



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA ANTIINFLAMATORIA
Y ANTIFIBRÓTICA DE RILPIVIRINA EN
CÉLULAS HEPÁTICAS NO PARENQUIMALES**

Tesis doctoral

ÁNGELA BEATRIZ MORAGREGA ESCOLANO

Directores:

Dra. Ana Blas García

Dra. Nadezda Apostolova

Dr. Juan Vicente Esplugues Mota

Valencia, abril 2022



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Dra. **Nadezda Apostolova**, Profesora Titular de Universidad en el Departamento de Farmacología de la Universitat de València.

Dra. **Ana Blas García**, Profesora Ayudante Doctor en el Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

Dr. **Juan Vicente Esplugues Mota**, Catedrático de Universidad en el Departamento de Farmacología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado "ESTUDIO DE LA RESPUESTA ANTIINFLAMATORIA Y ANTIFIBRÓTICA DE RILPIVIRINA EN CÉLULAS HEPÁTICAS NO PARENQUIMALES", presentado por la Graduada en Farmacia **ÁNGELA BEATRIZ MORAGREGA ESCOLANO**, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de la Tesis, para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Lo que firmamos en Valencia, a 31 de marzo de 2022

Nadezda Apostolova

Ana Blas García

Juan Vicente Esplugues Mota

Esta tesis doctoral ha sido financiada con fondos del Instituto de Salud Carlos III, Ministerios de Ciencia e Innovación y Universidades (RTI2018-096748-B-100, RTI2018-94436-B-100 y CIBER CB06/04/0071), FISABIO (Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana; ref. UGP-19-033), CIBERehd (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas; ref. EHD19PI03) y Generalitat Valenciana (ref. PROMETEO/2018/141). Yo he sido beneficiaria de un contrato predoctoral del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (ref. FPU16/05896).

“Los grandes logros de cualquier persona generalmente dependen de muchas manos, corazones y mentes”

- Walt Disney -

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNmt	ADN mitocondrial
aHSC	Célula estrellada hepática activada ("activated hepatic stellate cell")
AIM2	"Absent in melanoma 2"
ALT	Alanina transaminasa
AP-1	Proteína activadora ("activator protein 1")
ARN	Ácido ribonucleico
ASC	"Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain"
ASH	Esteatohepatitis alcohólica ("alcoholic steatohepatitis")
AST	Aspartato transaminasa
AZT	Zidovudina o Azidotimidina
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina de suero bovino
cART	Terapia antirretroviral combinada ("combined antiretroviral therapy")
CCL	"C-C motif chemokine ligand"
CCR	"C-C motif chemokine receptor"
CD	"Cluster of differentiation"
CLD	Enfermedad hepática crónica ("chronic liver disease")
C_{max}	Concentración máxima
CX3CL	"C-X3-C motif chemokine ligand"
CXCL	"C-X-C motif chemokine ligand"
CXCR	"C-X-C motif chemokine receptor"
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
d4T	Estavudina

DAMP	Patrones moleculares asociados al daño (“damage-associated molecular patterns”)
ddl	Didanosina
DILI	Lesión hepática inducida por fármacos (“drug-induced liver injury”)
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DRV	Darunavir
DTG	Dolutegravir
DTT	Ditiotreitol
ECM	Matriz extracelular (“extracellular matrix”)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFV	Efavirenz
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular (“extracellular signal-regulated kinase”)
FBS	Suero fetal bovino
FDA	“Food and Drug Administration”
FFPE	"Formalin-fixed, paraffin-embedded"
FTC	Emtricitabina
GGT	Gamma-glutamyl transferasa
GM-CSF	“Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”
HBSS	Solución salina equilibrada de Hank
HDL	Lipoproteína de alta densidad (“high-density lipoprotein”)
HEPES	N-2-hidroxietilopiperacina-N-2-ácido etanosulfónico
HFD	Dieta rica en grasa (“high fat diet”)
HRP	Peroxidasa de rábano (“horseradish peroxidase”)
HSC	Célula estrellada hepática (“hepatic stellate cell”)
IFNγ	Interferón γ
IHQ	Inmunohistoquímica

IκB	“Inhibitor of κB”
IL	Interleuquina
INI	Inhibidor de la integrasa (“integrase inhibitor”)
IRF	“Interferon regulatory factor”
JNK	c-Jun N-terminal quinasa (“c-Jun N-terminal kinase”)
KC	Célula de Kupffer (“Kupffer cell”)
KLF	“Krüppel like factor”
LDL	Lipoproteína de baja densidad (“low-density lipoprotein”)
LPS	Lipopolisacárido
LSEC	Célula endotelial sinusoidal hepática (“liver sinusoidal endothelial cell”)
Ly6C	“Lymphocyte antigen 6C”
MAFLD	Enfermedad de hígado graso asociado al metabolismo (“metabolic-associated fatty liver disease”)
MAPK	Proteín-quinasa activada por mitógenos (“mitogen-activated protein kinase”)
MCP-1	“Monocyte chemoattractant protein-1”
M-CSF	“Macrophage colony-stimulating factor”
MDM	Macrófago derivado de monocito <i>in vitro</i>
MMP	Metaloproteinasas de la matriz (“matrix metalloproteinases”)
MoMF	Macrófago derivado de monocito procedente de médula ósea (“monocyte-derived macrophages”)
NAFLD	Enfermedad de hígado graso no alcohólico (“non-alcoholic fatty liver disease”)
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica (“non-alcoholic steatohepatitis”)
ND	Dieta normal (“normal diet”)
NEAA	Aminoácidos no esenciales
NF-κB	Factor nuclear kappa B (“nuclear factor- kappaB”)
NLR	“NOD-like receptor”
NLRP3	“NLR family pyrin domain containing 3”

NNRTI	Inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos (“non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor”)
NRTI	Inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósidos/tidos (“nucleoside reverse transcriptase inhibitor”)
NVP	Nevirapina
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos (“pathogen-associated molecular patterns”)
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica (“peripheral blood mononuclear cell”)
PBS	Tampón fosfato salino (“phosphate-buffered saline”)
PDGF	“Platelet derived growth factor”
PI	Inhibidor de proteasa (“protease inhibitor”)
p.o.	Vía oral
PPARγ	“Peroxisome proliferator-activated receptor γ ”
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones (“pattern recognition receptor”)
qHSC	Célula estrellada hepática quiescente (“quiescent hepatic stellate cell”)
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RAL	Raltegravir
RPV	Rilpivirina
ROS	Especies reactivas de oxígeno (“reactive oxygen species”)
RT	Transcriptasa inversa (“reverse transcriptase”)
RTV	Ritonavir
SAPK	Proteín-quinasa activada por estrés (“stress-activated protein kinase”)
SD	Desviación estándar (“standard deviation”)
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
STAT	Proteína transdutora y activadora de señales de la transcripción transcripción (“signal transducer and activator of transcription”)
TAF	Tenofovir alafenamida fumarato
TBS-T	Tampón tris salino-Tween 20

TDF	Tenofovir disoproxil fumarato
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β (“transforming growth factor β”)
TLR	Receptor tipo Toll (“toll-like receptor”)
TNF	Tumor necrosis factor
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (“vascular endothelial growth factor”)
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WB	Western Blotting

LISTA DE FIGURAS

I.1	Ciclo vital del VIH-1	4
I.2	Estructura química de Rilpivirina	11
I.3	Estructura del hígado y los tipos celulares presentes	15
I.4	Funciones, características y fenotipos de las HSC en el hígado sano y lesionado	20
I.5	Macrófagos hepáticos en el inicio, la progresión y la resolución de la lesión hepática	23
I.6	Vías de transducción de señales hacia la polarización de macrófagos M1 y M2	25
I.7	Ruta de señalización de las SAPK	31
I.8	Vías de las SAPK en el hígado	34
I.9	Factores ambientales y derivados del intestino en la patogénesis de la NASH y el desarrollo de HCC	38
III.1	Aislamiento de PBMC mediante centrifugación en gradiente de densidad	51
III.2	Ensayo de migración de monocitos	72
IV.1	Treemap transcriptómica	77
IV.2	Estudio de la infiltración de macrófagos CCR2+ en el hígado en respuesta a HFD y tratamiento con RPV	80
IV.3	Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR de mediadores inflamatorios en células LX-2	83
IV.4	Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR de componentes del inflamasoma en células LX-2	84
IV.5	Estudio mediante WB de la activación del inflamasoma NLRP3 en células LX-2	85
IV.6	Estudio mediante WB de la activación de NF- κ B en células LX-2	87
IV.7	Estudio de la secreción de la quimiocina CCL2 mediante ELISA en células LX-2	89
IV.8	Estudio de la activación del inflamasoma en MDM	90
IV.9	Estudio mediante WB de la activación de NF- κ B en MDM	92

IV.10	Estudio mediante WB de la activación de SAPK en MDM	93
IV.11	Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR de marcadores de polarización en MDM	94
IV.12	Estudio de la vía STAT6/PPARG/ARG1 mediante qRT-PCR en MDM	96
IV.13	Análisis de la expresión de p-STAT6 en MDM	98
IV.14	Estudio mediante WB de la activación de STAT1 y STAT3 en MDM	99
IV.15	Estudio de la expresión génica mediante qRT-PCR de varias quimiocinas en MDM	100
IV.16	Estudio de la secreción de la quimiocina CCL2 mediante ELISA en MDM	101
IV.17	Ensayo de migración de células THP-1 hacia medio condicionado de MDM	102
IV.18	Estudio de la expresión génica mediante qRT-PCR de mediadores inflamatorios en MDM estimulados con LPS	103
IV.19	Estudio de la expresión génica mediante qRT-PCR de marcadores de polarización en MDM preestimulados con LPS	104
IV.20	Análisis de la expresión de marcadores de superficie de macrófagos mediante citometría de flujo en MDM preestimulados con LPS	106
IV.21	Estudio de la expresión de STAT1 en células hepáticas no parenquimales en biopsias de pacientes infectados por el VIH y diagnosticados con NAFLD	111
V.1	Representación esquemática de los efectos de Rilpivirina en la migración de monocitos y activación de HSC	144
V.2	Representación esquemática de los efectos de Rilpivirina en la activación de los macrófagos	144

LISTA DE TABLAS

I.1	Grupos farmacológicos, su mecanismo de acción y los nombres de los fármacos antirretrovirales aprobados por la FDA en la actualidad	6
I.2	Resumen de ensayos clínicos de terapias novedosas para la resolución de NASH	40
III.1	Reactivos usados en cultivo celular y su proveedor	50
III.2	Estímulos utilizados en los ensayos <i>in vitro</i>	52
III.3	Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los experimentos de WB	59
III.4	Anticuerpos empleados en citometría de flujo	63
III.5	Parejas de cebadores para genes de ratón empleados en qRT-PCR	66
III.6	Parejas de cebadores para genes humanos empleados en qRT-PCR	66
III.7	Anticuerpos primarios empleados en los ensayos de IHQ	70
IV.1	Lista de funciones biológicas relacionadas con la inflamación y la quimiotaxis y migración de leucocitos significativamente reguladas a la baja en ratones alimentados con HFD tratados con RPV	79
IV.2	Principales características demográficas de la población de estudio	109
IV.3	Análisis de los niveles de STAT1 en células hepáticas no parenquimales en biopsias de pacientes infectados por el VIH diagnosticados con NAFLD	112
IV.4	Análisis de la expresión de <i>IL1B</i> , <i>TNFA</i> y <i>CCL2</i> en PBMC de pacientes infectados por el VIH y diagnosticados con NAFLD	114

RESUMEN

Hoy en día, la infección por el VIH-1 ha pasado de considerarse una enfermedad mortal a convertirse en una condición crónica manejable. Sin embargo, con un tratamiento de por vida y una esperanza de vida cercana a la de la población general, los pacientes con VIH-1 se enfrentan a un mayor riesgo de desarrollar otras patologías crónicas como la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD). Entre los fármacos antirretrovirales empleados para la infección por VIH-1, la Rilpivirina (RPV) está considerada como segura para el hígado y, además, podría ejercer un efecto hepatoprotector.

En la presente tesis doctoral se estudió la respuesta antiinflamatoria y antifibrótica inducida por RPV en la NAFLD, centrándonos en sus acciones sobre los macrófagos y las células estrelladas hepáticas (HSC). Para ello, se empleó un modelo nutricional de NAFLD en ratón y se realizaron experimentos *in vitro* con la línea celular humana LX-2 como modelo de HSC, y con macrófagos derivados de monocitos (MDM) obtenidos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos. También se analizaron biopsias hepáticas y PBMC de pacientes infectados con VIH-1 en tratamiento con terapias que incluían RPV.

El análisis transcriptómico realizado con muestras hepáticas de ratones NAFLD mostró que el tratamiento con RPV reduce aquellos procesos relacionados con la respuesta inflamatoria y la quimiotaxis y migración de leucocitos. Se observó además una reducción de la infiltración macrofágica en el hígado en los ratones con RPV en comparación con los tratados con vehículo. El estudio mecanístico realizado *in vitro* indicó que esta regulación está mediada, al menos en parte, por la inhibición de la secreción de CCL2 por parte de los macrófagos y las HSC producida por este fármaco antirretroviral.

Los ensayos *in vitro* mostraron que RPV inhibe la vía del inflamasoma NLRP3/caspasa-1 e induce la expresión de PPAR γ en las células LX-2, ejerciendo efectos antiinflamatorios y antifibróticos. Por su parte, el estudio en MDM mostró

un claro efecto antiinflamatorio de RPV sobre los macrófagos incluso bajo la inducción proinflamatoria mediada por LPS. Este efecto incluyó la regulación de la vía del inflamasoma NLRP3/caspasa-1 y la inhibición de las rutas inflamatorias y de respuesta a estrés mediadas por NF- κ B, p38 y JNK1. Además, este efecto podría estar acompañado de una polarización hacia un fenotipo antiinflamatorio y pro-resolutivo dependiente de STAT6/PPAR γ .

Por último, evidenciamos el potencial antifibrótico de RPV a nivel clínico mediante la activación de STAT1 en células no parenquimales de pacientes con NAFLD, lo que podría indicar una atenuación del daño hepático por apoptosis o inactivación de HSC.

