático del grupo de pacientes control en forma de gráfico de volcán. Los puntos verdes marcan los miRNAs con una expresión significativamente menor en el grupo EHNA en comparación con las muestras control (FDR <0,01). El eje X muestra cambios (log2fold) en la expresión y el eje Y las probabilidades logarítmicas de que estos miRNAs se expresen diferencialmente.

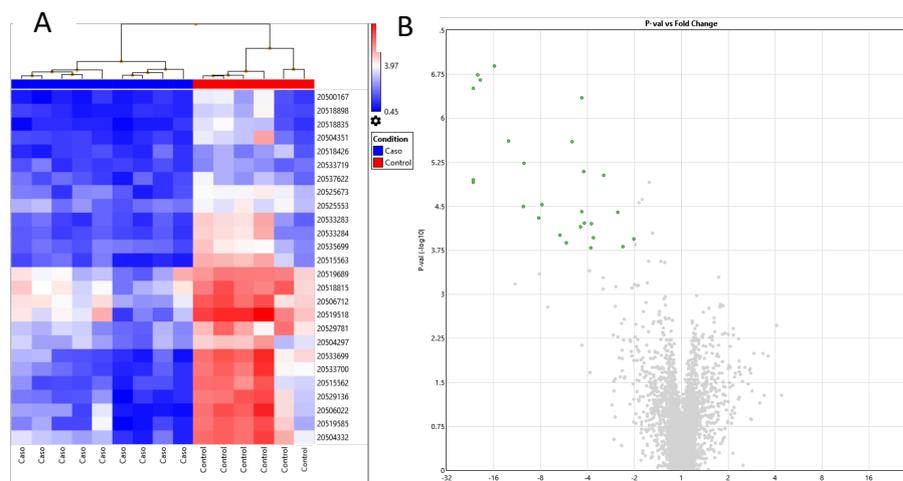


Figura 4. Perfil de expresión diferencial de microRNAs comprando RNA de tejido hepático de pacientes con esteatohepatitis no alcohólica contra sujetos sin esta enfermedad. Veintiún moléculas se encuentran desreguladas, todas ellas con una tasa de cambio negativa.

3.4 Validación del perfil de expresión diferencial

Una vez determinada la presencia de los perfiles de expresión de cada uno de los estadios de la enfermedad, se procedió a validar la expresión de estos miRNAs a través de ensayos de RT-PCR cuantitativo en tiempo real. Para una administración eficiente de los recursos, se seleccionaron de manera aleatoria dos miRNAs de los perfiles hallados en el ensayo por microarreglos con mayores tasas de cambio reportadas (tablas 2y 3). También se incluyó al miR-122-3p, que es considerado como el miRNA específico del hígado más abundante, y que parece estar involucrado en varios procesos fisiológicos en la función hepática (117), quedando la lista de miRNA seleccionados para la validación de la siguiente manera:

1. hsa-miR-122-3p
2. hsa-miR-140-5p
3. hsa-miR-148-5p
4. hsa-miR-3064-5p
5. hsa-miR-3148

La figura 5 muestra las tasas de expresión de cambio obtenidas en el proceso de validación, aunque las obtenidas por PCR en tiempo real son menores a las reportadas por el análisis de microarreglos la mayoría de los miRNAs evaluados presentaron la misma tendencia de comportamiento que el reportado por el microarreglo, el único miRNA con un patrón distinto fue del miR-3064-5p el cual presenta un comportamiento opuesto con una tasa de cambio de -21.68 en el microarreglo y de 8.42 en el ensayo de RT-PCR. Las tasas de cambio del mir-122-3p fueron de 9.09 vs. 2.097

respectivamente. Para el mir-140-5p el microarreglo reporto una tasa de cambio de 5.83 y en el ensayo de RT-PCR fue de 2.11, mientras que para el mir-148-5p fue de 4.4 vs. 1.96 y para el miR-3148 fue de -21.58 vs -0.558 respectivamente.

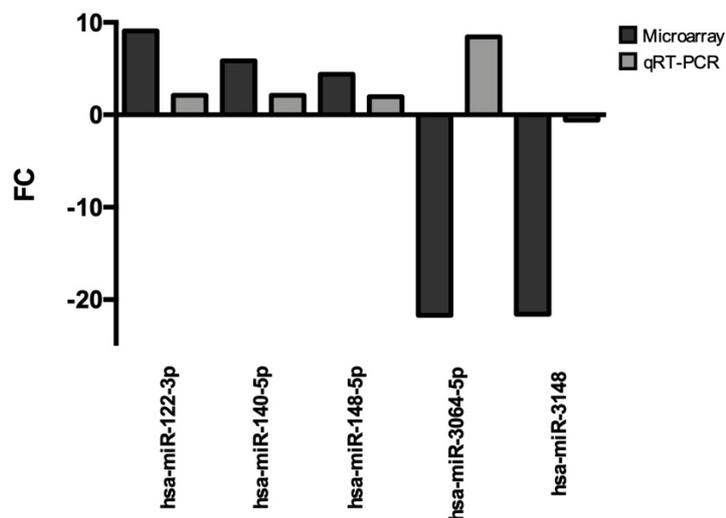


Figura 5. Comparación de las tasas de expresión diferencial de los miRNAs seleccionados para la validación del ensayo por microarreglos.

Las tasas de expresión (FC) en el perfil de esteatosis simple, son considerablemente más bajas comparadas con los FC del microarreglo, pero aunque las tasas son menores todos los valores de expresión de cambio de los microRNA en el perfil de esteatosis simple son mayores a +1.5, convirtiéndoles en moléculas con potencial de ser explorados como biomarcadores de la enfermedad o para la exploración de las vías fisiológicas o celulares en las que se encuentran involucrados.

Los miRNAs del perfil del estadio de esteatohepatitis no alcohólica, presentaron resultados variados, para el hsa-miR-3064-5p, el FC del microarreglo fue una de las más altas en valores negativos, -21.68 pero en el ensayo de validación el resultado fue distinto, con un FC de +8.43 fue el obtenido; en cambio, el hsa-miR-3148 tuvo un FC de -21.58 en el microarreglo y en el ensayo de validación nos reportó una tasa de cambio de -0.56. Esta tasa de cambio de expresión, al realizar el análisis estadístico para la determinación de diferencias de medias solo encontró significancia en el cambio de expresión del miR-140-5p ($p < 0.01$). La figura 6 resume de manera visual los resultados del ensayo de validación para los miRNAs seleccionados para este ensayo. Con estos resultados nosotros validamos el perfil de expresión diferencial propuesto.

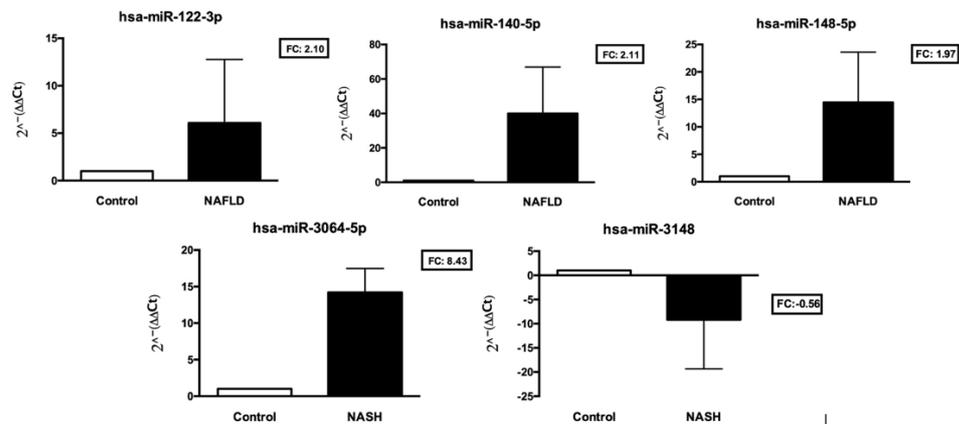


Figura 6. Ensayo de validación. Resultados de los $2^{-\Delta\Delta CT}$ de los ensayos por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo en tiempo real realizados con los miRNAs seleccionados y las tasas de cambios (Fold change, FC) de los mismos.

3.5 Análisis de enriquecimiento.

Para el análisis bioinformático se utilizaron los cinco miRNAs con mayor tasa de cambio positiva del ensayo de expresión diferencial de los grupos HGNA y EHNA con la finalidad de explorar los posibles genes de interacción. Un total de 1566 genes fueron identificados como potenciales dianas genéticas con regiones semillas de interacción con los miRNAs para el perfil de HGNA, mientras que 1870 genes para el grupo de EHNA.

El subanálisis realizado con la herramienta IPA para el grupo HGNA, reportó 24 genes implicados en el modelo de exploración. Los 24 genes y los valores de asociación estadística reportados por el análisis se presentan en la tabla 4.

Para el estadio de EHNA, 1157 genes con potencial interacción con los miRNAs del perfil propuesto fueron reportados. El análisis de enriquecimiento se realizó por medio de la herramienta IPA, que reporto a 27 genes potencialmente involucrados en la desregulación de rutas metabólicas en la esteatohepatitis no alcohólica, la tabla 5 presenta los datos sobre los genes asociados.

Tabla 4. Genes asociados a la red de interacción del perfil de microRNA del grupo HGNA					
<i>Nombre</i>	<i>Símbolo</i>	<i>valor-p</i>	<i>valor-p de FDR</i>	OR	Función
Hexocinasa	<i>GCK</i>	0.001	0.177	0.99	Las hexoquinasas fosforilan la glucosa para producir glucosa-6-fosfato, el primer paso en la mayoría de las vías del metabolismo de la glucosa.
Acil-CoA Deshidrogenasa de cadena larga	<i>ACADL</i>	0.001	0.187	0.020	Es una de las cuatro enzimas que catalizan el paso inicial de la beta-oxidación mitocondrial del ácido graso de cadena recta.
Carnitina Palmitoiltransferasa, Isoforma Hepática	<i>CPT1A</i>	0.001	0.187711	0.777	Es la enzima clave en el transporte dependiente de la carnitina a través de la membrana interna mitocondrial.
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 1	<i>GPD1</i>	0.001	0.187	0.783	Cataliza la conversión reversible del fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) y la reducción del dinucleótido de adenina de nicotina (NADH) en glicerol-3-fosfato (G3P) y NAD ⁺ .
Subunidad Beta de proteína de unión nucleótidos de guanina	<i>GNB2</i>	0.001	0.187	0.020	Regulador de las subunidades alfa, así como de ciertos receptores y efectores de transducción de señales dependientes de proteínas G.
Transactivador Interactivo Cbp/P300 2	<i>CITED2</i>	0.001	0.187	0.028	Inhibe la transactivación de los genes inducidos por HIF1A al competir con la unión del factor 1-alfa inducible por la hipoxia a p300-CH1.
Proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), 13	<i>GNAI3</i>	0.001	0.187	0.030	Regulador del receptor de dopamina D5 y regulador de unión del complejo de proteínas G.
Familia de proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40) miembro C24	<i>DNAJC24</i>	0.001	0.187	0.030	Estimula la actividad de la ATPasa de varias chaperonas tipo Hsp70.
PIB-Manosa pirofosforilasa A	<i>GMPPA</i>	0.001	0.187	0.030	Regula la actividad de la manosa-1-guaniltransferasa.
Aldehído deshidrogenasa miembro de la familia B1	<i>ALDH1B1</i>	0.001	0.187	0.030	Segunda enzima de la vía oxidativa del metabolismo del alcohol.
Ceramidasa alcalina 3	<i>ACER3</i>	0.001	0.187	0.030	Participa en los procesos de la mielinización, y proliferación celular
Subunidad F del factor 3 de iniciación de la traducción eucariótica	<i>EIF3F</i>	0.001	0.187	0.991	Permite la actividad de ubiquitinasa. Contribuye a la actividad del factor de iniciación de la traducción.
5'-aminolevulinato sintasa 1	<i>ALAS1</i>	0.001	0.187	0.030	Cataliza el paso limitante de la velocidad de biosíntesis del hemo (hierro-protoporfirina).
Glutatión S-transferasa 4	<i>GSTM4</i>	0.001	0.187	0.030	Funciona en la desintoxicación de compuestos electrofílicos, y productos del estrés oxidante, por conjugación con glutatión.
Dihidrolipoamida succiniltransferasa	<i>DLST</i>	0.001	0.187	0.030	Cataliza la conversión de 2-oxoglutarato en succinil-CoA y CO ² .

Forkhead Box P3	<i>FOXP3</i>	0.002	0.187	0.036	Regulador transcripcional de elementos cabeza de horquilla/hélice.
Glucosamina (UDP-N-Acetil)-2-epimerasa/ N-acetilmanosamina cinasa	<i>GNE</i>	0.011	0.187	0.086	Enzima bifuncional que inicia y regula la biosíntesis del ácido N-acetilneuramínico (NeuAc), precursor de los ácidos siálicos.
24-Desidrocolesterol reductasa	<i>DHCR24</i>	0.011	0.187	0.086	Oxidoreductasa dependiente de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) que cataliza la reducción del doble enlace delta-24 de los intermediarios de esteroides durante la biosíntesis del colesterol.
Citocromo P450 familia 4 subfamilia A miembro 22	<i>CYP4A22</i>	0.0133	0.187	0.095	Monooxigenasa que cataliza reacciones implicadas en el metabolismo de fármacos y la síntesis de colesterol, esteroides y otros lípidos.
ArfGAP con dominio SH3, repetición de anquirina y dominio PH 1	<i>ASAP1</i>	0.014	0.187	0.101	Proteína activadora de la GTPasa del factor de ribosilación de ADP (ARF).
Reparación de BRCA1 asociada	<i>BRCA1</i>	0.0199	0.187	0.11	Fosfoproteína nuclear de 190 kD que desempeña un papel en el mantenimiento de la estabilidad genómica y también actúa como supresor de tumores.
Citrato sintasa	<i>CS</i>	0.040	0.187	0.170	Cataliza la síntesis de citrato a partir de oxaloacetato y acetil coenzima A.
Engullimiento y motilidad celular 1	<i>ELMO1</i>	0.057	0.187	0.205	Proteína de engullimiento y motilidad celular, citocinesis, fagocitosis y migración celular.
Aldo-ceto reductasa familia 1 miembro C1	<i>AKR1C1</i>	0.073	0.192	0.235	Catalizan la conversión de aldehídos y cetonas en sus correspondientes alcoholes utilizando NADH y/o NADPH como cofactores.

Tabla 5. Genes asociados a la red de interacción del perfil de microRNA del grupo EHNA					
<i>Nombre</i>	<i>Símbolo</i>	<i>valor-p</i>	<i>valor-p de FDR</i>	<i>OR</i>	<i>Función</i>
Receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo 2	PTPN2	0.0001	0.0061	0.99	Regula los procesos de crecimiento celular, diferenciación, ciclo mitótico y la transformación oncogénica.
Inhibidor de la serina peptidasa, tipo 2 de Kunitz	SCSD	0.0001	0.012	0.02	Inhibe la activación del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).
Carnitina palmitoiltransferasa 1A	CPT1A	0.0001	0.0308	0.777	Enzima clave en el transporte dependiente de carnitina a través de la membrana interna mitocondrial, necesaria para el proceso de beta-oxidación de ácidos grasos.
Subunidad catalítica alfa 2 de la proteína cinasa activada por AMP	PRKAA2	0.0001	0.0453	0.783	Fosforila e inactiva la acetil-CoA carboxilasa y la beta-hidroxi beta-metilglutaril-CoA reductasa.
Activador de proteína RAS P21 1	RASA1	0.0001	0.0114	0.02077	Estimula la actividad de GTPasa de RAS p21.
Metilsterol monooxigenasa 1	MSMO1	0.0001	0.0018	0.0280	Funciona en la biosíntesis del colesterol.
Regulador MDM4 De P53	MDM4	0.0001	0.0247	0.0303	Se une a la proteína supresora de tumores p53 e inhiben su actividad.
Transducina Beta Like 1 Receptor ligado al cromosoma X 1	TBL1XR1	0.0001	0.0075	0.03066	Correpresor nuclear de la histona desacetilasa 3 (HDAC 3).
Subunidad catalítica alfa 1 de la proteína cinasa activada por AMP	PRKAA1	0.0001	0.0024	0.03055	Protege a las células del estrés que causa el agotamiento de ATP al desactivar las vías biosintéticas que consumen ATP.
Factor de transcripción KLF 3	KLF3	0.002	0.0023	0.03077	Regula la unión específica de secuencia a cajas CACCC y motivos ricos en GC a regiones promotoras.
Discos grandes MAGUK tipo proteínas de andamio 5	DLG5	0.002	0.0055	0.9912	Funciona en la transmisión de señales extracelulares al citoesqueleto y en el mantenimiento de la estructura de las células epiteliales.
Proteína de unión a elementos de respuesta CAMP 3 similar 2	CREB3L2	0.002	0.0244	0.03078	Activador transcripcional de SPCG asociado al proceso de condrogenésis.
Subunidad beta del complejo multienzimático trifuncional de la hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	HADHB	0.005	8.13E-05	0.03078	Subunidad beta de la proteína trifuncional mitocondrial, que cataliza los tres últimos pasos de la oxidación beta mitocondrial de los ácidos grasos de cadena larga.

Activador del receptor gamma proliferador de peroxisomas	PPARG	0.005	0.0058	0.03078	Regula la diferenciación de los adipocitos. Además, PPAR-gamma se ha implicado en la patología de numerosas enfermedades, como la obesidad, la diabetes, la aterosclerosis y el cáncer.
Subunidad beta del complejo multienzimático trifuncional de la hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	HADHA	0.005	0.0432	0.03655	Subunidad beta de la proteína trifuncional mitocondrial, que cataliza los tres últimos pasos de la oxidación beta mitocondrial de los ácidos grasos de cadena larga.
Miembro de la familia SMAD 5	SMAD5	0.006	4.48E-05	0.08657	Factor de crecimiento transformante beta que inhibe la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas.
Factor de transcripción Kruppel similar al factor 6	KLF6	0.008	0.0031	0.08657	Factor de transcripción tipo Kruppel, funciona como un supresor de tumores.
Subunidad 1 del factor de transcripción general IIIH	GTF2H1	0.0013	0.0441	0.09522	Regula positivamente la transcripción de ADN y transcripción por ARN polimerasa II.
Ubiquitina Ligasa 1 E3	PELI1	0.0014	1.52E-05	0.10100	Activa la proteína ligasa de la ubiquitina.
MAF BZIP Factor de transcripción F	MAFF	0.0016	0.0157	0.11735	Factor de transcripción de cremallera básica de leucina (bZIP).
Inhibidor cinasa dependiente de ciclina 1A	CDKN1A	0.0047	0.0043	0.20584	Inhibidor de la ciclina-quinasa 2, regulando la progresión del ciclo celular en G1.
Factor de transcripción B MAF BZIP	MAFB	0.0068	0.0011	0.0307	Factor de transcripción de cremallera básica de leucina (bZIP) que juega un papel importante en la regulación de la hematopoyesis.
Receptor beta del ácido retinoico	RARB	0.008	0.0031	0.03078	Regulador transcripcional nuclear de receptores de hormonas tiroideas y esteroides.
Factor de transcripción ETS ELK3	ELK3	0.0111	0.0299	0.03655	Inhibidor transcripcional en ausencia de Ras, pero activa la transcripción cuando Ras está presente.
25. Cinasa 2 rica en repeticiones de leucina	LRRK2	0.0114	0.0158	0.08657	Miembro de la familia de cinasas repetidas ricas en leucina.
Factor intercambiador de nucleótidos de guanina rap 4	RAPGEF4	0.0119	0.0004	0.08657	Regulador del receptor de neurotransmisores
UDP Glucuronosiltransferasa tipo 2 miembro B11	UGT2B11	0.0128	0.0272	0.09522	Activador de la glucuronosiltransferasa, cataliza la transformación de bilirrubina no conjugada en bilirrubina conjugada.
Proteína relacionada con Ras Rab-1A	RAB1A	0.0133	0.0151	0.0303	Regulador del tráfico de vesículas desde el retículo

					endoplásmico hasta el aparato de Golgi.
--	--	--	--	--	---

El resumen ilustrado del análisis de enriquecimiento y la red de interacción entre los genes y procesos metabólicos celulares implicados tanto en el estadio de esteatosis hepática simple (HGNA) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) se presenta en las figuras 7 y 8 respectivamente.

Finalmente, las potenciales vías o procesos celulares asociadas con los blancos genéticos y los miRNAs del perfil se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Procesos celulares relacionados a los microRNAs desregulados.	
Esteatosis hepática simple (HGNA)	
<u>Nombre de la vía o proceso</u>	Valor-p
Ciclo celular	9.88E-03 - 9.88E-03
Movimiento celular	4.33E-02 - 4.33E-02
Respuesta celular a terapéuticos	4.33E-02 - 4.33E-02
Morfología celular	3.14E-01 - 3.14E-01
Mantenimiento y funcionamiento celular	3.14E-01 - 3.14E-01
Esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)	
<u>Nombre de la vía o proceso</u>	Valor-p
Inflamación hepática/Hepatitis	1.23E-02 - 1.23E-02
Cirrosis hepática	5.39E-02 - 5.39E-02
Fibrosis hepática	5.39E-02 - 5.39E-02
Carcinoma hepatocelular	3.75E-01 - 3.75E-01
Hiperplasia hepática/Hiperproliferación	3.75E-01 - 3.75E-01