En vista a estos resultados, consideramos que RPV estaría especialmente indicada en pacientes infectados por el VIH con especial susceptibilidad a sufrir ciertas enfermedades hepáticas, como NAFLD. Además, profundizar en el estudio de sus efectos a nivel hepático podría tener una gran relevancia clínica, siendo los hallazgos en esta temática clave para la mejora de la terapia farmacológica de las enfermedades hepáticas con componente fibrótico e inflamatorio y sirviendo de base para descubrir nuevas dianas terapéuticas.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. VIH Y TERAPIA ANTIRRETROVIRAL	3
I.1.1. CICLO DEL VIH E INFECCIÓN	3
I.1.2. FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES	5
I.1.2.1. GUÍAS CLÍNICAS DE TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL	7
I.1.2.2. HEPATOTOXICIDAD ASOCIADA A LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL	8
I.1.2.3. RILPIVIRINA	10
I.2. FISIOPATOLOGÍA HEPÁTICA	14
I.2.1. ESTRUCTURA Y FISIOLOGÍA HEPÁTICA	14
I.2.2. INFLAMACIÓN HEPÁTICA Y FIBROGÉNESIS	16
I.2.3. CÉLULAS CLAVE EN LA FISIOPATOLOGÍA HEPÁTICA	17
I.2.3.1. HEPATOCITOS	17
I.2.3.2. CÉLULAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS	18
I.2.3.3. MACRÓFAGOS HEPÁTICOS	21
I.2.4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA INFLAMACIÓN Y LA FIBROSIS HEPÁTICA	27
I.2.4.1. NF-κB	27
I.2.4.2. INFLAMASOMA	29
I.2.4.3. PROTEÍN-QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS	30
a. c-Jun N-Terminal Quinasas	32
b. MAPK p38	33
I.2.4.4. EJE CCL2-CCR2	34
I.2.5. ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO	36
I.2.5.1. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO	38
I.3. REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS	41
II. OBJETIVOS	43
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
III.1. REACTIVOS	49
III.1.1. FÁRMACO ANTIRRETROVIRAL	49
III.1.2. REACTIVOS QUÍMICOS GENERALES	49
III.1.3. REACTIVOS PARA CULTIVO CELULAR	49
III.2. MODELOS EXPERIMENTALES	50

III.2.1. MODELOS <i>IN VITRO</i>	50
III.2.1.1. LÍNEAS CELULARES HUMANAS	50
III.2.1.2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES Y OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS	51
III.2.1.3. TRATAMIENTOS <i>IN VITRO</i>	52
III.2.2. MODELO <i>IN VIVO</i> DE NAFLD	53
III.2.3. MUESTRAS DE PACIENTES EN TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL	54
III.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA	55
III.3.1. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	55
III.3.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA CELULAR TOTAL	55
III.3.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES Y CITOSÓLICAS	56
III.3.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	56
III.3.5. WESTERN BLOTTING	57
III.3.5.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA	57
III.3.5.2. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA	58
III.3.5.3. TINCIÓN CON ROJO PONCEAU Y MARCAJE CON LOS ANTICUERPOS	58
III.3.5.4. DETECCIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA	60
III.3.5.5. REUTILIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NITROCELULOSA	60
III.4. ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS	61
III.5. INMUNOFLUORESCENCIA	62
III.6. CITOMETRÍA DE FLUJO	63
III.7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	63
III.7.1. EXTRACCIÓN DE ARN DE CULTIVO CELULAR	63
III.7.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE TEJIDO HEPÁTICO	64
III.7.3. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO POR RETROTRANSCRIPCIÓN	64
III.7.4. RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL	65
III.7.5. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO	67
III.7.5.1. ANÁLISIS DE DATOS	67
III.8. INMUNOHISTOQUÍMICA	68
III.8.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	68
III.8.2. DESPARAFINACIÓN Y EXPOSICIÓN DE LOS EPÍTOPOS	69
III.8.3. BLOQUEO DE LA PEROXIDASA ENDÓGENA	69
III.8.4. MARCAJE INMUNOHISTOQUÍMICO	69
III.8.5. DETECCIÓN CROMOGÉNICA	70

III.8.6. TINCIÓN CON HEMATOXILINA	71
III.8.7. TOMA DE IMÁGENES Y CUANTIFICACIÓN DE LA SEÑAL	71
III.9. ENSAYO DE MIGRACIÓN DE MONOCITOS	71
III.10. PRESENTACIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
IV. RESULTADOS.....	75
SECCIÓN I: CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE RILPIVIRINA EN UN MODELO NUTRICIONAL DE NAFLD	
IV.1. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO	77
IV.2. ESTUDIO DE LA INFILTRACIÓN DE MACRÓFAGOS EN EL HÍGADO	80
SECCIÓN II: CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIINFLAMATORIA INDUCIDA POR RILPIVIRINA EN CÉLULAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS	
IV.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES DE LA INFLAMACIÓN	82
IV.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA	83
IV.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B	86
IV.6. ANÁLISIS DE LA SECRECIÓN DE CCL2	88
SECCIÓN III: CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIINFLAMATORIA INDUCIDA POR RILPIVIRINA EN MACRÓFAGOS	
IV.7. EVALUACIÓN DE VÍAS INFLAMATORIAS	90
IV.7.1. VÍA DEL INFLAMASOMA	90
IV.7.2. VÍA DE NF- κ B	92
IV.7.3. VÍA DE LAS SAPK	92
IV.8. ESTUDIO DE LA POLARIZACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS	93
IV.9. ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN	100
IV.10. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO EN CONDICIONES PROINFLAMATORIAS	102
SECCIÓN IV: CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE RILPIVIRINA EN PACIENTES CON NAFLD	
IV.11. ACTIVACIÓN DE STAT1 EN CÉLULAS HEPÁTICAS NO PARENQUIMALES	108
IV.12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN PBMC	112
V. DISCUSIÓN.....	131
VI. CONCLUSIONES.....	147

BIBLIOGRAFÍA	151
ANEXOS	179

I. INTRODUCCIÓN

I.1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH) Y TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

I.1.1. CICLO DEL VIH E INFECCIÓN

El VIH-1 es el retrovirus humano responsable de la pandemia global del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), que se ha cobrado más de 30 millones de vidas en las últimas cuatro décadas (1). Hoy en día, la infección por el VIH-1 sigue siendo un importante problema de salud pública mundial con alrededor de 38 millones de personas viviendo con el virus. La terapia antirretroviral, cuyo uso es de por vida, ha transformado la enfermedad en una condición de salud crónica manejable que permite a los pacientes llevar una vida larga y bastante saludable, pero todavía no existe una vacuna eficaz ni una cura (1,2). En 2020, se perdieron unas 680.000 vidas debido a enfermedades relacionadas con el SIDA y aproximadamente 1,5 millones de personas se infectaron con el VIH-1 (1). Aunque el número de casos continúa en aumento, especialmente en poblaciones vulnerables y zonas de escasos recursos, existe una tendencia hacia un menor número de nuevas infecciones por el VIH-1, el cual ha disminuido en un 31% a nivel mundial desde 2010 (1).

La infección por el VIH-1 es posible debido a la interacción de las glicoproteínas de la envoltura (Env) presentes en la superficie del virus (gp120 y gp41) con, respectivamente, el receptor CD4 (“cluster of differentiation 4”) y los correceptores de quimiocinas CXCR4 (“C-X-C motif chemokine receptor 4”) y CCR5 (“C-C motif chemokine receptor 5”) ubicados en sus principales células diana, las células T CD4⁺ activadas. El virus también puede infectar otros tipos de células, como las células T CD4⁺ en reposo, los macrófagos, los monocitos y las células dendríticas (3,4). Además, la infección puede ocurrir independientemente del receptor CD4, como se ha demostrado para los astrocitos (5) y las células epiteliales tubulares renales

(6). Una vez dentro de la célula T CD4⁺, el virus libera ARN y enzimas, y usa la transcriptasa inversa (RT, “reverse transcriptase”) para convertir su material genético, ARN viral, en ADN, que entra al núcleo y se combina con el ADN de la célula huésped a través de la actividad de la integrasa viral, para producir nuevos viriones. La proteasa viral activa los viriones recién formados al escindir las poliproteínas virales en subunidades activas (Fig. I.1).

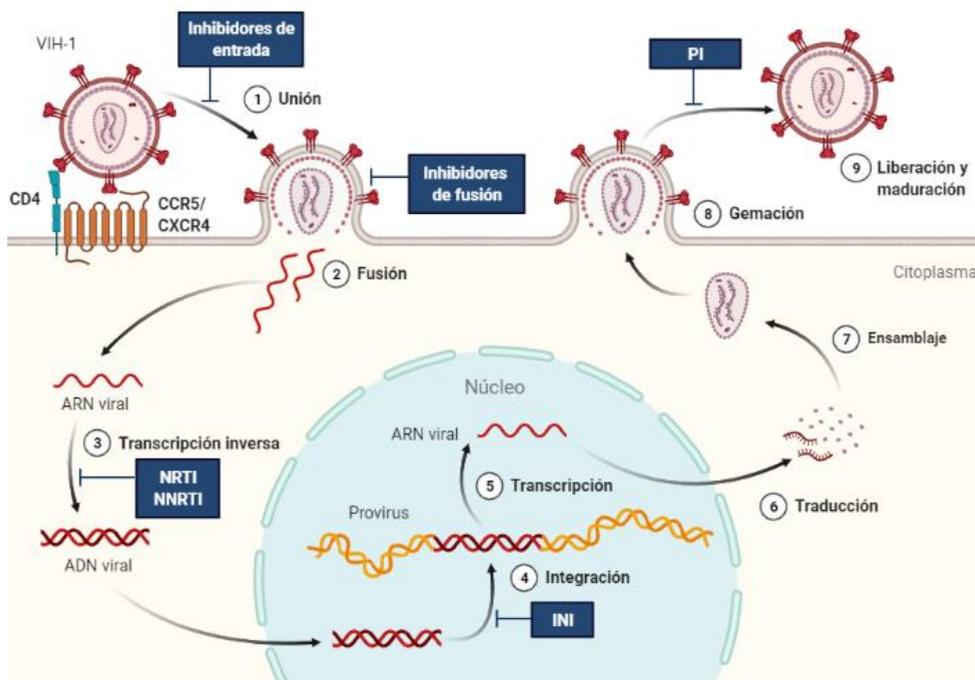


Figura I.1. Ciclo vital del VIH-1 mostrando los pasos inhibidos por las distintas familias de fármacos antirretrovirales. NRTI: inhibidores de la transcriptasa inversa análogo de nucleósidos y nucleótidos; NNRTI: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos; INI: inhibidores de la integrasa; PI: inhibidores de proteasa. Adaptado de (7).

La respuesta inmune natural contra la infección por VIH-1 se basa principalmente en las células T CD8⁺. Tras la infección primaria, la replicación intensa del VIH-1 da como resultado una carga viral plasmática muy alta, medida como copias de ARN viral por mililitro, que pasa a estar parcialmente controlada por la respuesta específica de las células T CD8⁺. Una respuesta inmune más eficiente está

relacionada con una carga viral más baja durante la fase crónica de una infección no tratada, así como con una progresión más lenta de la enfermedad, aunque es incapaz de eliminar el virus (2). La infección provoca la pérdida progresiva de células T CD4⁺ y, con el paso del tiempo, surge la inmunodeficiencia con las complicaciones oncológicas e infecciosas asociadas que definen al SIDA (8).

I.1.2. FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES

Desde una perspectiva clínica, el resultado de la infección ha cambiado drásticamente durante las últimas cuatro décadas gracias a un considerable progreso en las opciones terapéuticas disponibles, que ha logrado transformar la infección por VIH-1 de una condición fatal a una enfermedad crónica con poco efecto sobre la esperanza de vida.

El primer paso en la terapia contra el VIH se dio en 1987, cuando se aprobó el uso de la Zidovudina o Azidotimidina (AZT). La AZT, que había sido sintetizada originalmente como un tratamiento contra el cáncer, mostró su capacidad para bloquear el paso de transcripción inversa del ciclo vital del virus. En aquellos días, se administraba como monoterapia y, como tal, prolongaba la vida de los pacientes de 6 a 18 meses. Sin embargo, rápidamente generó resistencia, lo que urgió el desarrollo de nuevos fármacos (9,10). Los fármacos antirretrovirales actúan inhibiendo las diferentes etapas del ciclo de vida viral dentro de la célula huésped. Hasta la fecha, la FDA ha aprobado para uso clínico más de 30 agentes antirretrovirales y un anticuerpo monoclonal (Ibalizumab), los cuales se clasifican en las siguientes familias: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y nucleótidos (NRTI, “nucleoside reverse transcriptase inhibitors”), inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (NNRTI, “non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors”), inhibidores de proteasa (PI, “protease inhibitors”), inhibidores de la integrasa (INI, “integrase inhibitors”), inhibidores de

entrada del VIH (antagonistas de CCR5), inhibidores de fusión del VIH e inhibidores de unión y post-unión (Tabla I.1) (11).

Tabla I.1. Grupos farmacológicos, su mecanismo de acción y los nombres de los fármacos antirretrovirales aprobados por la FDA en la actualidad. Adaptado de (11). ‡ Fármacos cuya presentación comercial se encuentra en combinación con otros principios activos.

GRUPO FARMACOLÓGICO	MECANISMO DE ACCIÓN	NOMBRE GENÉRICO Y ACRÓNIMO	NOMBRE COMERCIAL
Inhibidores de fusión	Inhiben la fusión entre la membrana viral y la celular	Enfuvirtida (T-20)	Fuzeon
Inhibidores de entrada	Antagonista de CCR5, previene la interacción con la gp120 viral	Maraviroc (MVC)	Selzentry
Inhibidores de unión	Se unen a gp120 evitando la entrada del VIH	Fostemsavir (FTR)	Rukobia
Inhibidores post-unión	Inhiben los cambios conformacionales en el complejo CD4/gp120 que permite la unión a CXCR4	Ibalizumab (IBA)	Trogarzo
Inhibidores de la transcriptasa inversa	Inhiben la replicación del VIH mediante la unión directa a la enzima transcriptasa inversa	Zidovudina (AZT)	Retrovir
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibidor transcriptasa inversa análogo de nucleósido/tido (NRTI) ▪ Inhibidor transcriptasa inversa no análogo de nucleósido (NNRTI) 		Lamivudina (3TC)	Epivir
		Emtricitabina (FTC)	Emtriva
		Abacavir (ABC)	Ziagen
		Tenofovir disoproxil fumarato (TDF)	Viread
		Tenofovir alafenamida fumarato (TAF)	Vemlidy
		Nevirapina (NVP)	Viramune
		Efavirenz (EFV)	Sustiva
		Doravirina (DOR)	Pifeltro
		Etravirina (ETR)	Intelence
		Rilpivirina (RPV)	Edurant
Inhibidores de la integrasa (INI)	Bloquean el paso de integración de la cadena de ADN viral en el genoma del huésped	Raltegravir (RAL)	Isentress
		Dolutegravir (DTG)	Tivicay
		Elvitegravir (EVG)	‡
		Cabotegravir (CAB)	Vocabria
		Bictegravir (BIC)	‡
Inhibidores de proteasa (PI)	Inhiben la proteasa del VIH, previniendo la escisión y generación de las proteínas virales	Ritonavir (RTV)	Norvir
		Saquinavir (SQV)	Invirase
		Atazanavir (ATV)	Reyataz
		Fosamprenavir (FPV)	Lexiva
		Tipranavir (TPV)	Aptivus
		Darunavir (DRV)	Prezista
		Lopinavir (LPV)	‡

I.1.2.1. GUÍAS CLÍNICAS DE TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

Los regímenes de fármacos antirretrovirales, denominados terapia antirretroviral combinada (cART, por sus siglas en inglés “combined antiretroviral therapy”), consisten en una combinación de agentes pertenecientes a diferentes familias. Esta estrategia fue diseñada para limitar la generación de resistencia a los medicamentos, para reducir sus efectos adversos al disminuir las dosis individuales de cada fármaco y para obtener un efecto sinérgico entre los fármacos que actúan sobre diferentes dianas moleculares (11). En algunos casos, se emplea un potenciador o refuerzo farmacocinético, como Cobicistat y RTV (11).