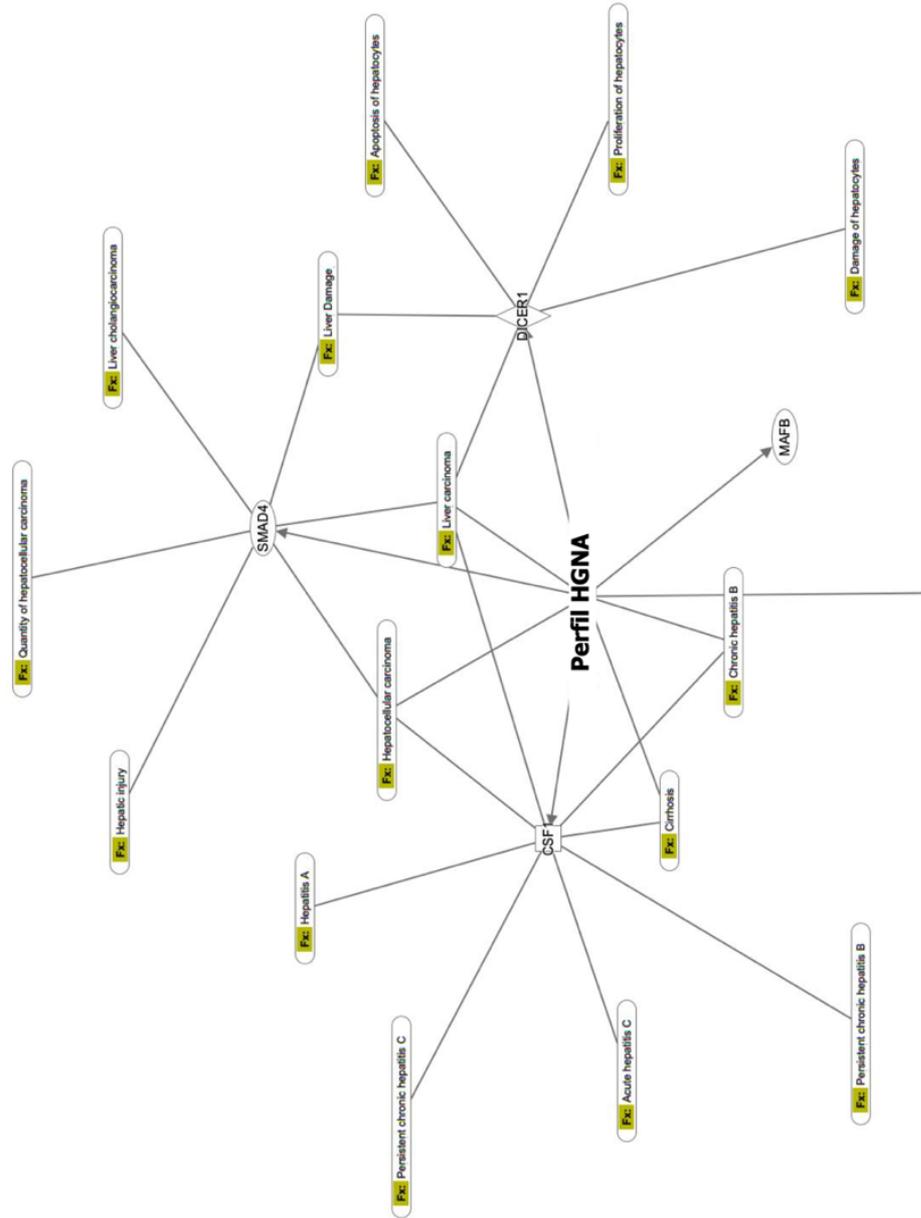


Figura 7. Análisis de enriquecimiento. Resumen de los principales blancos genéticos y los posibles procesos celulares implicados en el perfil de los miRNAs desregulados en el estadio esteatosis hepática simple (HGNA) obtenido por medio de la herramienta IPA.

3.6 Biomarcadores circulantes y su asociación con el perfil de los miRNAs.

El grupo control, mostró niveles circulantes de CK-18 de 104.1pg/mL, mientras que el grupo con HGNA de 230.2pg/mL y el grupo EHNA el valor medio fue de 128.9pg/mL. Ahora bien, los niveles en plasma de APO-B en el grupo control fueron de 2941.8ng/mL, para los pacientes que presentaron HGNA fue de 3599.8ng/mL y para el grupo con EHNA fue de 2567.7 ng/mL. Para la interleucina-6, los niveles del grupo control fueron de 28.2pg/mL, para el grupo con HGNA fueron de 31.3 pg/mL y para el grupo con EHNA fueron de 22.6pg/mL. Los niveles de interleucina-32, para el grupo control fueron de 1291.1pg/mL, para el grupo con HGNA 1348.4pg/mL y para el grupo con EHNA fue de 8013.6 pg/mL. Finalmente, para el biomarcador TNF- α , los niveles en el grupo control fueron de 119.4pg/mL, para el grupo con HGNA fueron de 111.8pg/mL y para el grupo con EHNA fueron de 127.4pg/mL. La figura 9 presenta los resultados de manera visual comparando los tres grupos.

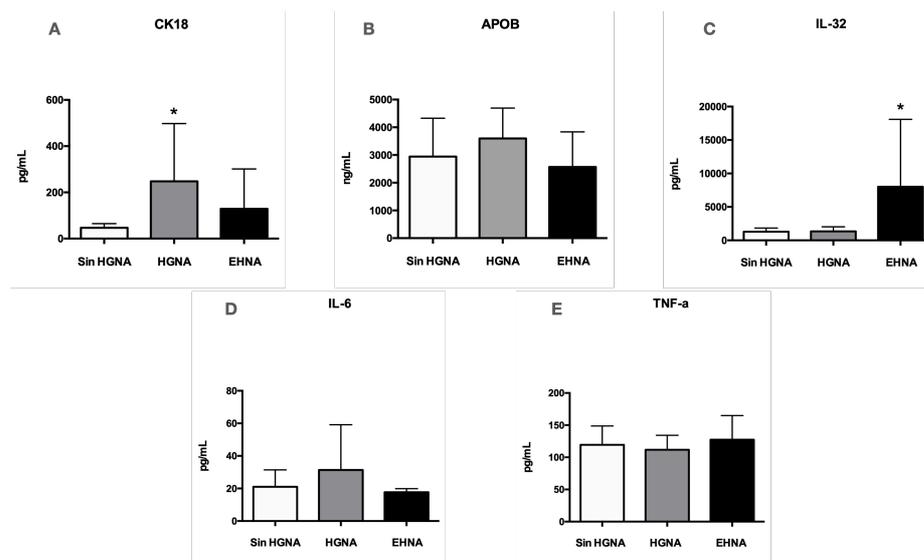


Figura 9. Niveles séricos de biomarcadores. A. Comparación de los niveles circulantes de citoqueratina-18 (CK-18). B. Comparación de los niveles circulantes de apolipoproteína-B (APOB). C. Comparación de los niveles circulantes de interleucina-32. D. Comparación de los niveles circulantes de interleucina-6. E. Comparación de los niveles circulantes del Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). La comparación se realizó entre los grupos control (sin HGNA), el grupo con esteatosis hepática simple (HGNA) y el grupo con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). CK18 tuvo diferencia estadística ($p < 0.001$) entre el grupo HGNA y el grupo control, mientras que la IL-32 presentó diferencia estadística ($p = 0.03$) entre el grupo control y el HGNA.

CAPÍTULO IV: DISCUSION DE RESULTADOS

El diagnóstico de HGNA actualmente se basa en estudios de imagen, los cuales son operador dependiente y escalas clínicas con amplias zonas de incertidumbre. También existen biomarcadores convencionales que son inespecíficos. La prueba diagnóstica definitiva para la identificación de individuos portadores del fenotipo más severo es la biopsia hepática que es invasiva. Nuestro estudio demuestra la existencia de un perfil de expresión diferencial de miRNAs, en biopsias hepáticas de pacientes diagnosticados de HGNA y EHNA.

El HGNA que se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa hepática, asociada a la resistencia a la insulina y alteraciones en la homeostasis metabólica, siendo el sobre peso y la obesidad el principal factor de riesgo asociado (6). En nuestro estudio la media de índice de masa corporal de los grupos control fue de 27.8 Kg/m^2 , de los pacientes con HGNA de 28.9 Kg/m^2 y los que padecía EHNA de 30 Kg/m^2 , mostrando diferencias significativas, lo que corrobora lo publicado por otros investigadores (118). Por otro lado, se sabe que, niveles elevados de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) reflejan daño hepatocelular no específico. En el HGNA/EHNA, los niveles de aminotransferasa pueden elevarse de dos a cuatro veces por encima del límite superior de la normalidad, con ALT más alta que la AST, en contraste con la esteatohepatitis alcohólica (119); sin embargo, en nuestros estudio, las pruebas de función hepática de rutina fueron normales; solo algunos pacientes mostraron elevaciones leves en los niveles de fosfatasa alcalina o en la gamma-glutamil transferasa (GGT) (un promedio de 1,5 a tres veces el límite superior de la normalidad). Nuestros datos corroboran lo publicado por otros investigadores, que han encontrado que cerca del 80% de los pacientes con hígado graso presentan niveles de ALT dentro de los límites normales (120). Además, se ha demostrado que los niveles de aminotransferasas no correlacionan con el grado de fibrosis(121), es por tanto que estos marcadores bioquímicos circulantes no se consideran adecuados para el diagnóstico de HGNA.

Debido a que los marcadores clásicos para evaluar la función hepática carecen de utilidad para esta enfermedad, varios grupos de investigación se han dado a la tarea de investigar varias alternativas para el diagnóstico de la enfermedad, un ejemplo de ello es la CK-18, que es una de las principales proteínas de filamento intermedio del hígado, ha sido propuesta como un biomarcador para el diagnóstico EHNA, debido a que se sabe que la CK-18 se libera durante procesos de apoptosis de los hepatocitos y se puede detectar mediante inmunoensayo.

Un metaanálisis reportó que a pesar de utilizar una amplia gama de valores de corte para CK-18 en la EHNA, esta molécula y sus fragmentos proporcionan una precisión moderada para el diagnóstico del HGNA y de la EHNA. Nosotros hallamos que este marcador se encuentra elevado en los pacientes con HGNA, pero no en aquellos con EHNA (Figura 9), aunque la exploración se realizó buscando el filamento CK-18 y no sus productos de ruptura por las caspasas que son lo que mayor sensibilidad han demostrado, esta tesis sienta el precedente para continuar explorando los subproductos de esta proteína en los distintos estadios de HGNA(122).

Otros marcadores circulantes propuestos, son varias citocinas que incluyen a la IL-6, la IL-32, al TNF- α y la lipoproteína de transporte APOB; sin embargo, varios estudios han explorado estas citocinas inflamatorias en el HGNA con resultados no concluyentes (123–128). Dos de estos estudios compararon a pacientes con HGNA con controles sin HGNA (125,127), mientras que los tres restantes compararon a pacientes con EHNA con pacientes sin EHNA (123,128). El TNF- α fue más alto en pacientes con HGNA en comparación con los controles (127), fue también más alto en EHNA en comparación con su grupo control (123) Mientras que el otro estudio no encuentra diferencia en ninguno de los grupos (126). En este estudio se compararon los niveles circulantes de esta citosina, tanto en pacientes con HGNA como en pacientes con EHNA comparándolos con el grupo control. La media de esta citocina en el grupo HGNA fue de 119.4 ± 28.1 pg/mL mientras que para el grupo EHNA fue de 111.8 ± 22.5 pg/mL y para el grupo control de 127.4 ± 37.4 pg/mL, sin encontrar diferencia entre ellos. (Figura 9).

Algunos autores también reportan que la IL-6 fue más alta en pacientes con HGNA en comparación con los controles sin HGNA (128), pero sin diferencias entre EHNA (36,95). Nuestros datos al igual que la evaluación de TNF- α , no demuestran diferencia entre los grupos.

Otro marcador de inflamación es la IL-32, la cual ha sido propuesta como un potencial marcador para el diagnóstico de HGNA, sus niveles tienen una relación proporcional con el IMC, la circunferencia abdominal y con el NAS (129), Guido y colaboradores además reportaron una asociación independiente de presencia y gravedad de HGNA con el incremento de los niveles de IL-32. De manera interesante, nuestros datos concuerdan con esta información encontrando niveles muchos mayores en pacientes con EHNA comparados contra el grupo control (8013.6768 pg/mL vs 1291 .pg/mL, (Figura 9), destacando esta molécula como un potencial biomarcador para el estadio de progresión del hígado graso.

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido identificar los miRNAs con potencial de ser utilizados como biomarcadores predictivos y diagnósticos de dos manifestaciones clínicas de la enfermedad por hígado graso no alcohólico: la esteatosis simple y la esteatohepatitis.

Los niveles de expresión de los miRNAs por ensayos de microarreglos de tejido hepático de pacientes con HGNA y con EHNA fueron comparados contra los niveles de expresión de los miRNAs de tejido hepático del grupo control sin HGNA o sin datos de EHNA. Ambos grupos presentaron un perfil de expresión diferencial desregulado y muy distinto el uno de otro (Figura 3 y 4), cabe destacar que el perfil de expresión de los miRNAs del grupo EHNA se caracterizó porque el total de moléculas halladas desreguladas presentaron una expresión negativa, mientras que el perfil de expresión del grupo HGNA 23 de las 25 moléculas con desregulación presentaron cambios positivos, lo que pone de manifiesto la complejidad molecular y como cada estadio de esta enfermedad presenta comportamientos completamente distintos. El análisis comparativo de ambos perfiles de expresión diferencial no encontró ningún elemento en común, lo que indica que el cambio de la expresión de estas moléculas involucradas en la comunicación celular y control de expresión genética cambia completamente al pasar del estadio de sobrecarga lipídica a un fenotipo donde la inflamación juega un papel preponderante.