Las pautas recomendadas para el tratamiento inicial de la infección por el VIH-1 en España actualmente consisten en una combinación de dos o tres fármacos. Las pautas triples deben incluir dos NRTI asociados a un INI, a un NNRTI, o a un PI potenciado. La única pauta doble recomendada actualmente como cART de inicio consiste en la combinación de un NRTI (3TC) y un INI (DTG) (12).

La cART logra una supresión virológica prolongada de la replicación del VIH, pero no la erradica, por lo que los pacientes están expuestos a fármacos antirretrovirales durante décadas, lo que puede resultar en toxicidad acumulada que contribuye a un mayor riesgo de enfermedades crónicas en estos pacientes. Otros factores que contribuyen a dicho riesgo son el propio virus y los efectos de la infección y la inflamación crónica persistente asociada, así como la población y el contexto psicosocial en el que tiene lugar la infección por VIH. Por ejemplo, la coinfección por virus de la hepatitis B o C (VHB y VHC), la obesidad y el tabaquismo, que aumentan el riesgo de que el paciente sufra diferentes enfermedades crónicas, son muy prevalentes entre los pacientes infectados por el VIH y, a menudo, superiores a las del grupo de población general (13). Por ello, las pautas de tratamiento recomiendan regímenes basados no solo en su potencia antiviral, sino también en su toxicidad crónica.

I.1.2.2. HEPATOTOXICIDAD ASOCIADA A LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

Entre los problemas de seguridad de la cART, se encuentran la toxicidad y efectos adversos producidos por todos los fármacos antirretrovirales que, frecuentemente, se ven potenciados por las interacciones entre fármacos, y que son la razón más común para suspender la terapia, junto con la aparición de resistencias. En general, los trastornos gastrointestinales, la hipersensibilidad y las reacciones cutáneas, los trastornos neuropsiquiátricos y la toxicidad hepática suelen aparecer temprano después del inicio del tratamiento, mientras que tras una exposición crónica a estos fármacos generalmente se desarrollan otros efectos secundarios, como anomalías en el metabolismo de lípidos y de la glucosa, alteraciones renales, trastornos metabólicos óseos y toxicidad mitocondrial (14).

Como principal órgano responsable del metabolismo de muchos xenobióticos, el hígado es un objetivo común de las lesiones inducidas por fármacos, afirmación que es también aplicable para los principios activos antirretrovirales. La hepatotoxicidad, o lesión hepática inducida por fármacos (DILI, “drug-induced liver injury”), es uno de los efectos secundarios más frecuentes de la cART y es responsable de gran parte de la morbilidad, mortalidad e interrupción del tratamiento en estos pacientes (15,16). Además, hay que añadir el daño hepático producido por el propio VIH-1 (17) y las circunstancias comúnmente asociadas a la población con VIH, como las coinfecciones con el VHB y VHC, el consumo de alcohol y el abuso de drogas, que convierten a las enfermedades hepáticas en un problema de especial relevancia en estos pacientes. Tampoco debe olvidarse la aportación de otros factores como la edad, el sexo, la etnicidad, la presencia de esteatosis hepática (18) y ciertos marcadores genéticos (p.ej. PNPLA3 SNP, rs738409; CYP2B6 haplotipo *6/*6) (19,20), que pueden causar mayor susceptibilidad al daño hepático inducido por la cART.

La gravedad de la lesión hepática varía desde aumentos transitorios en los niveles de enzimas hepáticas hasta eventos clínicos más graves, como hepatitis, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD, “non-alcoholic fatty liver disease”) o esteatohepatitis no alcohólica (NASH, “non-alcoholic steatohepatitis”), hipertensión portal no cirrótica o incluso insuficiencia hepática aguda, que puede provocar la muerte (16). Es importante destacar que la mortalidad asociada al hígado es la segunda causa de muerte no relacionada con el SIDA en pacientes infectados por el VIH-1 (21).

La toxicidad hepática grave puede definirse como la presencia de un aumento de los niveles plasmáticos de aspartato transaminasa (AST), alanina transaminasa (ALT) y fosfatasa alcalina por encima de cinco veces el límite superior normal (22). Siguiendo este criterio, muchos estudios han demostrado que se produce un aumento de los niveles de transaminasas hepáticas en el 2-18% de los pacientes tras varios meses con cART, mientras que en otros esta tasa se ha incrementado hasta el 30% (11). La propia infección por VIH-1 produce un aumento en los niveles de transaminasas hepáticas y, en algunos casos, la lesión hepática puede exacerbarse cuando los pacientes con VIH-1 se someten a tratamiento (23,24). Sin embargo, es difícil determinar la toxicidad hepática asociada a cada fármaco antirretroviral, debido a su administración de manera combinada.

La toxicidad hepática causada por la cART puede producirse a través de diversos mecanismos que han sido clasificados como reacciones de hipersensibilidad (hepatotoxicidad idiosincrásica), toxicidad mitocondrial directa, estrés celular directo o síndrome inflamatorio de reconstitución inmunitaria, particularmente en presencia de coinfección por hepatitis viral (25), mientras que algunos autores también han identificado alteraciones del metabolismo de lípidos y/o azúcares y esteatosis como mecanismos fisiopatológicos (16). De hecho, los lípidos, con sus diversas funciones de respuesta metabólica, inflamatoria e inmunitaria, están

íntimamente ligados a la patología de las enfermedades hepáticas crónicas, en particular a la NAFLD.

Todas las familias de fármacos antirretrovirales pueden causar DILI, pero su potencial hepatotóxico difiere. Entre los NNRTI, se ha observado que NVP induce DILI en el 12% de los pacientes, unas tres veces más que el causado por EFV (26). Los NRTI como AZT, estavudina (d4T) y didanosina (ddI) se han asociado con DILI de moderada a grave, mientras que FTC, ABC y TDF inducen elevaciones menores de las enzimas hepáticas (27). En el caso del grupo de PI, se ha notificado que entre 1-9,5% de los pacientes en tratamiento con fármacos del grupo sufren DILI (28). Es importante destacar que, aunque los fármacos antirretrovirales más nuevos son más seguros, se siguen notificando reacciones adversas a nivel hepático, pero con cifras más bajas que las observadas con los fármacos de primera generación (29). Sin embargo, debido al envejecimiento de los pacientes infectados por el VIH, la toxicidad hepática asociada a la cART probablemente continúe siendo un gran problema en el futuro.

Estudios previos indican que el fármaco antirretroviral Rilpivirina (RPV) podría ser más seguro a nivel hepático que otras alternativas antirretrovirales y, además, podría ejercer un efecto hepatoprotector. Por ello, nos centraremos en su estudio para el desarrollo de esta tesis.

I.1.2.3. RILPIVIRINA

RPV, que pertenece a la segunda generación de NNRTI, fue aprobada en 2011 y comercializada con el nombre de Edurant® por Janssen-Cilag. Su indicación inicial fue para pacientes naïve con un número de copias de ARN viral/mL < 100.000 y un recuento de células CD4⁺ > 200 células/mL. Desde 2013, también se ha empleado en pacientes con tratamiento antirretroviral previo con supresión virológica y sin mutaciones de resistencia a los NNRTI (30).

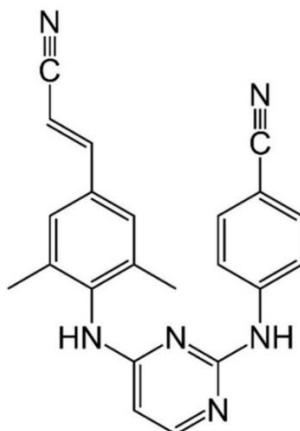


Figura I.2. Estructura química de Rilpivirina.

Este fármaco se encuentra disponible de manera individual como formulación para administración oral o como régimen de pastilla única coformulado con TDF/FTC, TAF/FTC o DTG, con una dosis oral diaria de 25 mg. Recientemente se ha aprobado en formulación intramuscular bajo la denominación Cabenuva, el primer tratamiento anti-VIH completo de acción prolongada aprobado por la FDA (2021). Esta formulación consta de una dosis inicial de 600 mg de Cabotegravir junto con 900 mg de RPV e inyecciones de continuación mensuales de 400 mg de Cabotegravir y 600 mg de RPV (31).

La C_{max} de RPV mostrada en estudios farmacocinéticos para pacientes que reciben una dosis diaria oral de RPV corresponde con 134 ± 72 (SD) ng/mL, mientras que en voluntarios que han recibido la formulación de acción prolongada de 600 mg a día 29 es de 120 ± 40 (SD) ng/mL y a día 57 132 ± 19 (SD) ng/mL (32).

Los efectos adversos más comunes de Edurant® son cuadros depresivos, dolor de cabeza, insomnio y erupción cutánea (33), mientras los declarados para Cabenuva son los efectos adversos secundarios al pinchazo, pirexia, fatiga, dolor de cabeza, dolor del músculo esquelético, náuseas, trastornos del sueño, mareos y erupción cutánea (31).

Aunque son poco frecuentes, la mayoría de los efectos adversos hepáticos relacionados con el uso de RPV se han producido en pacientes con coinfección con el VHB o VHC o con elevados niveles de transaminasas previos al tratamiento. Su hepatotoxicidad está probablemente relacionada con el hecho de que RPV es metabolizada mayoritariamente en el hígado por el citocromo CYP3A4, lo que puede producir metabolitos tóxicos o inmunogénicos capaces de desencadenar daño hepático (34,35).

RPV, en comparación con EFV, su predecesor como fármaco más utilizado en la familia de NNRTI, ha mostrado tener un mejor perfil de seguridad y tolerabilidad en pacientes naïve, sin mostrar menor eficacia que las combinaciones que incluyen EFV (36). En un estudio retrospectivo en el que se evaluó la seguridad hepática durante el primer año de terapia antirretroviral con una dosis diaria de RPV/FTC/TDF en pacientes coinfectados con VIH-1 y VHC se observó que la frecuencia de toxicidad hepática severa, evaluada mediante la elevación de los niveles de transaminasas y bilirrubina, es muy baja en pacientes con dicho tratamiento en comparación con los niveles en pacientes que recibían otras terapias, siendo menos hepatotóxico que otros fármacos antirretrovirales evaluados en otros trabajos (37). Diversos estudios han mostrado que pacientes bajo tratamiento con RPV presentan un mejor perfil lipídico que aquellos que reciben EFV (30,36,38–41) o PI, efecto que se ha asociado con una reducción significativa del ratio colesterol total/HDL, incluso en pacientes naïve cuando se ha realizado un seguimiento más prolongado que en otros estudios previos (30). Recientemente, un estudio ha evaluado el perfil lipídico en plasma de pacientes VIH-1 tomando EFV/FTC/TDF que han continuado su tratamiento con EFV o cambiado a RPV/FTC/TDF. En dicho estudio, RPV, comparada con EFV, además de reducir significativamente los niveles plasmáticos de lípidos y lipoproteínas, aumentó los de los metabolitos con propiedades antiinflamatorias, y redujo el depósito de lípidos tóxicos (41). En lo que respecta a la seguridad hepática, un

estudio prospectivo y observacional ha mostrado un aumento estadísticamente significativo en los valores de AST y ALT en los pacientes que cambiaron de un régimen basado en PI a uno basado en RPV, mientras que no se observaron cambios significativos en los que cambiaron de EFV/TDF/FTC y en los naïve que empezaron una terapia con RPV (30). Resultados similares fueron descritos en un estudio retrospectivo en el que se encontró un aumento ligero, aunque estadísticamente significativo, de AST y del índice de fibrosis hepática (FIB-4), y un descenso en los valores de HDL (42) en pacientes que cambiaron de otra cART a un régimen de pastilla única RPV/TDF/FTC. Hasta la fecha, se han notificado pocos casos de daño hepático agudo con RPV. En un informe de caso de un único paciente se observó una elevación en los niveles de ALT y bilirrubina total tras el cambio de tratamiento con RAL/ABC/3TC a RPV/ABC/3TC. La histología hepática reveló una necrosis centrolobulillar confluyente consecuencia de DILI (43). En otro caso, el cambio a un tratamiento con RPV/TDF/FTC produjo una elevación de las transaminasas que se calificó como “hepatitis alérgica grave” sin erupción cutánea, eosinofilia u otros inmunoalérgicos (44).

Estudios previos realizados en nuestro grupo evaluaron el efecto agudo del tratamiento *in vitro* con EFV, DRV, RPV o RAL en la función mitocondrial, la citotoxicidad, el estrés oxidativo y el estrés del retículo endoplásmico en la línea celular de hepatoma humano Hep3B. De los cuatro fármacos evaluados, EFV fue el único que alteró la función mitocondrial y comprometió la viabilidad y supervivencia de las células hepáticas, además de inducir estrés de retículo (45). En estudios más recientes realizados también por nuestro grupo se ha sugerido un efecto hepatoprotector de RPV en escenarios ajenos a la infección por VIH. En estas condiciones, RPV ha mostrado un efecto antiinflamatorio, antiesteatótico y antifibrótico en diferentes modelos animales de enfermedad hepática crónica (CLD, “chronic liver disease”). Concretamente, los resultados mostraron que RPV es capaz de reducir la fibrosis hepática mediante la activación selectiva de la proteína

transdutora y activadora de señales de la transcripción (“Signal Transducer and Activator of Transcription”, STAT)-1, que induce apoptosis en células estrelladas hepáticas (HSC, “hepatic stellate cells”) y la activación de STAT3 en hepatocitos, promoviendo así la regeneración hepática (46). Además, en este mismo estudio, los resultados de un análisis retrospectivo realizado con los datos públicos del Multicenter AIDS Cohort Study (MACS) realizado en los EE.UU. confirmaron que pacientes con VIH-1 tratados con terapia que contiene RPV muestran un mejor perfil de función hepática que los pacientes con regímenes antirretrovirales sin RPV. En línea con estos resultados, un estudio con pacientes coinfectados con VIH/VHC bajo tratamiento con terapia antiviral de acción directa frente al VHC mostró que se producía una mayor reducción en la rigidez hepática cuando se empleaba una terapia basada en NNRTI frente a otros tipos de cART. Este efecto podría atribuirse, al menos en parte, a la presencia de RPV en estos regímenes, ya que prácticamente un 72% de los pacientes tratados con NNRTI estaban recibiendo RPV (47).