El miR-122, han sido ampliamente descrito y asociado al HGNA, aunque algunos autores reportan niveles disminuidos en el tejido hepático (130-131); algunos otros, han reportado resultados similares a los que se obtuvieron en nuestros experimentos (132–135), El miR-122, es uno de los microRNAs más estudiados tanto en HGNA como en fibrosis hepática; nuestros resultados lo colocan como el miRNA con las mayores tasas de cambio positivo en los pacientes con esteatosis simple, por lo que proponemos a esta molécula como un potencial biomarcador de esteatosis simple que en conjunto con el mir-140, molécula que también se encuentra elevada en los pacientes con esteatosis simple y que ha sido reportada con niveles elevados asociados a HGNA (136) miR-148, que es un miRNA asociado a procesos inflamatorios(137,138) pero no relacionado con el hígado, siendo los primeros en reportar niveles incrementados en hígado de pacientes con esteatosis simple.

En cuanto a los pacientes con EHNA, nuestros resultados mostraron que los niveles de expresión de los miRNAs hepáticos se encuentran desregulados negativamente, siendo los miR-297, miR-3064-5p, miR-3148, miR-7844-5p, y miR-3149 son los principales miRNAs alterados. Aunque la información publicada no está relacionada al hígado graso, si a procesos que se encuentran alterados en la esteatohepatitis como son los

procesos de diferenciación celular, hiperplasia, supervivencia e inflamación (139–148).

Para validar este perfil de expresión en sus diferentes estadios, los principales miRNAs (que presentaron mayor tasa de cambio con un valor p de FDR menor a 0.05) fueron medidos por medio de ensayos cuantitativos en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa y continuar con el proceso de exploración bioinformático. Los miRNAs para HGNA fueron los hsa-miR-122-3p, hsa-miR-140-5p y hsa-miR-148b-5p. Mientras que para el estadio de EHNA fueron el hsa-miR-3064-5p y el hsa-miR-3148. Los análisis por RT-PCRc del nivel de expresión confirmaron la mayoría de los resultados obtenidos por microarreglos con excepción de la expresión del hsa-miR-3064-5p que resulto opuesta al ensayo (Figura 6).

Los valores de tasa de cambio en la expresión fueron menores, aunque es conocido que en los ensayos de expresión esto suele suceder. Respecto a los ensayos de validación solo los miRNAs hsa-miR-148-5p y hsa-miR-3064-p fueron estadísticamente diferentes contra los controles, de tal manera que podemos decir que existe un perfil de expresión diferencial de microRNAs en los fenotipos de esteatosis y esteatohepatitis hepáticas y que ambos son muy distintos.

A continuación, se hizo un estudio del sitio de unión de los 5 principales miRNAs de cada perfil de expresión diferencial con sus potenciales blancos genéticos. Del perfil de pacientes con HGNA se identificaron 24 genes con potencial interacción, que incluye genes asociados tanto a vías glucolíticas como del metabolismo de lípidos.

La tabla 4 presenta los genes con los que interaccionan los miRNAs con potencial desarrollo de esteatosis simple. La glucocinasa (GCK), se ha demostrado estar involucrada en la regulación del metabolismo hepático, así como tener un papel clave en la sensibilidad a la insulina en el hígado (149–151) mientras que ACADL, CPT1A y GPD1 se ha comprobado que están involucradas en alteraciones en el metabolismo de los lípidos en el hígado, La esteatosis hepática simple a menudo se describe como una "condición benigna" en el contexto de la enfermedad hepática hay fuertes vínculos epidemiológicos entre este estadio y la diabetes tipo 2, debido a que la esteatosis está fuertemente asociada con la resistencia a la insulina, los genes mencionado anteriormente son ejemplos de dianas moleculares que podrían estar alterados en el hígado, y también en tejidos periféricos como el músculo esquelético y el tejido (152–154). Se ha propuesto a los exosomas como un modo importante de comunicación intercelular e intertisular. Reportes previos de proteómica de exosomas derivados de hepatocitos de rata han identificados aproximadamente 250 proteínas,

algunas de las cuales fueron reportadas por el análisis bioinformático que realizamos (por ejemplo, PPARG, HADHB, PRKAA1, PTNP2). El análisis bioinformático predice que estas proteínas derivadas de hepatocitos están implicadas en el transporte intracelular, el metabolismo de los lípidos, el metabolismo de los carbohidratos, la disponibilidad de metabolitos y la rotación de proteínas, nuestros datos contribuyen a continuar explorando el papel de estos genes en el HGNA, y su desregulación probable debido a alteraciones en los componentes de los exosomas y alteraciones en la comunicación de ejes metabólicos como puede ser el de Hígado-Intestino o Hígado-Tejido Adiposo. (150, 151, 153)

Por otro lado, el perfil de expresión de los pacientes con EHNA muestra 28 genes relacionados con procesos como la activación de proteínas de señalización y factores de transcripción (TBL1XR1, KLF3, CREB3L2, KLF6, GTF2H1, MAFF) así como procesos de diferenciación y proliferación (PTNP2, SCSD, RASA1, MDM4, PPARG, SMAD5, CDKN1A, RARB). Algunos de estos genes han sido relacionados con lesiones hepáticas por sobrecarga de lípidos o bien activación de mecanismos de proliferación y supervivencia asociados a EHNA. (155–164)

Tras la identificación de estos genes y su interacción con los miRNAs, realizamos una exploración *in silico* donde se encontró que en el HGNA la mayoría son vías metabólicas básicas para el funcionamiento celular, como movimiento, morfología, mantenimiento y funcionamiento celular, mientras que en el estadio de EHNA, las principales vías alteradas son mecanismo hepatóxicos como fibrosis, cirrosis inflamación hepática e incluso vías asociadas a hepatocarcinoma. La tabla 7 y 8 resumen los valores de probabilidad que estas vías estén afectadas debido a la interacción de los miRNAs desregulados y su interacción con los genes.

Finalmente, con los datos obtenidos en esta tesis se han resumido en las figuras 7 y 8 las posibles interacciones de los genes y los miRNAs, donde se puede apreciar visualmente como los diferentes estadios de la enfermedad lucen como patologías completamente distintas, lo cual sugiere que la complejidad de la enfermedad es debido a cambios radicales en la expresión y comportamiento metabólico de los hepatocitos y las células en las que en conjunto forman el parénquima hepático.

Una de las limitaciones de este estudio es que hay otros mecanismos involucrados en el desarrollo de las complicaciones asociadas a la esteatosis, que no han sido investigados en pacientes. Nuestro análisis bioinformático se basa en información y ensayos realizados en modelos celulares y animales, por lo tanto, algunos de los genes y vías metabólicas que postulamos podrían no estar relacionados.

Por tanto, podemos decir, que no serán los miRNAs individualmente si no la huella en su conjunto, o determinaciones relativas como los cocientes de miRNAs, lo que permitiría su uso en el diagnóstico de la esteatosis y la esteatohepatitis no alcohólica.

CAPITULO V: CONCLUSIONES

Del trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral podemos extraer las siguientes conclusiones:

- 1- La prevalencia de la enfermedad por hígado graso no alcohólico es alta en la población seleccionada es de 71.7%.
- 2- Existe un perfil de expresión de miRNAs desregulados en la enfermedad por hígado graso no alcohólico.
- 3- Tanto el estadio inicial de la enfermedad, la esteatosis hepática simple como la del estadio de progresión esteatohepatitis no alcohólica presenta una firma de miRNAs desregulados completamente distinta una de otra.
- 4- Los miRNAs, -miR122-3p, -miR-140-5p, -miR-148-5p presentaron una expresión diferencial comparando en pacientes con HGNA comparados con pacientes sin HGNA.
- 5- Los miRNAs, -miR3148 y -miR-3064-5p, tienen una expresión diferencial en pacientes con EHNA comparados con pacientes sin HGNA.
- 6- La complejidad de la enfermedad se ve reflejada en los cambios de expresión de los miRNAs.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2017 Sep 20 [cited 2018 May 22];15(1):11–20. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrgastro.2017.109>
2. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* [Internet]. 2016 Jul [cited 2019 Jun 10];64(1):73–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.28431>
3. Liu J, Ayada I, Zhang X, Wang L, Li Y, Wen T, et al. Estimating Global Prevalence of Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease in Overweight or Obese Adults. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2022 Jul 25];20(3):e573–82. Available from: <http://www.cghjournal.org/article/S1542356521002081/fulltext>
4. Barquera S, Hernández-Barrera L, Trejo-Valdivia B, Shamah T, Campos-Nonato I, Rivera-Dommarco J. [Obesity in Mexico, prevalence and trends in adults. *Ensanut 2018-19*.]. *Salud Publica Mex* [Internet]. 2020;62(6):682–92. Available from: [files/1163/Barquera et al. - 2020 - \[Obesity in Mexico, prevalence and trends in adults.pdf](files/1163/Barquera et al. - 2020 - [Obesity in Mexico, prevalence and trends in adults.pdf)
5. Romero-Martínez M, Shamah-Levy T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, Mojica-Cuevas J, Cuevas-Nasu L, et al. [National Health and Nutrition Survey 2018-19: methodology and perspectives]. *Salud Publica Mex* [Internet]. 2019;61(6):917–23. Available from: [files/1183/Romero-Martínez et al. - 2019 - \[National Health and Nutrition Survey 2018-19 met.pdf](files/1183/Romero-Martínez et al. - 2019 - [National Health and Nutrition Survey 2018-19 met.pdf)
6. Mundi MS, Velapati S, Patel J, Kellogg TA, Abu Dayyeh BK, Hurt RT. Evolution of NAFLD and Its Management. *Nutr Clin Pract* [Internet]. 2020;35(1):72–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31840865>
7. Bernal-Reyes R, Castro-Narro G, Malé-Velázquez R, Carmona-Sánchez R, González-Huezo MS, García-Juárez I, et al. Consenso mexicano de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Rev Gastroenterol Mex* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Aug 3];84(1):69–99. Available from: <http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es-consenso-mexicano-enfermedad-por-higado-articulo-S0375090618301794>
8. Engin A. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2017 [cited 2022 May 2];960:443–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28585211/>

9. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Apr 14];15(1):11–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28930295/>
10. Calzadilla Bertot L, Adams L. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 May 20 [cited 2018 Jan 24];17(5):774. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/5/774>
11. Piazzolla VA, Mangia A. Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH. *Cells* [Internet]. 2020;9(4):1005. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7226476/>
12. White PJ, Abdelmalek MF. Insights Into Metabolic Mechanisms and Their Application in the Treatment of NASH. *Clin Liver Dis (Hoboken)* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Aug 3];17(1):29–32. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cld.1062>
13. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 May 2];73(1):202–9. Available from: <http://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168827820302014/fulltext>
14. Zheng KI, Fan JG, Shi JP, Wong VWS, Eslam M, George J, et al. From NAFLD to MAFLD: a “redefining” moment for fatty liver disease. *Chin Med J (Engl)* [Internet]. 2020 Oct 5 [cited 2022 Apr 14];133(19):2271–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32701591/>
15. Hazlehurst JM, Woods C, Marjot T, Cobbold JF, Tomlinson JW. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism* [Internet]. 2016 Aug [cited 2019 May 23];65(8):1096–108. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26856933>
16. Jarvis H, Craig D, Barker R, Spiers G, Stow D, Anstee QM, et al. Metabolic risk factors and incident advanced liver disease in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A systematic review and meta-analysis of population-based observational studies. *PLoS Med* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 May 2];17(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32353039/>
17. Lallukka S, Yki-Järvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2016 Jun [cited 2019 May 23];30(3):385–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27432073>
18. Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 Apr 1;18(4):223–38.

19. Younossi Z, Tacke F, Arrese M, Chander Sharma B, Mostafa I, Bugianesi E, et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* [Internet]. 2019;69(6):2672–82. Available from: files/1188/Younossi et al. - 2019 - Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Di.pdf
20. Ofosu A, Ramai D, Reddy M. Non-alcoholic fatty liver disease: controlling an emerging epidemic, challenges, and future directions. *Ann Gastroenterol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 14];31(3):288–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29720854>
21. MacHado MV, Diehl AM. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2016;150(8).
22. Kudaravalli P, John S. Nonalcoholic Fatty Liver [Internet]. *StatPearls*. 2019 [cited 2019 Jun 6]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31082077>
23. Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2020;158(7):1851–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32061595>
24. Engin A. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2017;960:443–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28585211>
25. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* [Internet]. 2016;65(8):1038–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>
26. Bernal-Reyes R, Castro-Narro G, Malé-Velázquez R, Carmona-Sánchez R, González-Huezo MS, García-Juárez I, et al. Consenso mexicano de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Rev Gastroenterol Mex* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2019 May 20];84(1):69–99. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0375090618301794?via%3Dihub>
27. Eslam M, George J. Genetic and epigenetic mechanisms of NASH. *Hepatol Int*. 2016;10(3):394–406.
28. Wegermann K, Hyun J, Diehl AM. Molecular Mechanisms Linking Nonalcoholic Steatohepatitis to Cancer. *Clin Liver Dis (Hoboken)* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Aug 4];17(1):6–10. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cld.1006>
29. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2022 May 2];65(8):1038–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26823198/>
30. Marchisello S, di Pino A, Scicali R, Urbano F, Piro S, Purrello F, et al. Pathophysiological, Molecular and Therapeutic Issues of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview. *Int J Mol Sci* [Internet].

- 2019 Apr 2 [cited 2022 Aug 4];20(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31010049/>
31. Kanwal F, Shubrook JH, Younossi Z, Natarajan Y, Bugianesi E, Rinella ME, et al. Preparing for the NASH Epidemic: A Call to Action. *Gastroenterology* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 Aug 3];161(3):1030-1042.e8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34416976/>
32. Anstee QM, Day CP. The genetics of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2013;10(11):645–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2013.182>
33. Masarone M, Rosato V, Dallio M, Gravina AG, Aglitti A, Loguercio C, et al. Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2018 [cited 2022 Aug 4];2018. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29991976/>
34. Fang YL, Chen H, Wang CL, Liang L. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From “two hit theory” to “multiple hit model.” *World J Gastroenterol* [Internet]. 2018 Jul 21 [cited 2022 Aug 4];24(27):2974–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30038464/>
35. Tokushige K, Ikejima K, Ono M, Eguchi Y, Kamada Y, Itoh Y, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis 2020. *J Gastroenterol* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2022 Aug 3];56(11):951–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34533632/>
36. Blond E, Disse E, Cuerq C, Draï J, Valette PJ, Laville M, et al. EASL–EASD–EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease in severely obese people: do they lead to over-referral? *Diabetologia*. 2017 Jul 1;60(7):1218–22.
37. Zeng Y, He H, An Z. Advance of Serum Biomarkers and Combined Diagnostic Panels in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Chai J, editor. *Dis Markers* [Internet]. 2022 Jun 29 [cited 2022 Aug 4];2022:1254014. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35811662>
38. Ajmera V, Loomba R. Imaging biomarkers of NAFLD, NASH, and fibrosis. *Mol Metab* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2022 Aug 4];50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33460786/>
39. Ferraioli G, Monteiro LBS. Ultrasound-based techniques for the diagnosis of liver steatosis. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2019 Oct 28 [cited 2022 Aug 4];25(40):6053–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31686762/>
40. Park CC, Nguyen P, Hernandez C, Bettencourt R, Ramirez K, Fortney L, et al. Magnetic Resonance Elastography vs Transient Elastography in Detection of Fibrosis and Noninvasive Measurement of Steatosis in Patients With Biopsy-Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2017 Feb 1;152(3):598-607.e2.

41. Caussy C, Reeder SB, Sirlin CB, Loomba R. Noninvasive, Quantitative Assessment of Liver Fat by MRI-PDFF as an Endpoint in NASH Trials. *Hepatology*. 2018 Aug 1;68(2):763–72.
42. Tsai E, Lee TP. Diagnosis and Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis, Including Noninvasive Biomarkers and Transient Elastography. *Clin Liver Dis*. 2018 Feb 1;22(1):73–92.
43. Cao YT, Xiang LL, Qi F, Zhang YJ, Chen Y, Zhou XQ. Accuracy of controlled attenuation parameter (CAP) and liver stiffness measurement (LSM) for assessing steatosis and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine* [Internet]. 2022 Sep [cited 2022 Aug 4];51:101547. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35844772>
44. Selvaraj EA, Mózes FE, Jayaswal ANA, Zafarmand MH, Vali Y, Lee JA, et al. Diagnostic accuracy of elastography and magnetic resonance imaging in patients with NAFLD: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2021 Oct 1;75(4):770–85.
45. Hsu C, Caussy C, Imajo K, Chen J, Singh S, Kaulback K, et al. Magnetic Resonance vs Transient Elastography Analysis of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Pooled Analysis of Individual Participants. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Aug 4];17(4):630-637.e8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29908362/>
46. Alexander M, Loomis AK, van der Lei J, Duarte-Salles T, Prieto-Alhambra D, Ansell D, et al. Risks and clinical predictors of cirrhosis and hepatocellular carcinoma diagnoses in adults with diagnosed NAFLD: real-world study of 18 million patients in four European cohorts. *BMC Med* [Internet]. 2019 May 20 [cited 2022 Aug 4];17(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31104631/>
47. Lee J, Vali Y, Boursier J, Spijker R, Anstee QM, Bossuyt PM, et al. Prognostic accuracy of FIB-4, NAFLD fibrosis score and APRI for NAFLD-related events: A systematic review. *Liver Int* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Aug 4];41(2):261–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32946642/>
48. Vali Y, Lee J, Boursier J, Spijker R, Löffler J, Verheij J, et al. Enhanced liver fibrosis test for the non-invasive diagnosis of fibrosis in patients with NAFLD: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Aug 4];73(2):252–62. Available from: <http://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168827820301987/fulltext>
49. López-Sánchez GN, Dóminguez-Pérez M, Uribe M, Chávez-Tapia NC, Nuño-Lámbarrri N. Non-alcoholic fatty liver disease and microRNAs expression, how it affects the development and progression of the disease. *Ann Hepatol* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2022 Aug 4];21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32533953/>

50. Wang KC, Chang HY. Epigenomics: Technologies and Applications. *Circ Res* [Internet]. 2018 [cited 2022 Aug 4];122(9):1191–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29700067/>
51. Gallego-Durán R, Romero-Gómez M. Epigenetic mechanisms in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging field. *World J Hepatol*. 2015;7(24):2497–502.
52. Zeybel M, Hardy T, Robinson SM, Fox C, Anstee QM, Ness T, et al. Differential DNA methylation of genes involved in fibrosis progression in non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1).
53. Pirola CJ, Scian R, Gianotti TF, Dopazo H, Rohr C, Martino JS, et al. Epigenetic Modifications in the Biology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Medicine* [Internet]. 2015;94(36):e1480. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201509020-00024>
54. Hardy T, Mann DA. Epigenetics in liver disease: From biology to therapeutics. *Gut*. 2016;65(11):1895–905.
55. Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J Hepatol* [Internet]. 2018;68(2):268–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29122391>
56. Sun C, Fan JG, Qiao L. Potential epigenetic mechanism in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):5161–79.
57. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol* [Internet]. 2019;234(5):5451–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30471116>
58. Jiang S. A Regulator of Metabolic Reprogramming: MicroRNA Let-7. *Transl Oncol* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2022 Aug 15];12(7):1005–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31128429/>
59. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquienelli AE, Bettlinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* [Internet]. 2000 Feb 24 [cited 2022 Aug 15];403(6772):901–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10706289/>
60. Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2022 Aug 15];35(1):3–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25632930/>
61. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2022 Aug 15];51(4):759–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24045890/>
62. Zendjabil M, Favard S, Tse C, Abbou O, Hainque B. [The microRNAs as biomarkers: What prospects?]. *C R Biol* [Internet]. 2017;340(2):114–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28081967>

63. Miao C, Xie Z, Chang J. Critical Roles of microRNAs in the Pathogenesis of Fatty Liver: New Advances, Challenges, and Potential Directions. *Biochem Genet* [Internet]. 2018 Jun 27 [cited 2018 Aug 12]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29951838>
64. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2022 Aug 15];234(5):5451–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30471116/>
65. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2015 Jun 29 [cited 2022 Aug 15];87:3–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25979468/>
66. Achkar NP, Cambiagno DA, Manavella PA. miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. *Trends Plant Sci* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2022 Aug 15];21(12):1034–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27793495/>
67. de Sousa MC, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Dec 2 [cited 2022 Aug 15];20(24). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31835747/>
68. Wang Y, Liang H. When MicroRNAs Meet RNA Editing in Cancer: A Nucleotide Change Can Make a Difference. *BioEssays*. 2018 Feb 1;40(2).
69. Tomaselli S, Bonamassa B, Alisi A, Nobili V, Locatelli F, Gallo A. ADAR enzyme and miRNA story: A nucleotide that can make the difference. *Int J Mol Sci*. 2013 Nov 19;14(11):22796–816.
70. Ye M, Wang S, Sun P, Qie J. Integrated MicroRNA Expression Profile Reveals Dysregulated miR-20a-5p and miR-200a-3p in Liver Fibrosis. *Biomed Res Int* [Internet]. 2021;2021:9583932. Available from: <files/1190/Ye et al. - 2021 - Integrated MicroRNA Expression Profile Reveals Dys.pdf>
71. Szabo G, Csak T. Role of MicroRNAs in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2016;61(5):1314–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26769057>
72. DiStefano JK, Gerhard GS. Circulating microRNAs in nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2016 Feb 15 [cited 2018 Mar 7];10(2):161–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26606259>
73. Zhu H, Mi Y, Jiang X, Zhou X, Li R, Wei Z, et al. Hepatocyte nuclear factor 6 inhibits the growth and metastasis of cholangiocarcinoma cells by regulating miR-122. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2022 Aug 15];142(5):969–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26825606/>
74. Jampoka K, Muangpaisarn P, Khongnomnan K, Treeprasertsuk S, Tangkijvanich P, Payungporn S. Serum miR-29a and miR-122 as Potential

- Biomarkers for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Microna* [Internet]. 2018;7(3):215–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29848284>
75. Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clinica Chimica Acta* [Internet]. 2013 Sep 23 [cited 2019 May 23];424:99–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727030>
76. Hu Y, Du G, Li G, Peng X, Zhang Z, Zhai Y. The miR-122 inhibition alleviates lipid accumulation and inflammation in NAFLD cell model. *Arch Physiol Biochem* [Internet]. 2021;127(5):385–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31311339>
77. Thomas M, Deiters A. MicroRNA miR-122 as a therapeutic target for oligonucleotides and small molecules. *Curr Med Chem* [Internet]. 2013 [cited 2019 May 23];20(29):3629–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23745562>
78. Davalos A, Goedeke L, Smibert P, Ramirez CM, Warriar NP, Andreo U, et al. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2011 May 31 [cited 2019 May 23];108(22):9232–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576456>
79. Vega-Badillo J, Gutiérrez-Vidal R, Hernández-Pérez HA, Villamil-Ramírez H, León-Mimila P, Sánchez-Muñoz F, et al. Hepatic miR-33a/miR-144 and their target gene *ABCA1* are associated with steatohepatitis in morbidly obese subjects. *Liver International* [Internet]. 2016 Sep [cited 2019 May 23];36(9):1383–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26945479>
80. 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* [Internet]. 2011 Oct 19 [cited 2019 May 23];478(7369):404–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22012398>
81. Benhamouche-Trouillet S, Postic C. Emerging role of miR-21 in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* [Internet]. 2016 Nov [cited 2019 May 23];65(11):1781–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27436271>
82. Rodrigues PM, Afonso MB, Simão AL, Carvalho CC, Trindade A, Duarte A, et al. miR-21 ablation and obeticholic acid ameliorate nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Cell Death Dis* [Internet]. 2017 Apr 13 [cited 2019 May 23];8(4):e2748–e2748. Available from: <http://www.nature.com/articles/cddis2017172>
83. SUN C, HUANG F, LIU X, XIAO X, YANG M, HU G, et al. miR-21 regulates triglyceride and cholesterol metabolism in non-alcoholic fatty liver disease by targeting HMGCR. *Int J Mol Med* [Internet]. 2015 Mar