I.2. FISIOPATOLOGÍA HEPÁTICA

I.2.1. ESTRUCTURA Y FISIOLOGÍA HEPÁTICA

El hígado es un órgano que realiza un amplio rango de funciones cruciales para el organismo, como son el metabolismo, el almacenamiento de glucógeno, la detoxificación de fármacos, la producción de proteínas séricas y la secreción de bilis (48). Para ello, el hígado requiere un alto nivel de vascularización, un flujo sanguíneo lento y un endotelio fenestrado altamente permeable que permite el contacto directo entre las células hepáticas y la sangre. Dado que todas esas funciones hepáticas son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis, las patologías hepáticas graves, como la hepatitis, la fibrosis y la cirrosis, a menudo presentan una alta tasa de morbilidad y mortalidad (49).

La unidad funcional del hígado es el lóbulo, estructura hexagonal compuesta por una vena central desde la cual irradian los cordones de hepatocitos hacia las tríadas portales (vena porta, arteria hepática y conducto biliar) situadas en los vértices del hexágono. Los cordones de hepatocitos son láminas unicelulares de hepatocitos separados por los sinusoides, que transportan la sangre desde las tríadas portales hasta la vena central (Fig. I.3.A) (49–51). Cada lóbulo (Fig. I.3.B) contiene un número variado de sinusoides, que son vasos discontinuos formados a partir de células endoteliales sinusoidales hepáticas fenestradas (LSEC, “liver sinusoidal endothelial cells”) especializadas del hígado. Las HSC se encuentran en el espacio de Disse, situado entre los cordones de hepatocitos y los sinusoides. Las células de Kupffer (KC, “Kupffer cells”), que son los macrófagos especializados residentes del hígado, también se encuentran en los sinusoides (49).

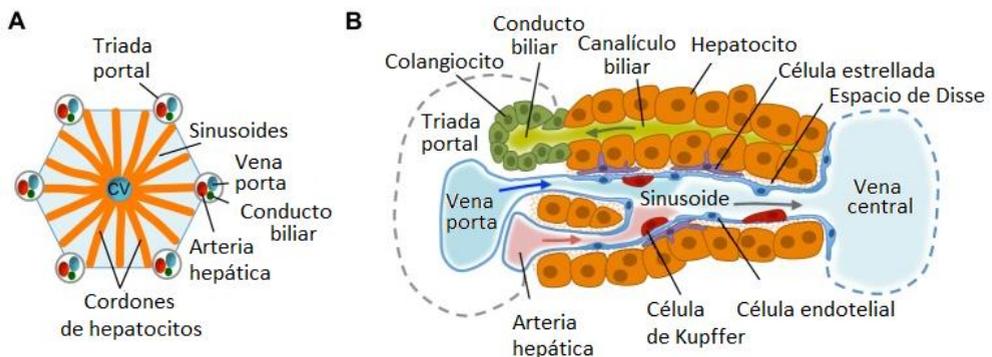


Figura I.3. Estructura del hígado y los tipos celulares presentes: lóbulo hepático (A) y sinusoides hepáticos (B). Adaptado de (49).

El hígado, además de su papel central como órgano metabólico, tiene una importancia crítica en la homeostasis y las respuestas inmunológicas al daño. En él se produce una intersección entre la circulación sistémica procedente de la arteria hepática y la sangre procedente del intestino por la vena porta (el 80% de la sangre hepática) que drena hacia las venas centrales. Esta sangre portal es rica en antígenos procedentes de la dieta o del ambiente, así como en moléculas de la

microflora intestinal. Esta posición de guardián otorga al hígado no solo la tarea de extraer y adaptarse a antígenos inocuos, sino también de identificar, unir, inactivar y filtrar antígenos potencialmente dañinos antes de ingresar en la circulación sistémica (52,53).

1.2.2. INFLAMACIÓN HEPÁTICA Y FIBROGÉNESIS

La inflamación es una parte integral de la respuesta hepática al daño. Es un proceso complejo que se origina como respuesta a diversas condiciones de estrés y, generalmente, sirve como mecanismo para proteger a los hepatocitos del daño, eliminar los restos celulares, favorecer el restablecimiento de la homeostasis y promover la reparación y regeneración del hígado. Sin embargo, las respuestas inflamatorias desreguladas conducen al daño de los hepatocitos, aumento de la infiltración de leucocitos y secreción de mediadores profibrogénicos. Las enfermedades hepáticas son diversas por su naturaleza en términos de etiología, cronicidad y posibilidad de recuperación, pero una característica constante es la presencia de inflamación, la cual se ha asociado con casi todos los tipos de lesión hepática, incluido el daño por patógenos, consumo excesivo de alcohol, lesión por isquemia/reperfusión, xenobióticos (como fármacos) y afecciones metabólicas como la esteatohepatitis alcohólica (ASH, “alcoholic steatohepatitis”), NASH y diabetes mellitus (54). Además, existe una aparente asociación entre la presencia de inflamación y un peor pronóstico para los pacientes (55).

Como se ha mencionado, la inflamación hepática también puede inducir una respuesta fibrogénica. La fibrogénesis es una respuesta reversible a una lesión celular aguda o crónica caracterizada por la acumulación de matriz extracelular (ECM, “extracellular matrix”) para mitigar el daño tisular. Si la agresión es aguda o autolimitada, estos cambios son transitorios y la arquitectura del hígado recupera su composición normal. Sin embargo, si la lesión se mantiene y la inflamación y la

acumulación de ECM persisten, se produce una sustitución progresiva del parénquima hepático por tejido cicatricial (fibrosis). Este proceso finalmente conduce al desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (56).

I.2.3. CÉLULAS CLAVE EN LA FISIOPATOLOGÍA HEPÁTICA

Durante la respuesta inflamatoria y fibrogénica, las células residentes en el hígado (hepatocitos, HSC, KC, colangiocitos y LSEC) y las células inmunes infiltradas (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) interactúan dinámicamente, ya sea para promover o para resolver la inflamación y la fibrogénesis (48).

Aunque cada población celular hepática ejerce un papel importante en el desarrollo de estos procesos, en esta tesis nos centraremos en las acciones fundamentales que ejercen los hepatocitos, los macrófagos hepáticos y las HSC.

I.2.3.1. HEPATOCITOS

Los hepatocitos son las principales células parenquimales del hígado, ocupando un 70-85% de su volumen. Ejercen principalmente funciones en el metabolismo, la detoxificación y la síntesis de proteínas. Su papel en la inmunidad innata se encuentra relacionado con la secreción a la sangre de proteínas específicas que controlan la infección bacteriana a través de diversos mecanismos, como proteínas bactericidas, opsoninas que ayudan en la fagocitosis, componentes importantes de las vías de señalización del lipopolisacárido (LPS), incluidos LBP (“LPS binding protein”), CD14 soluble y SMD-2 (“myeloid differentiation protein 2”), proteínas clave relacionadas con el metabolismo del hierro (transferrina, lipocalina-2, hemopexina, hepcidina) que limitan el crecimiento bacteriano, el factor de coagulación fibrinógeno y quimiocinas (CCL2, “C-C motif chemokine ligand 2”, y CXCL1, “C-X-C motif chemokine ligand 1”) para atraer células inmunes, como macrófagos y neutrófilos (57).

El daño de los hepatocitos puede causar estrés y muerte celular, lo que desencadena la liberación de señales de peligro denominadas patrones moleculares asociados al daño (DAMP, “damage-associated molecular patterns”). Esta liberación se puede producir de forma soluble o dentro de vesículas extracelulares con el fin de activar una respuesta inflamatoria estéril en las células inmunes y restaurar así la homeostasis tisular. Sin embargo, si el estímulo proinflamatorio persiste, la respuesta inflamatoria se agrava llegando a provocar inflamación crónica, remodelación tisular y fibrosis (58). Entre los DAMP asociados con la enfermedad hepática se encuentran HMGB1 (“high mobility group box 1”), ADN nuclear y mitocondrial, nucleótidos de purina (ATP, UTP), ácido úrico y la interleuquina (IL)-33 (59,60). Los DAMP son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, “pattern recognition receptors”) localizados tanto en la superficie celular como intracelularmente en las diferentes poblaciones celulares hepáticas, como veremos más adelante (59).

I.2.3.2. CÉLULAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS

Las HSC son la principal población de células hepáticas no parenquimales, representando aproximadamente un 10% de todas las células residentes (61).

En un hígado sano las HSC se mantienen en un estado quiescente (qHSC) y se localizan en el espacio de Disse, el espacio perisinusoidal entre los hepatocitos y las LSEC (Fig. I.3.B) (61). Las qHSC son el principal sitio de almacenamiento de vitamina A en el cuerpo y son fácilmente reconocibles por sus pequeñas gotas de lípidos perinucleares autofluorescentes (62). Las qHSC expresan factores de transcripción adipogénicos como PPAR γ (“peroxisome proliferator-activated receptor γ ”), receptor de adiponectina 1, perilipina 2 (PLIN2/ADFP), C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ (“CCAAT/enhancer-binding protein- α , β , δ ”) y SREBP-1c (“sterol regulatory element binding protein-1c”) (63). En condiciones fisiológicas, las HSC regulan el

recambio de la ECM en el espacio de Disse a través de la secreción de proteínas de ECM, enzimas que la degradan (MMP, “matrix metalloproteinases”) y sus inhibidores tisulares (TIMP, “tissue inhibitor of metalloprotease”) (64). Las qHSC también producen una variedad de factores de crecimiento y otros mediadores, incluido el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, “hepatocyte growth factor”), el mitógeno más potente para los hepatocitos, y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, “vascular endothelial growth factor”), un mitógeno para las células sinusoidales y endoteliales (64). Tras la lesión hepática, las HSC se activan (aHSC) y se diferencian en miofibroblastos fibrogénicos que se caracterizan por una disminución del almacenamiento de vitamina A con pérdida del fenotipo adipogénico (61,65). La activación de las HSC es una respuesta al daño compleja y estrechamente regulada que avanza a lo largo de la lesión. Consta de una fase de “iniciación” en la que las qHSC responden a una serie de citocinas y factores de crecimiento, predominantemente procedentes de macrófagos, y se producen alteraciones en la composición de la ECM. En esta fase, las HSC experimentan cambios en la expresión génica y el fenotipo, lo que las hace cada vez más sensibles a las citocinas y otros estímulos locales. Entre esas moléculas, el factor de crecimiento transformante β (TGF β , “transforming growth factor β ”) está generalmente considerado como la citocina fibrogénica más potente (66). La fase de “iniciación” va seguida de una fase de “perpetuación” durante la cual se amplifica el fenotipo de aHSC. Esta fase implica una mayor fibrogénesis, proliferación, contractilidad y quimiotaxis de las aHSC, con una degradación alterada de la ECM y señalización inflamatoria (61,64). Finalmente, si el estímulo dañino desaparece, sigue una fase de “resolución”, durante la cual las aHSC pueden eliminarse mediante apoptosis, senescencia o reversión a un fenotipo inactivado (Fig. I.4) (61).

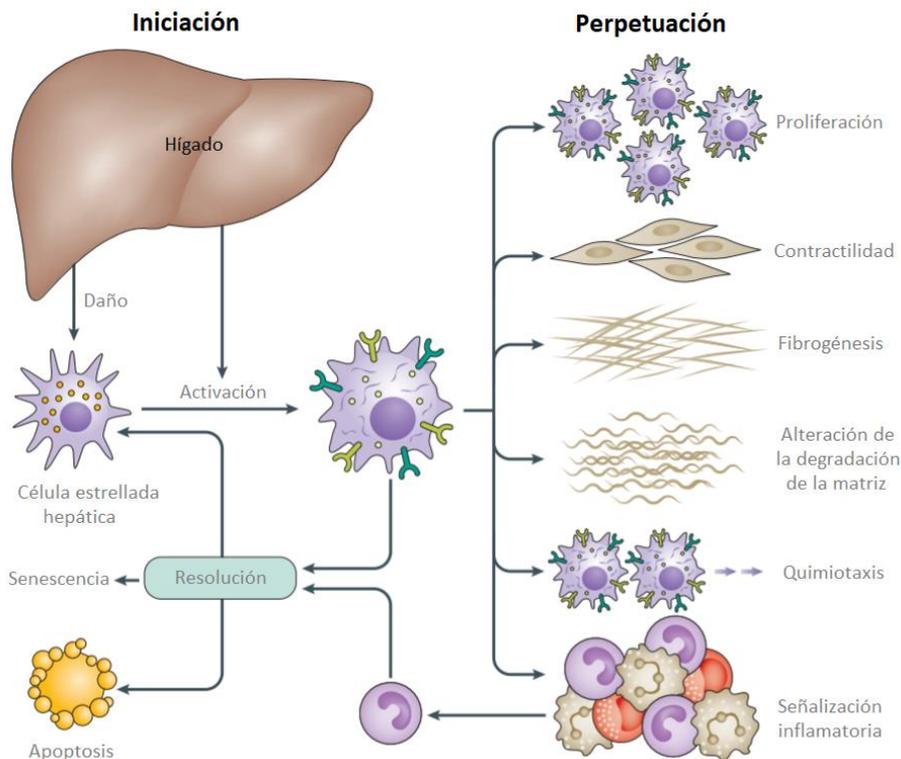


Figura I.4. Funciones, características y fenotipos de las células estrelladas hepáticas en el hígado sano y lesionado. Adaptado de (61).

Las HSC son los principales efectores de la fibrogénesis, contribuyendo al 80%-95% de los miofibroblastos fibrogénicos en las enfermedades hepáticas crónicas. Además de participar en la fibrosis hepática, las HSC contribuyen a diversas funciones, como son la inmunidad y la inflamación, la homeostasis energética y metabólica, y el inmunometabolismo (67). Las HSC regulan el sistema inmune hepático al interactuar directa o indirectamente con las células del sistema inmune y, por lo tanto, contribuyen al desarrollo de la inflamación y la enfermedad hepática. Esta interacción es bidireccional, las HSC reciben señales de los leucocitos dentro del entorno hepático, las amplifican y producen moléculas que, a su vez, se dirigen a los leucocitos y los modulan. Mediante la secreción de citocinas (IL-1 β , IL-6 o IL-8) (68), quimiocinas (CCL2, CCL5, CCL4 o CX3CL1, "C-X3-C motif chemokine

ligand 1”) y moléculas de adhesión (ICAM-1, “intercellular adhesion molecule-1”, y VCAM-1, “vascular cell adhesion molecule-1”), las aHSC promueven la quimiotaxis y la adhesión de los leucocitos, y también pueden regular la activación, diferenciación, proliferación, supervivencia y apoptosis de las células inmunes dentro del entorno hepático (69). Asimismo, las HSC pueden actuar como células presentadoras de antígenos (70) y responder a ligandos del sistema inmune innato a través de la señalización de receptores tipo Toll (TLR, “Toll-like receptor”) y la activación del inflamasoma (71,72). Se trata de células muy sensibles a las citocinas proinflamatorias y al LPS, lo que provoca la activación de vías de señalización proinflamatorias, como la mediadas por el factor nuclear kappa B (NF- κ B, “nuclear factor- κ B”) y la proteína activadora 1 (AP-1, “activator protein 1”), y la consecuente producción de quimiocinas y citocinas. Este circuito de retroalimentación inflamatoria positiva mantiene un estado de inflamación sostenido que asegura la supervivencia y activación de las HSC (73,74).

I.2.3.3. MACRÓFAGOS HEPÁTICOS

Para cumplir con la tarea de inmunovigilancia, el hígado alberga la mayor población de macrófagos tisulares del cuerpo humano, las KC, y también es patrullado por otras células mieloides (48,75). Estos macrófagos especializados representan un 80-90% de todos los macrófagos del cuerpo (48,76). Sin embargo, la población de macrófagos observada en el hígado tras sufrir un daño es heterogénea y se ha clasificado según su origen en los ya mencionados macrófagos residentes o KC, macrófagos derivados de monocitos procedentes de la médula ósea (MoMF, “monocyte-derived macrophages”), que migran procedentes del torrente sanguíneo, y macrófagos peritoneales, reclutados a las regiones subcapsulares del hígado en circunstancias específicas, como infección o cáncer. Los distintos orígenes celulares se han relacionado con diferencias en su función, así como en su

capacidad de respuesta hacia señales de activación y reclutamiento, lo que influye directamente en el resultado de la respuesta inmune (55).

Las KC tienen su origen en el saco vitelino durante el desarrollo embrionario y son capaces de autorrenovarse (65). Se ubican en el lado luminal de los sinusoides hepáticos donde, a través de largas expansiones citoplasmáticas, detectan alteraciones en su microambiente (Fig. 1.3.B). Las KC ejercen funciones cruciales durante la homeostasis, como la eliminación de patógenos sistémicos o procedentes del intestino, la regulación del metabolismo del hierro y la degradación de plaquetas. Además, debido a su posición, se encuentran entre los primeros tipos celulares en responder después de una lesión hepática (55).

A diferencia de las KC, los MoMF representan sólo una pequeña proporción de la reserva de macrófagos hepáticos en el hígado sano y se encuentran principalmente en la tríada portal (77). Tras la lesión hepática, las KC y otras células hepáticas (HSC, hepatocitos o LSEC) secretan quimiocinas, como CCL2 o CXCL1, que provocan la infiltración masiva de monocitos procedentes de la médula ósea al hígado donde se diferencian a macrófagos, aumentando considerablemente la reserva de macrófagos hepáticos (52,78–80). Principalmente, las KC se consideran fagocitos tolerogénicos, mientras que los MoMF representan un fenotipo inflamatorio (52). Sin embargo, el fenotipo funcional de ambas poblaciones macrofágicas y su diferenciación son muy diversos y dependen de la interacción entre estos fagocitos y su microambiente. En el hígado dañado, el microambiente se altera radicalmente, las células activadas y estresadas liberan mediadores inflamatorios mientras que aumenta el número de células muertas. Estos cambios tienen un gran impacto en los fenotipos de las KC y los MoMF, lo que determinará la contribución funcional de los macrófagos a la restauración tisular o al agravamiento de la lesión hepática (Fig. 1.5).

En ratones sanos se han identificado dos poblaciones principales de MoMF basándose en la expresión del complejo del antígeno linfocítico 6, locus C1 (Ly6C, “lymphocyte antigen 6C”). Los MoMF Ly6C^{hi} tisulares (caracterizados como células CCR2⁺CX3CR1⁺CD43⁻) se han propuesto como células proinflamatorias potentes y las principales responsables de la inflamación aguda, mientras que las células Ly6C^{low} (que se definen como CX3CR1^{hi}CCR2⁻CD43⁺) muestran propiedades pro-resolutivas y pueden servir como precursoras de las células dendríticas. Los MoMF Ly6C^{hi}, además, son los precursores de los MoMF Ly6C^{low} (52,55,77). Los monocitos humanos, en cambio, se clasifican por su expresión de CD14 y CD16 como monocitos clásicos CD14^{hi}CD16⁻, intermedios CD14⁺CD16⁺ y no clásicos CD14⁻CD16^{hi}. Por sus perfiles de expresión génica, los monocitos humanos CD14^{hi}CD16⁻ y CD14⁻CD16^{hi} se han identificado con los monocitos de ratón Ly6C⁺ y Ly6C⁻, respectivamente.

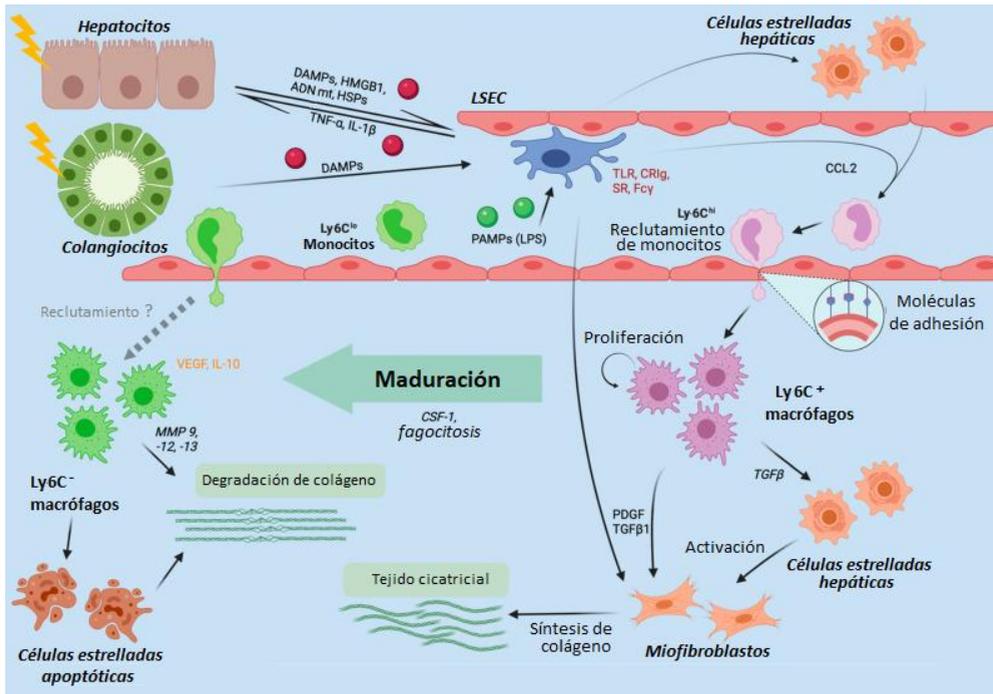


Figura I.5. (Página anterior) Macrófagos hepáticos en el inicio, la progresión y la resolución de la lesión hepática. Tras la lesión de los hepatocitos o colangiocitos se liberan patrones moleculares asociados al daño (DAMP), como ADNmt o la proteínas de choque térmico (HSP). Además, productos de la microbiota intestinal (como el LPS) procedentes del flujo venoso portal actúan como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Los DAMP y PAMP activan las células de Kupffer, que a su vez secretan citocinas inflamatorias (TNF α , IL-1 β) y quimiocinas (CCL2). Mientras que TNF α e IL-1 β contribuyen aún más a la lesión de los hepatocitos, CCL2 recluta monocitos Ly6C^{hi} del torrente sanguíneo para infiltrar el tejido y diferenciarse en macrófagos Ly6C⁺ inflamatorios, fibrogénicos y angiogénicos. Si la inflamación no cede, los macrófagos Ly6C⁺ activarán las células estrelladas hepáticas para que se conviertan en miofibroblastos productores de colágeno formando tejido cicatricial. En caso de resolución de la inflamación, los macrófagos Ly6C⁺ madurarán a macrófagos Ly6C restauradores y antiinflamatorios, que promueven la degradación del tejido cicatricial por las metaloproteinasas que degradan la matriz (MMP). Adaptado de (52).

La heterogeneidad y plasticidad de los macrófagos se expresa mediante una gran diversidad de citocinas liberadas, marcadores de superficie celular y perfiles transcripcionales. Para adaptarse al amplio espectro de funciones y fenotipos, los macrófagos sufren un proceso denominado polarización. Tradicionalmente, se han clasificado como macrófagos clásicamente activados, M1, y macrófagos alternativamente activados, M2. La nomenclatura M1/M2 deriva de las respuestas inmunes generadas por las citocinas que inducen dichos fenotipos, ya que IFN γ (“interferon γ ”) está vinculado con respuestas inmunes de tipo TH1, mientras que las IL-4 e IL-13 con respuestas de tipo TH2. El LPS también promueve la generación de macrófagos M1 (81). Los macrófagos M1 mostrarían características proinflamatorias, como la expresión de iNOS (“inducible nitric oxide synthase”), y la secreción de TNF (“tumor necrosis factor”), IL-1 β o especies reactivas de oxígeno (ROS, “reactive oxygen species”), mientras que los macrófagos M2 tendrían características antiinflamatorias o pro-resolutivas, como la expresión de arginasa 1, el receptor de manosa de macrófagos 1 (Mrc1; también conocido como CD206), la secreción de IL-10 o la alta capacidad fagocítica. Sin embargo, esta nomenclatura se basa en estados de polarización inducidos *in vitro* y no refleja adecuadamente la compleja heterogeneidad de la polarización de los macrófagos en el hígado *in vivo* (55,82); es más, se ha demostrado la coexistencia de diferentes fenotipos de

activación incluso en un hígado sano (83). Además, una vez activados, los macrófagos son capaces de cambiar su fenotipo tanto *in vitro* como *in vivo*.

La polarización de los macrófagos está controlada por diferentes mecanismos moleculares, que incluyen vías de señalización, regulación de la actividad de factores de transcripción, mecanismos epigenéticos y reguladores postranscripcionales. Los factores de transcripción STAT1, AP-1, IRF5 (“interferon regulatory factor 5”) y NF-κB están implicados en la polarización de macrófagos M1, mientras que STAT3, STAT6, PPARs, KLF4 (“Krüppel like factor 4”), IRF4 y c-Myc están asociados con la polarización de macrófagos M2 (81,84–86) (Fig. I.6). Además, existe una estrecha regulación entre ellos. Se ha demostrado que la activación de STAT6 suprime la activación de STAT1 (87), mientras que STAT6 actúa como un factor facilitador de PPARγ promoviendo su unión al ADN y, en consecuencia, aumentando la expresión génica de sus genes diana y la magnitud de las respuestas (88). Por su parte, la activación de PPARγ reduce la respuesta inflamatoria al impedir la actividad transcripcional de NF-κB, STAT1 y AP-1 mediante un mecanismo denominado transrepresión (89–91).

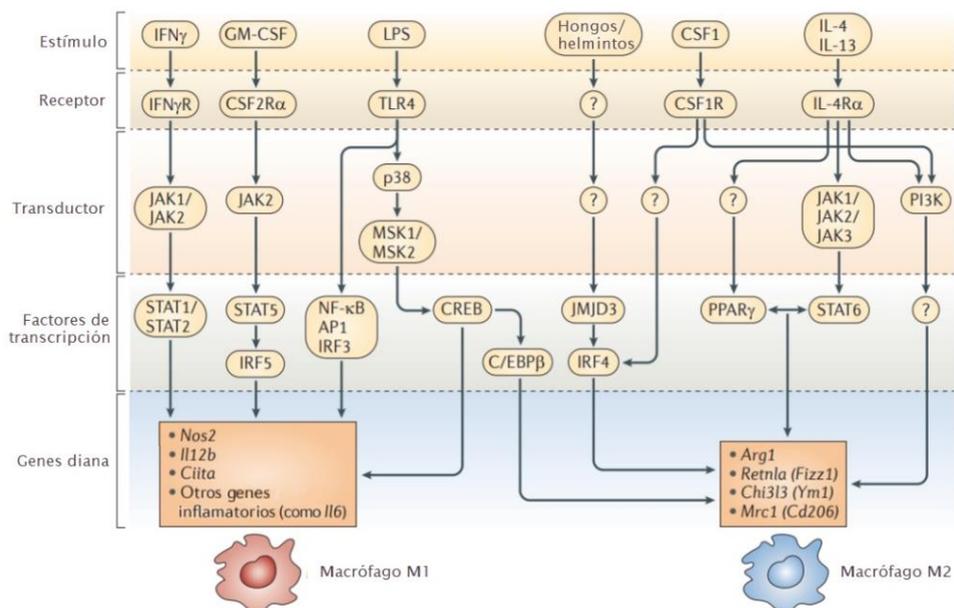


Figura I.6. (Página anterior) Vías de transducción de señales hacia la polarización de macrófagos M1 y M2. Un estímulo inicial conduce a la activación de factores de transcripción que median los cambios en la producción transcripcional. También se muestran los principales genes que son característicos del fenotipo M1 o M2. *Arg1*: arginasa 1; *C/EBPβ*: proteína de unión al potenciador CCAAT β; *Chi3l3*: chitinase 3-like 3; *Ciita*: MHC class II transactivator; *CREB*: proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP; *CSF*: factor estimulante de colonias; *IFNγ*: interferón γ; *IL*: interleuquina; *IRF*: factor regulador del interferón; *JAK*: Janus quinasa; *LPS*: lipopolisacárido; *Mrc1*: receptor de manosa de macrófagos 1; *MSK*: quinasa activada por mitógeno y estrés; *NF-κB*: factor nuclear-κB; *Nos2*: óxido nítrico sintasa 2; *PI3K*: fosfoinositol 3-quinasa; *PPARγ*: receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ; *Retnla*: resistin-like-α; *STAT*: proteína transductora y activadora de señales de la transcripción; *TLR4*: receptor tipo Toll 4. Adaptado de (81).

Una de las funciones centrales de las KC en el hígado es la vigilancia constante de amenazas infecciosas o no infecciosas a la integridad del tejido. Para desempeñar dicha función, las KC presentan numerosos PRR capaces de detectar patógenos y moléculas peligrosas para su posterior eliminación. Los PRR comprenden al menos dos familias de proteínas de detección: TLR y NLR, que detectan señales de peligro que incluyen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, “pathogen-associated molecular patterns”) y DAMP o alarminas (52,65). En el hígado, los PAMP como el LPS y la flagelina proceden principalmente del intestino y su presencia en el hígado es resultado de una alteración de la composición de la microbiota intestinal y de un aumento de la permeabilidad del intestino (52,77).