- [cited 2019 May 23];35(3):847–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25605429>
84. Cao LQ, Yang XW, Chen Y bin, Zhang DW, Jiang XF, Xue P. Exosomal miR-21 regulates the TETs/PTENp1/PTEN pathway to promote hepatocellular carcinoma growth. *Mol Cancer* [Internet]. 2019 Oct 27 [cited 2022 Aug 15];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31656200/>
85. Lin Y, Ding D, Huang Q, Liu Q, Lu H, Lu Y, et al. Downregulation of miR-192 causes hepatic steatosis and lipid accumulation by inducing SREBF1: Novel mechanism for bisphenol A-triggered non-alcoholic fatty liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [Internet]. 2017 Sep [cited 2019 May 23];1862(9):869–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198117300756>
86. Borji M, Nourbakhsh M, Shafiee SM, Owji AA, Abdolvahabi Z, Hesari Z, et al. Down-Regulation of SIRT1 Expression by mir-23b Contributes to Lipid Accumulation in HepG2 Cells. *Biochem Genet*. 2019 Aug 1;57(4):507–21.
87. Ali O, Darwish HA, Eldeib KM, Abdel Azim SA. miR-26a potentially contributes to the regulation of fatty acid and sterol metabolism in vitro human HepG2 cell model of nonalcoholic fatty liver disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
88. Xu Y, Zalzal M, Xu J, Li Y, Yin L, Zhang Y. A metabolic stress-inducible miR-34a-HNF4 α pathway regulates lipid and lipoprotein metabolism. *Nat Commun* [Internet]. 2015 Nov 23 [cited 2019 May 23];6(1):7466. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26100857>
89. Meng F, Glaser SS, Francis H, Yang F, Han Y, Stokes A, et al. Epigenetic Regulation of miR-34a Expression in Alcoholic Liver Injury. *Am J Pathol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2019 May 23];181(3):804–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22841474>
90. Zeng N, Huang R, Li N, Jiang H, Li R, Wang F, et al. MiR-451a attenuates free fatty acids–mediated hepatocyte steatosis by targeting the thyroid hormone responsive spot 14 gene. *Mol Cell Endocrinol*. 2018 Oct 15;474:260–71.
91. Zhang T, Zhao X, Steer CJ, Yan G, Song G. A negative feedback loop between microRNA-378 and Nrfl promotes the development of hepatosteatosis in mice treated with a high fat diet. *Metabolism*. 2018 Aug 1;85:183–91.
92. Lei L, Zhou C, Yang X, Li L. Down-regulation of microRNA-375 regulates adipokines and inhibits inflammatory cytokines by targeting AdipoR2 in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2022 Aug 16];45(8):819–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29569260/>

93. Xu M, Zheng XM, Jiang F, Qiu WQ. MicroRNA-190b regulates lipid metabolism and insulin sensitivity by targeting IGF-1 and ADAMTS9 in non-alcoholic fatty liver disease. *J Cell Biochem* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2022 Aug 16];119(7):5864–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29575055/>
94. Zhang M, Sun W, Zhou M, Tang Y. MicroRNA-27a regulates hepatic lipid metabolism and alleviates NAFLD via repressing FAS and SCD1. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Aug 16];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29101357/>
95. Nie H, Song C, Wang D, Cui S, Ren T, Cao Z, et al. MicroRNA-194 inhibition improves dietary-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice through targeting on FXR. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Aug 16];1863(12):3087–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28951211/>
96. Tian H, Liu C, Zou X, Wu W, Zhang C, Yuan D. MiRNA-194 Regulates Palmitic Acid-Induced Toll-Like Receptor 4 Inflammatory Responses in THP-1 Cells. *Nutrients* [Internet]. 2015 May 13 [cited 2022 Aug 16];7(5):3483–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25984739/>
97. Wang Y, Zhu K, Yu W, Wang H, Liu L, Wu Q, et al. MiR-181b regulates steatosis in nonalcoholic fatty liver disease via targeting SIRT1. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017 Nov 4 [cited 2022 Aug 16];493(1):227–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28899784/>
98. Jampoka K, Muangpaisarn P, Khongnomnan K, Treeprasertsuk S, Tangkijvanich P, Payungporn S. Serum miR-29a and miR-122 as Potential Biomarkers for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *MicroRNA* [Internet]. 2018 May 31 [cited 2018 Jul 8];07. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29848284>
99. Li ZJ, Ou-Yang PH, Han XP. Profibrotic effect of miR-33a with Akt activation in hepatic stellate cells. *Cell Signal* [Internet]. 2014 Jan [cited 2019 May 23];26(1):141–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24100264>
100. Lei L, Zhou C, Yang X, Li L. Down-regulation of microRNA-375 regulates adipokines and inhibits inflammatory cytokines by targeting AdipoR2 in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2022 Aug 16];45(8):819–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29569260/>
101. Nathan G, Kredon-Russo S, Geiger T, Lenz A, Kaspi H, Hornstein E, et al. MiR-375 promotes redifferentiation of adult human β cells expanded in vitro. *PLoS One*. 2015 Apr 13;10(4).
102. Zhang Q, Ma XF, Dong MZ, Tan J, Zhang J, Zhuang LK, et al. MiR-30b-5p regulates the lipid metabolism by targeting PPARGC1A in Huh-7 cell line. *Lipids Health Dis*. 2020 Apr 16;19(1).

103. Castro RE, Ferreira DMS, Afonso MB, Borrvalho PM, Machado M v., Cortez-Pinto H, et al. miR-34a/SIRT1/p53 is suppressed by ursodeoxycholic acid in the rat liver and activated by disease severity in human non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2019 May 23];58(1):119–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22902550>
104. Rao DS, O’Connell RM, Chaudhuri AA, Garcia-Flores Y, Geiger TL, Baltimore D. MicroRNA-34a perturbs B lymphocyte development by repressing the forkhead box transcription factor Foxp1. *Immunity* [Internet]. 2010 Jul [cited 2022 Aug 16];33(1):48–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20598588/>
105. Wang L, Zhang N, Wang Z, Ai D mei, Cao Z yu, Pan H ping. Decreased MiR-155 Level in the Peripheral Blood of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Patients may Serve as a Biomarker and may Influence LXR Activity. *Cellular Physiology and Biochemistry* [Internet]. 2016 [cited 2019 May 23];39(6):2239–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27832630>
106. Wolfson B, Lo PK, Yao Y, Li L, Wang H, Zhou Q. Impact of miR-140 Deficiency on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Mol Nutr Food Res*. 2018 Jul 1;62(13).
107. Ye D, Zhang T, Lou G, Liu Y. Role of miR-223 in the pathophysiology of liver diseases. Vol. 50, *Experimental and Molecular Medicine*. Nature Publishing Group; 2018.
108. He Z, Hu C, Jia W. miRNAs in non-alcoholic fatty liver disease. *Front Med* [Internet]. 2016 Dec 23 [cited 2018 Mar 7];10(4):389–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27680976>
109. Salvoza NC, Klinzing DC, Gopez-Cervantes J, Baclig MO. Association of Circulating Serum miR-34a and miR-122 with Dyslipidemia among Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Vinciguerra M, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 Apr 14 [cited 2019 May 23];11(4):e0153497. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27077736>
110. Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, Brandão BB, Kahn CR. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metab*. 2019 Oct 1;30(4):656–73.
111. Karlas T, Petroff D, Sasso M, Fan JG, Mi YQ, de Lédighen V, et al. Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. *J Hepatol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2022 Aug 22];66(5):1022–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28039099/>
112. Tsochatzis EA, Gurusamy KS, Ntaoula S, Cholongitas E, Davidson BR, Burroughs AK. Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: a meta-analysis of diagnostic accuracy. *J Hepatol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2022 Aug 22];54(4):650–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21146892/>

113. 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* [Internet]. 2005 Jun [cited 2022 May 4];41(6):1313–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15915461/>
114. Licursi V, Conte F, Fiscon G, Paci P. MIENTURNET: an interactive web tool for microRNA-target enrichment and network-based analysis. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2019;20(1):545. Available from: <files/1189/Licursi et al. - 2019 - MIENTURNET an interactive web tool for microRNA-t.pdf>
115. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, Vlachos IS, Tastsoglou S, Kanellos I, et al. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018;46(D1):D239–45. Available from: <files/1217/Karagkouni et al. - 2018 - DIANA-TarBase v8 a decade-long collection of expe.pdf>
116. Rodríguez-Antonio I, López-Sánchez GN, Garrido-Camacho VY, Uribe M, Chávez-Tapia NC, Nuño-Lámbarri N. Cholecystectomy as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease development. *HPB (Oxford)* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 Aug 28];22(11):1513–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32773176/>
117. Hu J, Xu Y, Hao J, Wang S, Li C, Meng S. MiR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein Cell* [Internet]. 2012 [cited 2022 Oct 14];3(5):364–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22610888/>
118. Jarvis H, Craig D, Barker R, Spiers G, Stow D, Anstee QM, et al. Metabolic risk factors and incident advanced liver disease in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A systematic review and meta-analysis of population-based observational studies. *PLoS Med* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 Sep 26];17(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32353039/>
119. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology* [Internet]. 2008 Sep [cited 2022 Sep 26];48(3):792–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18752331/>
120. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2022 Sep 27];37(6):1286–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12774006/>
121. Mathiesen UL, Franzén LE, Frydén A, Foberg U, Bodemar G. The clinical significance of slightly to moderately increased liver transaminase values in asymptomatic patients. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 1999

- [cited 2022 Sep 27];34(1):85–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10048738/>
122. Lee J, Vali Y, Boursier J, Duffin K, Verheij J, Julia Brosnan M, et al. Accuracy of cytokeratin 18 (M30 and M65) in detecting non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2022 Sep 27];15(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32915852/>
123. Pirvulescu I, Gheorghe L, Csiki I, Becheanu G, Dumbravă M, Fica S, et al. Noninvasive clinical model for the diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis in overweight and morbidly obese patients undergoing bariatric surgery. *Chirurgia (Bucur)* [Internet]. 2012 [cited 2022 Sep 28];107(6):772–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23294957/>
124. Leite NC, Salles GF, Cardoso CRL, Villela-Nogueira CA. Serum biomarkers in type 2 diabetic patients with non-alcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis. *Hepatol Res* [Internet]. 2013 May [cited 2022 Sep 28];43(5):508–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23067270/>
125. Kim YC, Cho YK, Lee WY, Kim HJ, Park JH, Park D il, et al. Serum adipocyte-specific fatty acid-binding protein is associated with nonalcoholic fatty liver disease in apparently healthy subjects. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2011 Mar [cited 2022 Sep 28];22(3):289–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20579864/>
126. Tomita K, Teratani T, Yokoyama H, Suzuki T, Irie R, Ebinuma H, et al. Serum immunoglobulin a concentration is an independent predictor of liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis before the cirrhotic stage. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2011 Dec [cited 2022 Sep 28];56(12):3648–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21674175/>
127. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008 Mar;27(5):412–21.
128. Auguet T, Terra X, Porrás JA, Orellana-Gavaldà JM, Martínez S, Aguilar C, et al. Plasma visfatin levels and gene expression in morbidly obese women with associated fatty liver disease. *Clin Biochem*. 2013 Feb;46(3):202–8.
129. Dali-Youcef N, Vix M, Costantino F, El-Saghire H, Lhermitte B, Callari C, et al. Interleukin-32 Contributes to Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance. *Hepatol Commun* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2022 Sep 28];3(9):1205–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31497742/>
130. Wu GY, Rui C, Chen JQ, Sho E, Zhan SS, Yuan XW, et al. MicroRNA-122 Inhibits Lipid Droplet Formation and Hepatic Triglyceride Accumulation via Yin Yang 1. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Oct 9];44(4):1651–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29216638/>