En los últimos años, se ha profundizado en la función que desempeñan los macrófagos en la regulación de la fibrosis hepática, sobre la que ejercen un papel dual participando tanto en su progresión como en su resolución (92–94). Durante la progresión de la fibrosis, la inflamación inducida por el daño desencadena el reclutamiento de macrófagos al hígado, donde estos producen factores de crecimiento (PDGF “platelet derived growth factor” y TGFβ), citocinas (TNFα e IL-1β) y quimiocinas (CCL2 y CCL5) para inducir la activación y supervivencia de los miofibroblastos (52). Sin embargo, durante la regresión de la fibrosis hepática, los MoMF se someten a un proceso de maduración que se caracteriza en ratones por la regulación a la baja del marcador de superficie Ly6C, adquiriendo un fenotipo

antifibrótico. Además, se detiene la producción de factores fibrogénicos e inflamatorios y, en su lugar, secretan MMP como MMP9 y MMP12 (95) y moléculas como TRAIL (“TNF-related apoptosis-inducing ligand”) (96), que promueven la apoptosis de miofibroblastos. Los MoMF también participan en la desactivación de los miofibroblastos, induciendo su reversión a un estado inactivo o de senescencia que convierte a estos últimos en objetivos de las células NK citotóxicas (p.ej. mediante la secreción de IL-22) (77,92,97).

1.2.4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA INFLAMACIÓN Y LA FIBROSIS HEPÁTICA

1.2.4.1. NF- κ B

La vía de señalización de NF- κ B es una vía evolutivamente conservada con funciones clave en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria. El factor de transcripción NF- κ B puede estar compuesto por un heterodímero o un homodímero de varios miembros de la familia Rel de proteínas de unión al ADN. La familia NF- κ B humana consta de cinco subunidades de unión al ADN celular: p50, p52, cRel, p65 (también llamado RelA) y RelB, codificadas por *NFKB1*, *NFKB2*, *REL*, *RELA* y *RELB*, respectivamente (98). De ellas, p65 es probablemente la subunidad responsable de la actividad transcripcional más fuerte de NF- κ B (99).

NF- κ B se activa por diversos estímulos que suponen un peligro potencial para el organismo, lo que da como resultado el inicio de respuestas inflamatorias, inmunes, de cicatrización de heridas y de eliminación de patógenos. Entre los activadores más potentes de NF- κ B se encuentran moléculas derivadas de patógenos (como LPS, ADN y ARN viral y bacteriano), que estimulan los TLR, así como citocinas proinflamatorias como TNF o IL-1. La activación de NF- κ B conduce a la transcripción de cientos de genes que contienen sitios de unión a κ B, la mayoría de los cuales

están implicados en la regulación de la inflamación, las respuestas inmunitarias y la supervivencia celular (100).

Una inflamación descontrolada puede ser perjudicial, por lo que la actividad de NF- κ B está estrictamente regulada a varios niveles. En una célula no estimulada, la actividad de NF- κ B está principalmente regulada por la unión a unidades inhibitoras del grupo de proteínas I κ B (“inhibitor of κ B”), como I κ B α (la más prominente), I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , I κ B ζ y la proteína Bcl3 (“B-cell lymphoma 3”). La unión de I κ B a NF- κ B enmascara el sitio de localización nuclear de NF- κ B y secuestra a NF- κ B en el citoplasma. De modo que, para activar NF- κ B en respuesta a estímulos específicos, primero es necesario liberar NF- κ B de su inhibidor I κ B, para que pueda trasladarse al núcleo e iniciar la transcripción de genes. En la vía canónica, la fosforilación de I κ B es la marca para su consecuente degradación por el proteasoma (100).

NF- κ B tiene una amplia gama de funciones en las distintas poblaciones celulares hepáticas. En los hepatocitos ejerce una actividad antiapoptótica, aunque cuando se produce una sobreactivación patológica esta acción supone una actividad proinflamatoria (100). En los macrófagos hepáticos promueve la inflamación del hígado al aumentar la producción de citocinas proinflamatorias que son reguladas por NF- κ B, como TNF α , IL-1 β e IL-6. Además, se ha descrito que su inhibición en KC atenúa la fibrosis inducida por CCl $_4$ en un modelo animal (101). En las HSC la activación de NF- κ B da como resultado la estimulación de la fibrogénesis debido al aumento de la supervivencia de las aHSC. Esta activación se ha observado como consecuencia de la liberación de citocinas por parte de los macrófagos hepáticos (102). Toda esta amplia variedad de funciones supone que NF- κ B ocupa un lugar central en la regulación de los aspectos clave de la CLD y en la respuesta de cicatrización de heridas resultante, por lo que su activación puede ser determinante

del desenlace de la enfermedad, es decir, su resolución o progresión a fibrosis y/o el desarrollo de hepatocarcinoma (100).

I.2.4.2. INFLAMASOMA

El inflamasoma es una familia de complejos multiproteicos que reconocen diferentes señales de daño, estrés y microbianas. Está presente en el citosol de diversas células hepáticas (macrófagos, HSC, LSEC y hepatocitos) y de parte del sistema inmunológico innato. Consiste en una proteína sensor, NLR (“NOD-like receptor”), y una proteína adaptadora ASC (“apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain”), que proporciona un vínculo entre dicho receptor y la proforma de la enzima efectora pro-caspasa-1, a través de su dominio PYD en el extremo N-terminal y su dominio CARD en el extremo carboxi-terminal, respectivamente (103).

La activación del inflamasoma conduce a la autoactivación de la pro-caspasa-1 inactiva, de 45 kDa, en las subunidades p20 y p10 que forman la caspasa-1 activa. Esta, a su vez, produce la escisión de las citocinas proinflamatorias pro-IL-1 β y pro-IL-18 en sus formas maduras (103,104). La activación del inflamasoma requiere dos señales esenciales. La primera señal induce la transcripción de los componentes del inflamasoma y citocinas para la respuesta inflamatoria, mientras que la segunda señal desencadena la liberación de dichas citocinas. En el primer paso, los PRR como los TLR se activan mediante PAMP o DAMP que indican daño celular. Estos PRR están acoplados a la proteína adaptadora MyD88 que, a través de la interacción con NF- κ B, induce la expresión de proteínas del inflamasoma y citocinas proinflamatorias. La segunda señal se inicia mediante la activación del NLR por diversos estímulos como el ATP libre (vía el receptor P2X₇), ROS o el incremento en el flujo de Ca²⁺ (52,77). Numerosas proteínas NLR pueden estar involucradas en la activación de la inflamación (NLRP1, NLRP3, NLRC4 y AIM2, “absent in melanoma

2”), sin embargo, el inflamasoma NLRP3 (“Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing”) es uno de los más estudiados. En presencia de PAMP o DAMP, NLRP3 se oligomeriza y se une a ASC para ensamblar el inflamasoma, reclutando y activando a la caspasa-1. En consecuencia, la caspasa-1 activa la IL-1 β , la IL-18 y una proteína citosólica, la gasdermina D (GSDMD), que facilita la liberación de IL-1 β e IL-18 de la célula formando poros en la membrana plasmática (105). Además, supone la liberación de compuestos intracelulares que actúan como DAMP, lo que induce inflamación y muerte celular mediante un proceso denominado piroptosis (106). Si bien la mayoría de las células requieren un proceso de dos pasos, con cebado y activación del inflamasoma, los MoMF pueden activarse rápidamente en un proceso de un solo paso mediante la estimulación simultánea de TLR y NLRP3 (107).

Diversos estudios han demostrado la participación de la activación del inflamasoma NLRP3 en células del sistema inmune y no inmunes (como hepatocitos y HSC) en el desarrollo y cronicidad de patologías hepáticas como la fibrosis, NAFLD (108–112) o ASH (113,114).

I.2.4.3. PROTEÍN-QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)

La señalización por proteín-quinasas activadas por mitógenos (MAPK, “mitogen-activated protein kinases”) en el hígado ocurre en respuesta al estrés físico y químico, entre estas señales activadoras se encuentran alteraciones en los nutrientes, factores de crecimiento, citocinas, matriz extracelular, daño del ADN, fármacos y toxinas. En mamíferos, se han identificado tres grupos principales de MAPK que se nombran de acuerdo con su MAPK de ejecución: quinasas reguladas por señal extracelular (ERK, “extracellular signal-regulated kinases”), quinasas p38 y c-Jun N-terminal quinasas (JNK, “c-Jun N-terminal kinases”). Cada uno de estos grupos es activado por una cascada de proteín-quinasas que constan de al menos

tres componentes o niveles: MAP3K, MAP2K y MAPK. Las ERK son activadas principalmente por mitógenos, y las quinasas JNK y p38 se activan por el estrés, por lo que se clasifican juntas como proteín-quinzas activadas por estrés (SAPK, “stress-activated protein kinases”).

En el hígado, se ha descrito que la vía de señalización por SAPK ejerce un papel importante en la lesión y en el desarrollo de patologías hepáticas como DILI, hepatitis vírica, inflamación, NAFLD, NASH, ASH, isquemia/reperfusión, fibrosis, regeneración y carcinogénesis (115).

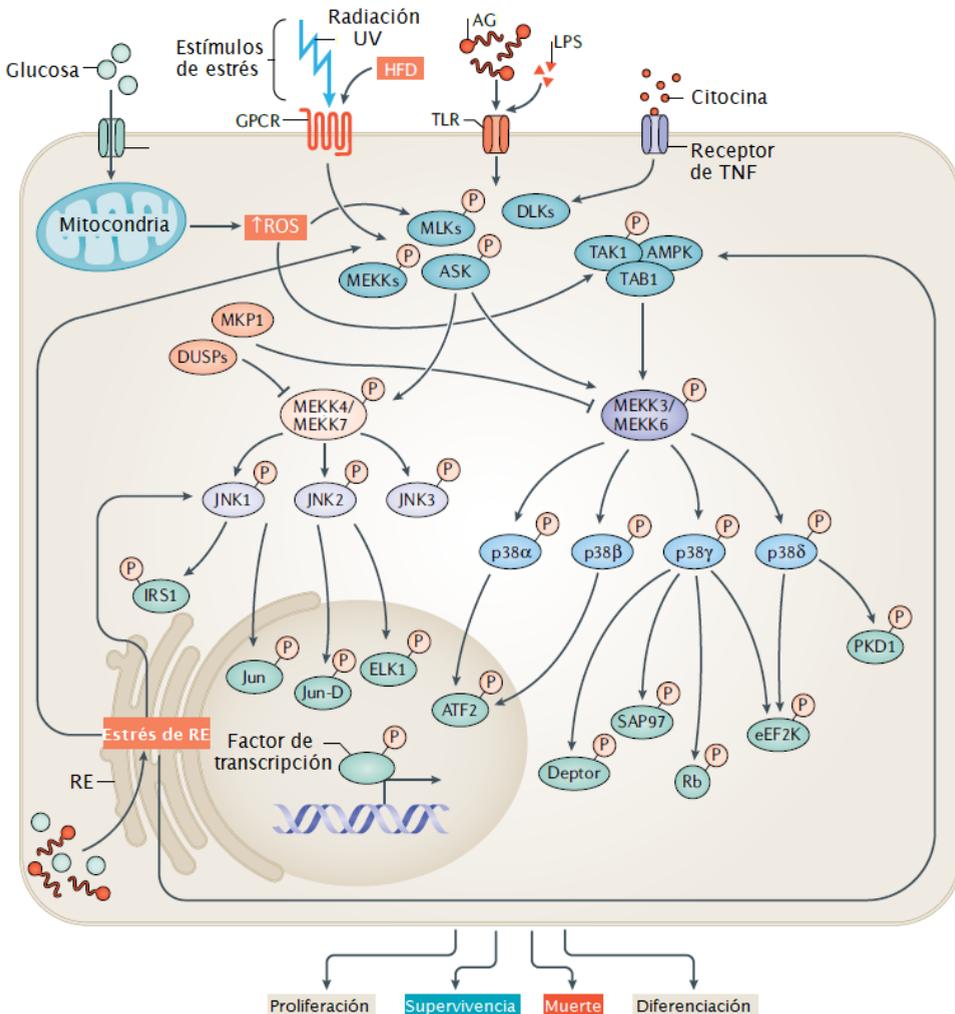


Figura I.7. (Página anterior) Ruta de señalización de las proteín-quinasas activadas por estrés (SAPK). JNK: c-Jun N-terminal quinasa; AG: ácidos grasos libres; LPS: lipopolisacárido; UV: ultravioleta; GPCR: receptor acoplado a proteína G; TLR: receptores tipo Toll; ROS: especies reactivas de oxígeno; HFD: dieta rica en grasa; IRS1: sustrato del receptor de insulina 1; MAPK: proteín-quinasa activada por mitógenos; MKK: quinasa de MAPK (mostrado en rosa o violeta); MKKK: quinasa de MKK (mostrado en azul); AMPK: proteín-quinasa activada por AMP; DUSP: fosfatasa de especificidad dual; MKP1: fosfatasa de MAPK 1; MLK: quinasa de linaje mixto; PKD1: proteín-quinasa D1. Adaptado de (116).

a. c-Jun N-Terminal Quinasas

Bajo la denominación de JNK se engloban tres proteín-quinasas codificadas por diferentes genes: *MAPK8*, *MAPK9* y *MAPK10* que codifican para JNK1, JNK2 y JNK3, respectivamente. En el hígado se expresan JNK1 y JNK2, pero no JNK3 (117). Las JNK son activadas por diversos estímulos (incluidos TLR, IL-1 β , TNF α , ROS y ácidos grasos libres) y sus sustratos incluyen factores de transcripción, como c-Jun, Jun B, Jun D y Fos, que son los componentes del factor de transcripción AP-1.

JNK participa en múltiples cascadas de señalización con relevancia para la lesión hepatocelular, el metabolismo, la inflamación y la fibrosis hepática, de hecho, la señalización por JNK está asociada con la muerte y supervivencia celular y con la diferenciación, proliferación y carcinogénesis en hepatocitos. En los hepatocitos se ha descrito que la activación de JNK inhibe la señalización de la insulina, incrementa la producción mitocondrial de ROS e induce apoptosis (115,118). En las células no parenquimales, como los macrófagos hepáticos y las HSC, JNK participa en la inflamación y la fibrosis (117). Así, en los macrófagos la activación de JNK está asociada al desarrollo de la inflamación y su polarización a un fenotipo M1 (119,120) mientras que, en las HSC, JNK participa en su activación y proliferación contribuyendo al desarrollo de fibrosis (121).

Se ha observado una fuerte activación de JNK en el hígado, el tejido adiposo y los tejidos musculares en ratones sometidos a una dieta rica en grasas (HFD, “high fat diet”), en ratones genéticamente obesos (ob/ob) y en un modelo de NASH con dieta

deficiente en metionina y colina (MCD) (122–124). En este último modelo que causa esteatosis hepática, con lesiones e inflamación, pero no induce características metabólicas extrahepáticas como obesidad y resistencia a la insulina, la deficiencia de JNK1 protegió de los efectos de la dieta, sin embargo, la deficiencia de JNK2 no tuvo ningún efecto (124).

b. MAPK p38

La MAPK p38 es un regulador clave de numerosos procesos biológicos, incluidas las respuestas inflamatorias, así como la proliferación y la supervivencia celular. La familia p38 tiene cuatro isoformas codificadas por distintos genes ubicados en tándem en dos cromosomas: p38 α (*MAPK14*) y p38 β (*MAPK11*), y p38 γ (*MAPK12*) y p38 δ (*MAPK13*) (125).

p38 α es muy abundante en la mayoría de los tipos celulares, siendo la isoforma predominante en los monocitos y macrófagos (126). Aunque p38 α se ha estudiado ampliamente en macrófagos, su papel sigue siendo controvertido, probablemente debido a las diferentes condiciones experimentales, líneas celulares, tipos de macrófagos y/o diferentes estímulos utilizados. Su activación en macrófagos ha mostrado tener un efecto proinflamatorio al inducir la secreción de citocinas proinflamatorias y la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M1 (127,128), aunque también se ha descrito su participación en la activación alternativa de los macrófagos inducida por IL-4 (129). p38 también actúa sobre la vía de NF- κ B aumentando su accesibilidad a sitios de unión en algunos promotores, como los de IL-8 y CCL2, en parte mediando la fosforilación y fosfoacetilación de H3, induciendo así su actividad transcripcional (130).

La expresión de p38 α , p38 δ y p38 γ se ha visto aumentada en hígados de pacientes con NAFLD (125). Por su parte, se ha observado que la activación de p38 α en macrófagos promueve la progresión de NASH (131), mientras que la delección de

p38 γ/δ en neutrófilos ha mostrado reducir su migración al hígado dañado y el desarrollo de esteatosis (132).

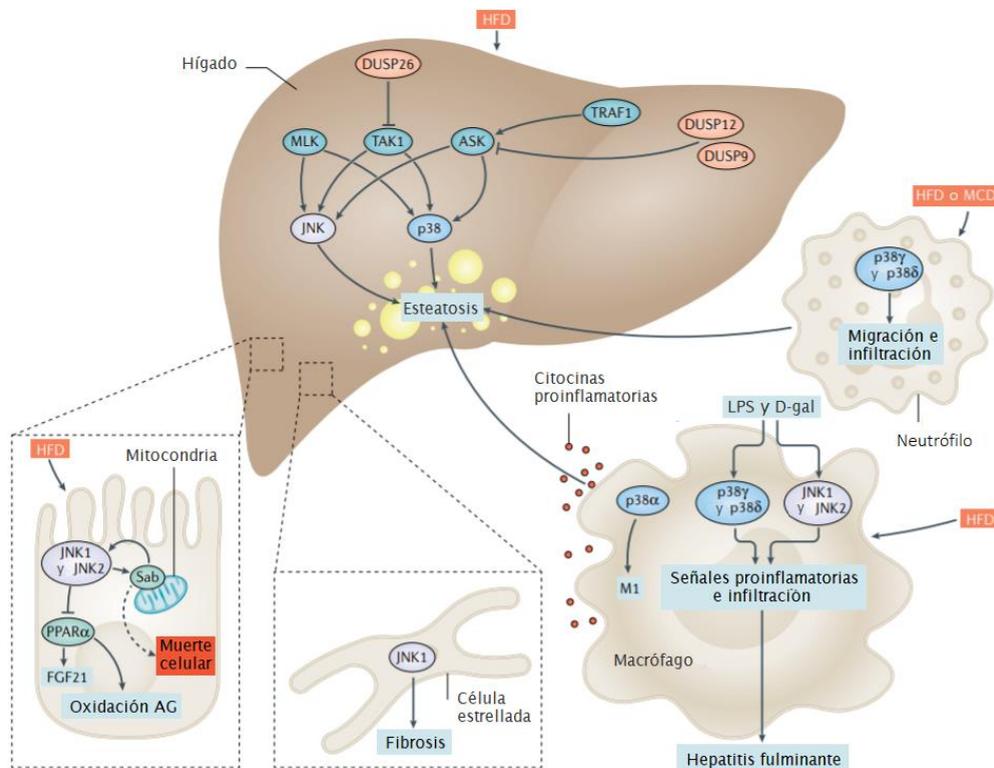


Figura I.8. Vías de las proteínas-quinasas activadas por estrés (SAPK) en el hígado. JNK: c-Jun N-terminal quinasa; AG: ácidos grasos libres; LPS: lipopolisacárido; D-gal: D-galactosamina; HFD: dieta rica en grasa; MCD: dieta deficiente en metionina y colina; DUSP: fosfatasa de especificidad dual; MLK: quinasa de linaje mixto; PPAR α : receptor activado por proliferadores de peroxisomas α . Adaptado de (116).

I.2.4.4. EJE CCL2-CCR2

La inflamación del hígado está regulada por quimiocinas que controlan la actividad y la migración de diversas células hepáticas (hepatocitos, KC, HSC y LSEC) y células inmunes circulantes. Entre ellas CCL2 y CCL5 son las mejor caracterizadas y han sido relacionadas con la patogenia de la inflamación y de la fibrosis hepática, contribuyendo al desarrollo de la NAFLD y NASH (133).

CCL2, también conocido como MCP-1 (“monocyte chemoattractant protein-1”), es secretado en el hígado en grandes cantidades por las KC y aHSC, pero también por hepatocitos dañados y LSEC (133). La expresión de CCL2 es inducible y se desencadena tras la exposición a diversos estímulos inflamatorios, como IL-1, IL-4, IL-6, TNF α , TGF β , LPS, IFN γ , PDGF, VEGF, M-CSF (“macrophage colony-stimulating factor”) y GM-CSF (“granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”). CCL2 envía señales a sus células diana mediante la unión y la activación del receptor transmembrana acoplado a proteína G CCR2, presente principalmente en monocitos, macrófagos y células T activadas. Se conocen varias cascadas de señalización intracelulares de CCR2, entre las que se encuentra la activación de la señalización de JAK2/STAT3, MAPK y PI3K (“phosphoinositide 3-kinase”), que participan en la promoción de la migración celular, así como en la liberación de calcio mediada por fosfolipasa C. Además, CCL2 puede unirse a los receptores de quimiocinas atípicos ACKR1 y ACKR2 (“atypical chemokine receptors 1 and 2”) (134). Aunque la función mejor caracterizada de CCL2 es la quimiotaxis, se ha demostrado que CCL2 no solo actúa creando un gradiente quimiotáctico durante la extravasación de monocitos, sino que también puede controlar la adhesión celular modulando la expresión y localización de integrinas, así como la liberación de ácido araquidónico. CCL2 también puede prolongar la residencia de las células infiltradas en los sitios de inflamación al influir en la apoptosis y/o en las moléculas que controlan la supervivencia de las células inmunes. Además, CCL2 puede desempeñar un papel en la activación de los monocitos para producir citocinas inflamatorias, y se ha demostrado que CCL2 influye en la polarización de los macrófagos; sin embargo, su efecto hacia una polarización M1 o M2 parece depender del contexto en el que tiene lugar (134).

Tanto CCL2 como su receptor CCR2 se regulan positivamente en el hígado lesionado, promoviendo la migración de monocitos circulantes al tejido hepático dañado y, por tanto, la inflamación, fibrosis y esteatosis hepáticas (135). También

se ha demostrado la participación de la señalización de CCL2 en el desarrollo de resistencia a la insulina, inflamación del tejido adiposo y esteatosis hepática en modelos murinos de obesidad (136). En pacientes obesos, el aumento de la presencia de los macrófagos CCR2⁺ en el tejido adiposo visceral se asoció con una mayor gravedad histológica de NASH (137). CCR2 también actúa sobre las HSC promoviendo su quimiotaxis y, por tanto, la fibrosis hepática (138); así, el eje CCR2/CCL2 se encuentra activado en hígados fibróticos de pacientes con NASH acompañado de una acumulación de macrófagos proinflamatorios (137).

1.2.5. ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (NAFLD)

La NAFLD es la enfermedad hepática más común en la población general, ya que se estima que afecta aproximadamente al 24% de la población mundial (139), y representa la causa de trasplante hepático de crecimiento más rápido en los países occidentales (140). En personas mono infectadas por el VIH-1, la NAFLD es la causa subyacente más frecuente de alteración en los niveles plasmáticos de marcadores de función hepática y su prevalencia podría ser mayor que en la población general, aunque existen discrepancias entre estudios (141,142). El término de NAFLD engloba un amplio espectro de enfermedades hepáticas que se presentan sin una ingesta significativa de alcohol (52). La NAFLD está asociada con la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, la presencia de hiperlipidemia y resistencia a la insulina, y representa la manifestación hepática del síndrome metabólico (52,65). La secuencia fisiopatológica típica comienza con la aparición de esteatosis hepática, una acumulación histológica de triglicéridos en más del 5% de los hepatocitos, que evoluciona hasta NASH en el 7-30% de los pacientes, la forma progresiva de la enfermedad caracterizada por la presencia de inflamación crónica y una lesión necrótica de los hepatocitos (143). El siguiente estadio incluiría el desarrollo de fibrosis, con progresión a cirrosis y, finalmente, carcinoma hepatocelular (Fig. 1.9). Recientemente, un panel de expertos internacionales ha publicado una declaración

de consenso que propone el cambio de nombre de NAFLD a enfermedad de hígado graso asociado al metabolismo (MAFLD, “metabolic-associated fatty liver disease”) (144). Este cambio no propone únicamente un cambio de nombre, sino también un conjunto de nuevos “criterios positivos” para el diagnóstico de MAFLD, independientemente del consumo de alcohol u otras enfermedades hepáticas concomitantes, dado el aumento dramático en la prevalencia mundial de esta enfermedad. Estos “criterios positivos” se basan en pruebas histológicas, técnicas de imagen o biomarcadores sanguíneos, además de uno de los tres criterios siguientes, sobrepeso/obesidad, presencia de diabetes mellitus tipo 2 o desregulación metabólica. Esta nomenclatura abandonaría la estratificación en NAFLD y NASH, que puede no definir el espectro completo del curso de la enfermedad (144). Sin embargo, debido a lo novedoso de este término, en esta tesis continuaremos con la terminología NAFLD/NASH que ha acompañado a la bibliografía.

El mecanismo subyacente para el desarrollo y progresión de la NAFLD humana es complejo y para explicarlo se han formulado diferentes teorías. Hoy en día, la teoría predominante engloba a múltiples factores paralelos que actúan sinérgicamente en individuos genéticamente predispuestos, denominada hipótesis de múltiples impactos (“multiple-hit hypothesis”). Entre estos impactos se incluyen la resistencia a la insulina, una producción alterada de citocinas y adipocinas, factores nutricionales, la microbiota intestinal y factores genéticos y epigenéticos (145). La grasa se acumula en el hígado en forma de triglicéridos, al mismo tiempo que aumenta la lipotoxicidad por niveles elevados de ácidos grasos libres, colesterol y otros metabolitos lipídicos. Como consecuencia se produce disfunción mitocondrial con estrés oxidativo y producción de ROS, y se activan los mecanismos asociados al estrés de retículo endoplasmático. El aumento de la permeabilidad intestinal supone un incremento en los niveles circulantes de moléculas, como el LPS, que contribuyen a la activación de vías inflamatorias y la liberación de citocinas

proinflamatorias como IL-6 y TNF α . Todo ello conlleva la inducción de daño hepatocelular, con posible activación de la apoptosis en los hepatocitos y la activación de las HSC. De hecho, se ha demostrado que las HSC tienen una mayor sensibilidad al TGF β como consecuencia del aumento de la acumulación de colesterol libre en ellas, lo que da como resultado una fibrosis hepática exacerbada en la NASH (146). La activación de los macrófagos hepáticos también resulta clave en la progresión de la NAFLD, siendo la acumulación de macrófagos CCR2⁺ proinflamatorios alrededor de los espacios portaes una característica de la NASH humana, en particular de sus estadios más avanzados con fibrosis y cirrosis (137).

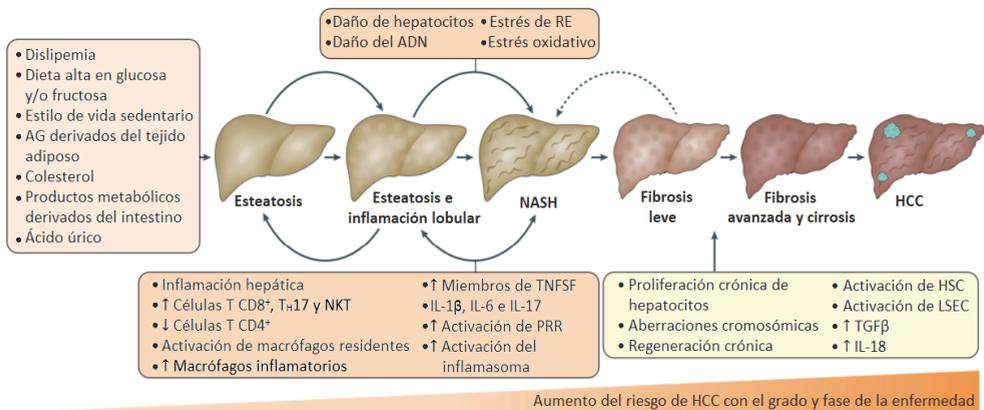


Figura I.9. Factores ambientales y derivados del intestino en la patogénesis de la NASH y el desarrollo de HCC. NASH: esteatohepatitis no alcohólica; AG: ácidos grasos; TNFSF: miembros de la superfamilia TNF; TGF β : factor de crecimiento transformante β ; HCC: carcinoma hepatocelular; HSC: células estrelladas hepáticas; LSEC: células endoteliales sinusoidales hepáticas; RE: retículo endoplásmico; PRR: receptores de patrones de reconocimiento. Adaptado de (147).

I.2.5.1. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

Hoy en día, sin un tratamiento farmacológico aprobado, las modificaciones en el estilo de vida centradas en alimentación saludable y ejercicio regular son las principales recomendaciones para los pacientes con NAFLD/NASH. Sin embargo, existen múltiples razones sociales, psicológicas, físicas, genéticas y epigenéticas

que pueden limitar la capacidad de los pacientes para adoptar y mantener dichos cambios, convirtiéndose en un desafío que en muchos casos no tiene éxito. Por tanto, se requiere el uso de intervenciones farmacológicas con el objetivo de reducir la carga individual y social de la enfermedad (148,149).

Aunque no está aprobada su indicación para la NAFLD, las guías clínicas sí que incluyen recomendaciones para su apoyo farmacológico en ciertas condiciones como el diagnóstico de NASH con fibrosis significativa y/o con alto riesgo de progresión de la enfermedad, es el caso de la vitamina E y la pioglitazona, agonista de PPAR γ (149,150).