131. Cossiga V, Lembo V, Nigro C, Mirra P, Miele C, D'argenio V, et al. The Combination of Berberine, Tocotrienols and Coffee Extracts Improves Metabolic Profile and Liver Steatosis by the Modulation of Gut Microbiota and Hepatic miR-122 and miR-34a Expression in Mice. *Nutrients* [Internet]. 2021 [cited 2022 Oct 9];13(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33924725/>
132. Miyaaki H, Ichikawa T, Kamo Y, Taura N, Honda T, Shibata H, et al. Significance of serum and hepatic microRNA-122 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* [Internet]. 2014 [cited 2022 Oct 9];34(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24313922/>
133. Yamada H, Ohashi K, Suzuki K, Munetsuna E, Ando Y, Yamazaki M, et al. Longitudinal study of circulating miR-122 in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2015 [cited 2022 Oct 9];446:267–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25958847/>
134. Baranova A, Maltseva D, Tonevitsky A. Adipose may actively delay progression of NAFLD by releasing tumor-suppressing, anti-fibrotic miR-122 into circulation. *Obes Rev* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Oct 9];20(1):108–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30248223/>
135. Long JK, Dai W, Zheng YW, Zhao SP. miR-122 promotes hepatic lipogenesis via inhibiting the LKB1/AMPK pathway by targeting Sirt1 in non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Med* [Internet]. 2019 Jun 13 [cited 2022 Oct 9];25(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31195981/>
136. Fatima A, Waters S, O'Boyle P, Seoighe C, Morris DG. Alterations in hepatic miRNA expression during negative energy balance in postpartum dairy cattle. *BMC Genomics* [Internet]. 2014 Jan 15 [cited 2022 Oct 9];15(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24428929/>
137. Giri BR, Cheng G. Host miR-148 regulates a macrophage-mediated immune response during *Schistosoma japonicum* infection. *Int J Parasitol* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Oct 9];49(13–14):993–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31726056/>
138. Fang Y, Xu X yan, Shen Y, Li J. miR-148 targets CiGadd45ba and CiGadd45bb to modulate the inflammatory response to bacterial infection in grass carp. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Oct 9];106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31953153/>
139. Tang G, Wang J, Dong W, Dai K, Du J. Exosomal miRNA Expression Profiling and the Roles of Exosomal miR-4741, miR-32, miR-3149, and miR-6727 on Gastric Cancer Progression. *Biomed Res Int* [Internet]. 2022 [cited 2022 Oct 9];2022. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35832845/>
140. Li X, Yang Y, Wang L, Qiao S, Lu X, Wu Y, et al. Plasma miR-122 and miR-3149 Potentially Novel Biomarkers for Acute Coronary

- Syndrome. PLoS One [Internet]. 2015 May 1 [cited 2022 Oct 9];10(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25933289/>
141. Muñoz ER, Caccese JB, Wilson BE, Shuler KT, Santos F v., Cabán CT, et al. Effects of purposeful soccer heading on circulating small extracellular vesicle concentration and cargo. J Sport Health Sci [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2022 Oct 9];10(2):122–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33189894/>
142. Vishnubalaji R, Elango R, Manikandan M, Siyal AA, Ali D, Al-Rikabi A, et al. MicroRNA-3148 acts as molecular switch promoting malignant transformation and adipocytic differentiation of immortalized human bone marrow stromal cells via direct targeting of the SMAD2/TGF β pathway. Cell Death Discov [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 Oct 9];6(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32922961/>
143. Akamine T, Morodomi Y, Harada Y, Teraishi K, Tagawa T, Okamoto T, et al. miR-3148 Is a Novel Onco-microRNA that Potentiates Tumor Growth In Vivo. Anticancer Res [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Oct 9];38(10):5693–701. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30275189/>
144. Shih CH, Chuang LL, Tsai MH, Chen LH, Chuang EY, Lu TP, et al. Hypoxia-Induced MALAT1 Promotes the Proliferation and Migration of Breast Cancer Cells by Sponging MiR-3064-5p. Front Oncol [Internet]. 2021 May 3 [cited 2022 Oct 9];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34012919/>
145. Luo Z, Hao S, Yuan J, Zhu K, Liu S, Zhang J, et al. Long non-coding RNA LINC00958 promotes colorectal cancer progression by enhancing the expression of LEM domain containing 1 via microRNA miR-3064-5p. Bioengineered [Internet]. 2021 [cited 2022 Oct 9];12(1):8100–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34672237/>
146. Xiao E, Zhang D, Zhan W, Yin H, Ma L, Wei J, et al. circNFIX facilitates hepatocellular carcinoma progression by targeting miR-3064-5p/HMGA2 to enhance glutaminolysis. Am J Transl Res [Internet]. 2021 [cited 2022 Oct 9];13(8):8697–710. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34539988/>
147. Kefas B, Floyd DH, Comeau L, Frisbee A, Dominguez C, DiPierro CG, et al. A miR-297/hypoxia/DGK- α axis regulating glioblastoma survival. Neuro Oncol [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2022 Oct 9];15(12):1652–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24158111/>
148. Bao Q, Zhao M, Chen L, Wang Y, Wu S, Wu W, et al. MicroRNA-297 promotes cardiomyocyte hypertrophy via targeting sigma-1 receptor. Life Sci [Internet]. 2017 Apr 15 [cited 2022 Oct 9];175:1–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28286226/>

149. Pusec CM, de Jesus A, Khan MW, Terry AR, Ludvik AE, Xu K, et al. Hepatic HKDC1 Expression Contributes to Liver Metabolism. *Endocrinology* [Internet]. 2019 [cited 2022 Oct 10];160(2):313–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30517626/>
150. Bechmann LP, Gastaldelli A, Vetter D, Patman GL, Pascoe L, Hannivoort RA, et al. Glucokinase links Krüppel-like factor 6 to the regulation of hepatic insulin sensitivity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* [Internet]. 2012 Apr [cited 2022 Oct 10];55(4):1083–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22095588/>
151. Yang L, Sun Z, Li J, Pan X, Wen J, Yang J, et al. Genetic Variants of Glycogen Metabolism Genes Were Associated With Liver PDFF Without Increasing NAFLD Risk. *Front Genet* [Internet]. 2022 Apr 6 [cited 2022 Oct 10];13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35464866/>
152. Polchar L, Vallabhaneni P. Case of GPD1 deficiency causing hypertriglyceridaemia and non-alcoholic steatohepatitis. *BMJ Case Rep* [Internet]. 2022 Apr 21 [cited 2022 Oct 10];15(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35450873/>
153. Weber M, Mera P, Casas J, Salvador J, Rodríguez A, Alonso S, et al. Liver CPT1A gene therapy reduces diet-induced hepatic steatosis in mice and highlights potential lipid biomarkers for human NAFLD. *FASEB J* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2022 Oct 10];34(9):11816–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32666604/>
154. Sun W, Nie T, Li K, Wu W, Long Q, Feng T, et al. Hepatic CPT1A Facilitates Liver–Adipose Cross Talk via Induction of FGF21 in Mice. *Diabetes* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 Oct 10];71(1):31–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34957498/>
155. Valenti L, Dongiovanni P. CDKN1A: a double-edged sword in fatty liver? *Cell Cycle* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2022 Oct 10];13(9):1371–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24699009/>
156. Shypulin VP, Martynchuk OA, Rudenko NN, Koliada AK, Tishchenko V v., Melnyk NH. ASSOCIATION ANALYSIS OF PIOGLITAZONE EFFECTIVENESS IN TREATMENT OF NAFLD PATIENTS WITH OBESITY AND PPARG RS1801282 (PRO12ALA) GENOTYPE. *Wiad Lek* [Internet]. 2021 [cited 2022 Oct 10];74(7):1617–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34459761/>
157. Li L, Fu J, Liu D, Sun J, Hou Y, Chen C, et al. Hepatocyte-specific Nrf2 deficiency mitigates high-fat diet-induced hepatic steatosis: Involvement of reduced PPAR γ expression. *Redox Biol* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Oct 10];30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31901728/>
158. Park HS, Song JW, Park JH, Lim BK, Moon OS, Son HY, et al. TXNIP/VDUP1 attenuates steatohepatitis via autophagy and fatty acid

- oxidation. *Autophagy* [Internet]. 2021 [cited 2022 Oct 10];17(9):2549–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33190588/>
159. Zhang W, Hou J, Wang X, Jiang R, Yin Y, Ji J, et al. PTPRO-mediated autophagy prevents hepatosteatosis and tumorigenesis. *Oncotarget* [Internet]. 2015 [cited 2022 Oct 10];6(11):9420–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25826083/>
160. Miele L, Giorgio V, Liguori A, Petta S, Pastorino R, Arzani D, et al. Genetic susceptibility of increased intestinal permeability is associated with progressive liver disease and diabetes in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. 2020 Oct 30 [cited 2022 Oct 10];30(11):2103–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32807638/>
161. Grohmann M, Wiede F, Dodd GT, Gurzov EN, Ooi GJ, Butt T, et al. Obesity Drives STAT-1-Dependent NASH and STAT-3-Dependent HCC. *Cell* [Internet]. 2018 Nov 15 [cited 2022 Oct 10];175(5):1289-1306.e20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30454647/>
162. Bechmann LP, Vetter D, Ishida J, Hannivoort RA, Lang UE, Kocabayoglu P, et al. Post-transcriptional activation of PPAR alpha by KLF6 in hepatic steatosis. *J Hepatol* [Internet]. 2013 May [cited 2022 Oct 10];58(5):1000–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23353867/>
163. Ray K. NASH: KLF6 activates PPAR α signalling in hepatic steatosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2013 Mar [cited 2022 Oct 10];10(3):128. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23399530/>
164. Grander C, Grabherr F, Enrich B, Meyer M, Mayr L, Schwärzler J, et al. Hepatic Meteorin-like and Krüppel-like Factor 3 are Associated with Weight Loss and Liver Injury. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2022 Oct 10];130(6):406–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34407548/>

BIBLIOGRAFIA: Apéndice A: Abreviaturas

LISTADO DE ABREVIATURAS:

AB: Ácidos biliares
ABCG5/8: ATP-binding cassette sub-family G member 5/8
ADNmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial.
AG: Ácidos grasos
AGO: Argonauta
AINE: Antiinflamatorio no esteroideo
ALT: Alanino aminotransferasa
APRI: AST to platelet ratio index
ATP: Adenosín trifosfato
Bax: BCL2-Associated X Protein, proteína X asociada a BCL2
Bcl-2: b-cell leukemia/lymphoma 2 protein, proteína 2 de la leucemia/linfoma de células β .
Bcl-XL: BCL2- extra large, proteína relacionada con Bcl-2 de cadena larga.
BCRP: Breast cancer resistance protein
BSEP: Bile salt export pump
CA: Cholic acid (Ácido cólico)
CDCA: Chenodeoxycholic acid (Ácido quenodesoxicólico)
CHLO: Clorpromazina
CITR: Citrato
Ck18: Citoqueratina 18
c-Met: por sus siglas en inglés cellular mesenchymal transition, transición mesenquimal celular
Ct: PCR threshold cycle
CYP450: Citocromo P450
DCA: Deoxycholic acid (Ácido desoxicólico)
DGCR8: DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DM2: Diabetes mellitus tipo 2
Drp1: por sus siglas en inglés Dinamin 1-like, Proteína relacionada con la dinamina-1.
EHGNA: Enfermedad del hígado graso no alcohólico
EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica
ERM: Elementos de respuesta de miRNA
ERO: Especies Reactivas de Oxígeno
FA: Fosfatasa alcalina
FFA: por sus siglas en inglés Free Fatty Acid, ácido graso libre.
FLIP: Fatty liver inhibition of progression
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
G6PD: glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.
Gpx: glutatión peroxidasa.
Gpx1: glutatión peroxidasa 1.
Gpx4: glutatión peroxidasa 4.

GST: glutatión transferasa
 H₂O₂: peróxido de hidrógeno.
 Hb: Hemoglobina
 HDL: High density lipoprotein (Lipoproteína de alta densidad)
 HGF: Hepatocyte Growth Factor, factor de crecimiento de hepatocitos
 HOMA: Homeostatic model assessment
 HTX: Hepatotoxicidad
 IMC: Índice de masa corporal
 LDL: Low density lipoprotein (Lipoproteína de baja densidad)
 Mfn1: mitofusina 1.
 Mfn2: mitofusina 2.
 mGSH: glutatión mitocondrial.
 miRNA: microRNA
 MIM: Mitochondrial Inner Membrane, membrana mitocondrial interna.
 MMP: Potencial de membrana mitocondrial
 MOM: Mitochondrial Outer Membrane, membrana mitocondrial externa
 mRNA: messenger RNA (RNA mensajero)
 MRP4: Multidrug resistance protein 4
 NAFLD: Non-Alcoholic Liver Disease, Enfermedad del hígado graso no alcohólico.
 NASH: Non-Alcoholic Steatohepatitis, Esteatohepatitis no alcohólica.
 NEFA: Non Esterified Fatty Acids ácido graso no esterificado
 NAS: NAFLD activity score
 NLR: Razón de verosimilitud negativa
 NTCP: Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide
 OATPs: Organic anion-transporting polypeptides
 O₂: radical anión superóxido.
 •OH: radical hidroxilo.
 Opa 1: optic atrophy 1, atrofia óptica 1.
 OST α/β : Organic solute transporter α/β
 OR: Razón de momios
 p62/SQSTM1: secuestrosoma 1.
 PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha, coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas.
 PINK-1: PTEN-inducible putative kinase 1, Cinasa putativa inducida por PTEN.
 PBS: Phosphate-buffered saline (Tampón fosfato salino)
 PCA: Principal components analysis (Análisis de componentes principales)
 PLS-DA: Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
 RISC: RNA-induced silencing complex
 RNAi: RNA de interferencia
 RNAseq: Secuenciación de RNA
 RT-PCRc: Real time-quantitative PCR (PCR cuantitativa en tiempo real)
 SAF score: Steatosis-Activity-Fibrosis score

SM: Síndrome metabólico
SOD1: superóxido dismutasa 1.
SOD2: superóxido dismutasa 2.
STAT3: por sus siglas en inglés signal transducer and activator of transcription 3, factor transductor de señal y activador de transcripción
TG: Triglicéridos
TRBP: Tar RNA binding protein (Proteínas de unión a RNA Tar)
VPN: Valor predictivo negativo
VPP: Valor predictivo positivo
XPO5: Exportin 5
 γ -GT: γ -glutamyltranspeptidasa

Apéndice B: Lista de figuras

Figura 1: Estadios de la enfermedad por Hígado graso no alcohólico (HGNA) y los desenlaces de riesgo asociados a dicha patología. (Pag 14)

Figura 2: Representación histológica de muestras de biopsias de hígados humanos. (Pag 36)

Figura 3: Perfil de expresión diferencial de microRNAs comprando RNA de tejido hepático de pacientes con esteatosis hepática simple contra sujetos sin esteatosis. (Pag 37)

Figura 4: Perfil de expresión diferencial de microRNAs comprando RNA de tejido hepático de pacientes con esteatohepatitis no alcohólica contra sujetos sin esta enfermedad. (Pag 40)

Figura 5: Comparación de las tasas de expresión diferencial de los miRNAs seleccionados para la validación del ensayo por microarreglos. (Pag 41)

Figura 6: Resultados del Ensayo de validación. (Pag 42)

Figura 7: Análisis de enriquecimiento del perfil HGNA. (Pag 48)

Figura 8: Análisis de enriquecimiento del perfil EHNA. (Pag 49)

Figura 9: Niveles séricos de otros biomarcadores propuestos para HGNA. (Pag 50)

Apéndice C: Lista de tablas

Tabla 1: Características antropométricas y bioquímicas de la cohorte de pacientes del estudio. (Pag 34)

Tabla 2: MicroRNAs desregulados en HGNA. (Pag 37)

Tabla 3: MicroRNAs desregulados en EHNA. (Pag 38)

Tabla 4: Genes asociados a la red de interacción del perfil de microRNA del grupo HGNA. (Pag 43)

Tabla 5: Genes asociados a la red de interacción del perfil de microRNA del grupo EHNA. (Pag 45)

Tabla 6: Procesos celulares relacionados a los microRNAs desregulados. (Pag 47)

Apéndice D: Cuestionario de consumo de alcohol (prueba AUDIT)

Tabla 4. Test AUDIT (*Alcohol use disorders identification test*) y puntos de corte

Ítems	Criterios operativos de valoración
1. ¿Con qué frecuencia consume alguna bebida alcohólica?	0. Nunca 1. Una o menos veces al mes 2. De 2 a 4 veces al mes 3. De 2 a 3 veces a la semana 4. Cuatro o más veces a la semana
2. ¿Cuántas consumiciones de bebidas alcohólicas suele realizar en un día de consumo normal?	0. Una o 2 1. Tres o 4 2. Cinco o 6 3. De 7 a 9 4. Diez o más
3. ¿Con qué frecuencia toma 6 o más bebidas alcohólicas en una sola ocasión de consumo?	0. Nunca 1. Menos de una vez al mes 2. Mensualmente 3. Semanalmente 4. A diario o casi a diario
4. ¿Con qué frecuencia en el curso del año ha sido incapaz de parar de beber una vez había empezado?	0. Nunca 1. Menos de una vez al mes 2. Mensualmente 3. Semanalmente 4. A diario o casi a diario
5. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año no pudo hacer lo que se esperaba de usted porque había bebido?	0. Nunca 1. Menos de una vez al mes 2. Mensualmente 3. Semanalmente 4. A diario o casi a diario
6. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha necesitado beber en ayunas para recuperarse después de haber bebido mucho el día anterior?	0. Nunca 1. Menos de una vez al mes 2. Mensualmente 3. Semanalmente 4. A diario o casi a diario
7. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha tenido remordimientos o sentimientos de culpa después de haber bebido?	0. Nunca 1. Menos de una vez al mes 2. Mensualmente 3. Semanalmente 4. A diario o casi a diario
8. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año no ha podido recordar lo que sucedió la noche anterior porque había estado bebiendo?	0. Nunca 1. Menos de una vez al mes 2. Mensualmente 3. Semanalmente 4. A diario o casi a diario
9. ¿Usted o alguna otra persona han resultado heridos porque usted había bebido?	0. No 1. Sí, pero no en el curso del último año 2. Sí, el último año
10. ¿Algún familiar, amigo, médico o profesional sanitario han mostrado preocupación por su consumo de bebidas alcohólicas o le han sugerido que deje de beber?	0. No 1. Sí, pero no en el curso del último año 2. Sí, en el último año

Puntos de corte

Sin problemas: hombres 0-7; mujeres 0-5.

Bebedor de riesgo: hombres 8-12; mujeres 6-12.

Problemas físico/psíquicos y probable dependencia alcohólica: hombres 13-40; mujeres 13-40.

Apéndice E: Escala de actividad de NAFLD (NAS)

NAFLD Activity score (NAS) (0-8)

Esteatosis (0-3)

- 0: < 5% hepatocitos comprometidos
- 1: 5-33% hepatocitos comprometidos
- 2: 33-66% hepatocitos comprometidos
- 3: > 66% hepatocitos comprometidos

Inflamación lobular (0-3)

- 0: ninguna
- 1: < 2 focos por campo óptico x 200
- 2: 2-4 focos por campo óptico x 200
- 3: > 4 focos por campo óptico x 200

Balonización (0-2)

- 0: ninguna
- 1: pocas células con balonización
- 2: muchas células con balonización

Correlación entre el puntaje NAS y el diagnóstico histológico de EHNA

- ≥ 5: EHNA probable o definitiva
- 3-4: indeterminado
- ≤ 2: no EHNA

Puntuación de fibrosis

- 1: fibrosis perisinusoidal o periportal
 - A: fibrosis leve perisinusoidal en zona 3
 - B: fibrosis moderada perisinusoidal en zona 3
 - C: fibrosis portal/periportal
- 2: fibrosis perisinusoidal en zona 3 con fibrosis portal/periportal
- 3: fibrosis en puente
- 4: cirrosis

Apéndice F: Publicaciones derivadas de este trabajo.

Hepatic mir-122-3p, mir-140-5p and mir-148b-5p expressions are correlated with cytokeratin-18 serum levels in MAFLD.

López-Sánchez GN, Montalvo-Javé E, Domínguez-Pérez M, Antuna-Puente B, Beltrán-Anaya FO, Hidalgo-Miranda A, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Nuño-Lámbarri N. *Ann Hepatol.* 2022 Nov-Dec;27(6):100756. doi: 10.1016/j.aohep.2022.100756. Epub 2022 Sep 10. PMID: 36096296

Non-alcoholic fatty liver disease and microRNAs expression, how it affects the development and progression of the disease. López-Sánchez GN, Domínguez- Pérez M, Uribe M, Chávez-Tapia NC, Nuño- Lámbarri N. *Annals of Hepatology.* 2020 Jun 6. Online ahead of print. DOI: 10.1016/j.aohep.2020.04.012

The fibrogenic process and the unleashing of acute-on-chronic liver failure.

Guillermo Nahúm López-Sánchez, Mayra Domínguez-Pérez, Misael Uribe, Natalia Nuño-Lámbarri. *Clinical and Molecular Hepatology.* (2020) DOI: 10.3350/cmh.2019.0011

MicroRNAs involved in the progression of non-alcoholic fatty liver.

Guillermo Nahúm López-Sánchez, Eduardo Montalvo-Javé, Misael Uribe Esquivel, Norberto Carlos Chávez-Tapia, Natalia Nuño-Lambarri. Poster Abstract. *J. Hepatology.* (2020, August); 73 Supplement (1): S1-S1001

Cholecystectomy as a risk factor for non- alcoholic fatty liver disease

development. Rodríguez-Antonio I, López-Sánchez GN, Garrido-Camacho VY, Uribe M, Chávez- Tapia NC, Nuño-Lámbarri N. *HPB.* (2020 Aug 7). DOI: 10.1016/j.hpb.2020.07.011

Role of the inflammasome, gasdermin D, and pyroptosis in non-alcoholic fatty liver disease. Rodríguez-Antonio I, López- Sánchez GN, Uribe M, Chávez-Tapia NC, Nuño-Lámbarri N. *J Gastroenterol Hepatol.* 2021 May 28. doi: 10.1111/jgh.15561. Online ahead of print. PMID: 34050551 Review.

Hepatic steatosis and respiratory diseases: a new panorama.

Botello-Manilla AE, López-Sánchez GN, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Nuño-Lámbarri N. *Ann Hepatol.* 2021 Feb 4;24:100320. doi: 10.1016/j.aohep.2021.100320. Online ahead of print. PMID: 33549735 Free article. Review.