Actualmente, se están realizando numerosos estudios preclínicos y clínicos dirigidos a actuar sobre el eje “metabolismo-inflamación-fibrogénesis”. Algunos compuestos están dirigidos a modular/inhibir la muerte de los hepatocitos (como el inhibidor de la pan-caspasa), otros a reducir la inflamación y/o fibrosis (antagonista de CCR2/CCR5 o inhibidor de galectina-3), otros a regular rutas metabólicas (pan-agonistas de PPAR, agonistas de FGF21 “fibroblast growth factor 21”, inhibidor de ACC “acetyl-CoA carboxylase”, agonistas de GLP-1 “glucagon-like peptide-1”, etc.), y otros actúan sobre el eje intestino-hígado (agonistas de FXR “farnesoid X receptor” o análogos de FGF19) (151). En la Tabla I.2. se muestra un resumen de los ensayos clínicos más avanzados de terapias novedosas para el tratamiento de NASH.

Tabla I.2. (Página siguiente) Resumen de ensayos clínicos de terapias novedosas para la resolución de NASH. RESOL.: Resolución; REDUC.: Reducción; DM2: diabetes mellitus tipo 2; sc: subcutáneo. Adaptado de (152).

FÁRMACO	MECANISMO DE ACCIÓN	ENSAYO CLÍNICO	FASE	ID DEL ENSAYO	RESOL. NASH	REDUC. FIBROSIS
Ácido obeticoólico	Agonista de FXR de 1ª generación	Estudio FLINT	IIb	NCT01265498	No	Sí
		Estudio REGENERATE	III	NCT02548351	No	Sí
		Estudio REVERSE	III	NCT03439254	-	-
Cilofexor	Agonista de FXR de 2ª generación	Cilofexor en pacientes con NASH no cirrótica	II	NCT02854605	No	No
Tropifexor	Agonista de FXR de 2ª generación	Estudio FLIGHT-FXR	II	NCT02855164	Sí	-
		Estudio TANDEM	IIb	NCT03517540	-	-
Elafibranor	Agonista de PPAR α/δ	Estudio GOLDEN-505	IIb	NCT01694849	Sí	No
		Estudio RESOLVE-IT	III	NCT02704403	No	No
Lanifibranor	Pan-agonista de PPAR	Estudio NATIVE	IIb	NCT03008070	Sí	-
Saroglitazar	Agonista dual de PPAR α/γ	Estudio EVIDENCE IV	II	NCT03061721	Sí	No
Liraglutida	Agonista receptor GLP-1	Estudio LEAN	II	NCT01237119	Sí	Sí
Semaglutida	Agonista receptor GLP-1	Semaglutida sc. en NASH	II	NCT02970942	Sí	No
Tirzapatida	Agonista de GIP y GLP-1	Estudio SYNERGY-NASH	IIb	NCT04166773		
Cotadutida	Agonista de glucagón y GLP-1	MEDI0382 en personas con sobrepeso, obesidad y DM2	II	NCT02548585	-	-
Resmetirom	Agonista de TSH β	MGL-3196 para NASH	II	NCT02912260	Sí	-
		Estudio MAESTRO-NASH	III	NCT03900429	-	-
Cenicriviroc	Antagonista de CCR2/CCR5	Estudio CENTAUR	IIb	NCT02217475	No	Sí
		Estudio AURORA	III	NCT03028740	-	No
Selonsertib	Fármacos antifibróticos	Estudio STELLAR-3,4	III	NCT03053050 NCT03053063	No	No
Simtuzumab	Fármacos antifibróticos	GS-6624 para NASH	IIb	NCT01672866 NCT01672879	No	No
Emricasan	Inhibidor de pan-caspasa	Estudio ENCORE-NF	II	NCT02686762	No	No

Debido a que la dislipidemia contribuye significativamente a un mayor riesgo cardiovascular en los pacientes con NAFLD y juega un papel clave en el desarrollo y la progresión de la enfermedad, el uso de fármacos antidiabéticos e hipolipemiantes es habitual en la práctica clínica. Sin embargo, algunos fármacos de las familias de fármacos hipolipemiantes más utilizadas se han asociado con elevaciones adversas de las enzimas hepáticas (p. ej., estatinas, fibratos). Es por ello que, a día de hoy, se emplean con cautela y continúan los estudios para aclarar su seguridad y eficacia en este contexto clínico. Entre las limitaciones de los estudios realizados hasta ahora se incluyen un tamaño poblacional relativamente pequeño y un período de seguimiento corto (153).

Dado que los pacientes desarrollan la NAFLD/NASH a través de múltiples mecanismos, los tratamientos ideales deberían ser personalizados para cada paciente, actuando sobre distintas dianas terapéuticas. Sin embargo, actualmente esta aproximación terapéutica es inviable por su elevado coste (148,151,154).

I.3. REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS

El reposicionamiento de fármacos se basa en identificar nuevas indicaciones para el uso de fármacos ya aprobados o en desarrollo para otras patologías. Esta estrategia ofrece varias ventajas sobre el desarrollo de un fármaco completamente nuevo para una indicación determinada. En primer lugar, el riesgo de fracaso es menor porque el fármaco ya ha mostrado ser suficientemente seguro en modelos preclínicos y en humanos si se han completado los ensayos en las primeras etapas, por lo que es menos probable que falle en los ensayos de eficacia posteriores, al menos desde el punto de vista de la seguridad. En segundo lugar, se puede reducir el plazo para el desarrollo de fármacos, porque la mayoría de las pruebas preclínicas, la evaluación de la seguridad y, en algunos casos, el desarrollo de la formulación, ya se habrán completado. En tercer lugar, se necesita menos

inversión, aunque esto variará en función de la etapa y el proceso de desarrollo del fármaco candidato a reposicionar (155).

Un ejemplo de éxito del reposicionamiento de fármacos sería, como hemos mencionado, el caso de la AZT, cuya indicación inicial fue el tratamiento del cáncer pero que demostró ser efectiva en el tratamiento de la infección por VIH (155). En lo que respecta a la NAFLD, nos encontramos el ejemplo de la pioglitazona, cuya indicación aprobada es la diabetes mellitus tipo 2 pero se admite su uso en ciertas condiciones de NAFLD ya que se ha observado que mejora la esteatosis y la necroinflamación (149).

II. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio fue explorar la respuesta antiinflamatoria y antifibrótica inducida por el fármaco antirretroviral Rilpivirina en la enfermedad de hígado graso no alcohólico, caracterizando los mecanismos celulares y moleculares implicados en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Los objetivos específicos establecidos para alcanzar el objetivo general fueron:

- Caracterizar el efecto de Rilpivirina en la infiltración de macrófagos en el hígado y los mecanismos moleculares implicados en un modelo murino nutricional de enfermedad de hígado graso no alcohólico e *in vitro*.
- Caracterizar la respuesta antiinflamatoria de Rilpivirina en células estrelladas hepáticas y macrófagos *in vitro*, evaluando su papel en la regulación de diferentes rutas inflamatorias y de respuesta a estrés.
- Evaluar el efecto de Rilpivirina en la modulación de la polarización de macrófagos humanos *in vitro*.
- Estudiar la inactivación de las células estrelladas hepáticas en biopsias hepáticas de pacientes con VIH que padecen de enfermedad hepática no alcohólica y han recibido tratamiento con Rilpivirina.
- Analizar la expresión de marcadores de inflamación en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con enfermedad hepática no alcohólica y en tratamiento con Rilpivirina.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. REACTIVOS

III.1.1. FÁRMACO ANTIRRETROVIRAL

El fármaco antirretroviral Rilpivirina empleado en los ensayos *in vitro* se adquirió de Biosynth Carbosynth® (Compton, Reino Unido) y fue disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Para los ensayos *in vivo* se empleó el medicamento Edurant®, cuyo principio activo es la RPV, que se obtuvo del Servicio de Farmacia Hospitalaria del Hospital Clínico Universitario de Valencia (España). Los comprimidos de Edurant® fueron pulverizados en un mortero de vidrio y disueltos en DMSO para su administración oral en los animales.

III.1.2. REACTIVOS QUÍMICOS GENERALES

Todos los reactivos químicos generales empleados en esta tesis fueron de grado analítico y fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, Panreac Química S.L.U. (Barcelona, España), Merck Milipore (Darmstadt, Alemania) y Roche Life Science (Penzberg, Alemania).

III.1.3. REACTIVOS PARA CULTIVO CELULAR

Los medios y suplementos para el cultivo celular fueron obtenidos de Gibco™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), Sigma-Aldrich y Lonza (Basilea, Suiza) (Tabla III.1).

Tabla III.1. (Página siguiente) Reactivos usados en cultivo celular y su proveedor.

REACTIVO	COMPAÑÍA
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich
Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con alta concentración de glucosa (4,5 g/L)	Gibco
Suero fetal bovino (FBS)	Lonza
Medio X-VIVO™ 15	Lonza
Solución salina equilibrada de Hank (HBSS)	Lonza
Tripsina-EDTA 0,25%	Gibco
Penicilina/Estreptomicina	Gibco
Piruvato de sodio	Gibco
Aminoácidos no esenciales (NEAA)	Gibco
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Lonza
HEPES (N-2-hidroxietilopiperacina-N-2-ácido etanosulfónico)	Gibco

III.2. MODELOS EXPERIMENTALES

III.2.1. MODELOS *IN VITRO*

III.2.1.1. LÍNEAS CELULARES HUMANAS

LX-2, una línea inmortalizada de HSC humanas, fue obtenida de Sigma-Aldrich y cultivada en DMEM con alta concentración de glucosa (4,5 g/L), suplementado con 10% de FBS inactivado, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina.

La línea monocítica humana THP-1 procedente de la “European Collection of Cell Culture” (Salisbury, Reino Unido) fue mantenida en suspensión (1×10^5 - 1×10^6 células/mL) en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS inactivado, NEAA 1X, 1 mM de piruvato de sodio, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y HEPES 10 mM.

III.2.1.2. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES Y OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS

La sangre procedente de donantes sanos se recogió en tubos de citrato en el Hospital Clínico Universitario de Valencia. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, “peripheral blood mononuclear cells”) se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad, a 400 g durante 40 min, en tubos con 15 mL de Ficoll® Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, Boston, MA, EE.UU.). Tras recoger el halo correspondiente a las células mononucleares, estas se resuspendieron en un mismo volumen de tampón fosfato salino (PBS, “phosphate-buffered saline”) sin calcio ni magnesio, y se centrifugaron de nuevo a 400 g durante 10 min. Se resuspendieron en medio de cultivo X-VIVO™ 15 suplementado con 1% de FBS, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL y se sembraron 8×10^6 PBMC por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos. Tras 2 h se lavaron con HBSS y se añadió medio X-VIVO™ suplementado, además de con los componentes anteriores, con M-CSF 20 ng/mL (Peprotech, Londres, Reino Unido). Los macrófagos derivados de monocitos (MDM) se obtuvieron después de 5 días de incubación cambiando el medio suplementado cada 2-3 días.

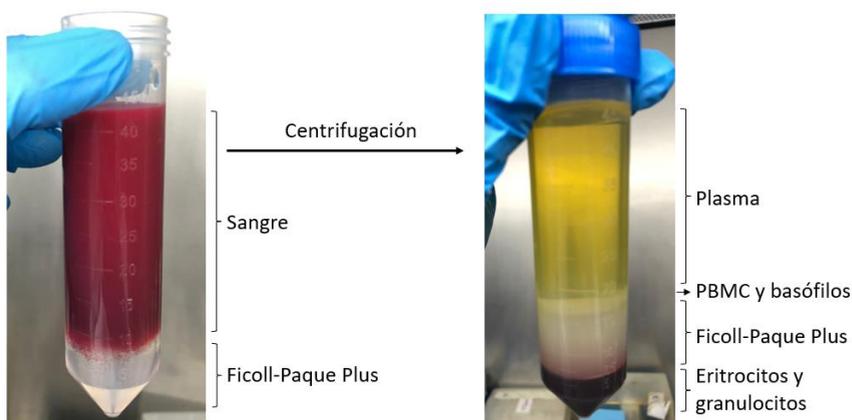


Figura III.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad.

Todos los cultivos celulares fueron mantenidos en un incubador de células (IGO 150, Jouan, Saint-Herblain Cedex, Francia) a 37°C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂/95% de aire (AirLiquide Medical, Valencia, España).

III.2.1.3. TRATAMIENTOS *IN VITRO*

Las concentraciones de fármaco fueron escogidas considerando la variabilidad interindividual en su farmacocinética (156). Para evaluar los posibles resultados producidos de manera dependiente de la concentración se escogieron 4 concentraciones de RPV (1, 2, 4 y 8 µM). Además, en cada experimento se añadieron un control negativo (células sin tratar) y un control del vehículo del fármaco. Si no se indica lo contrario, las células fueron tratadas durante 48 h. Todos los tratamientos se realizaron usando cultivos celulares sub-confluentes. En el caso de los MDM, los tratamientos se llevaron a cabo el quinto día desde su aislamiento.

Los efectos de RPV fueron comparados con aquellos producidos por moduladores farmacológicos de diferentes procesos fisiopatológicos (Tabla III.2). Además, se emplearon estímulos profibrogénicos o proinflamatorios para realizar ciertos experimentos, en los que las células LX-2 fueron cotratadas con TGFβ1 (2,5 ng/mL) durante las 48 h de tratamiento con RPV y los MDM fueron pretratados con LPS (2 ng/mL) durante 1 h para, a continuación, ser cotratados con RPV durante 48 h.

Tabla III.2. Estímulos utilizados, incluida la concentración específica empleada, descripción de sus acciones farmacológicas y casas comerciales de las que se adquirieron.

NOMBRE	CONCENTRACIÓN	ACCIÓN	COMPAÑÍA
LPS (<i>E. coli</i> 0111:B4)	0,1 µg/mL, 2 ng/mL	Estímulo proinflamatorio	Sigma-Aldrich
IFNγ	20 ng/mL	Estímulo proinflamatorio	Peprtech
IL-4	20 ng/mL	Activación alternativa de los macrófagos	Miltenyi Biotec (Gladbach, Alemania)
TGFβ1	2,5 ng/mL	Estímulo profibrogénico	Miltenyi Biotec

III.2.2. MODELO *IN VIVO* DE ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

Para el desarrollo del modelo animal se emplearon ratones hembra C57BL/6J de 10 semanas de edad proporcionados por Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia). Los animales (20 ± 3 g de peso) dispusieron, si no se especifica lo contrario, de acceso *ad libitum* a dieta normal (Envigo, Huntingdon, Reino Unido) y agua, y se mantuvieron a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ con ciclos de luz y oscuridad (12 h/12 h). Los animales se repartieron aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales formados por 10 ratones cada uno. Todos los procedimientos se realizaron según la legislación vigente y fueron aprobados por el comité de ética local (código de autorización 2014/VSC/PEA/00188).

Se empleó como modelo de NAFLD un modelo nutricional de dieta rica en grasa (HFD, “high fat diet”), en el que un grupo experimental de ratones fue alimentado durante 12 semanas con esta dieta (59% de grasa, 26% de hidratos de carbono, 15% de proteínas y 2% de colesterol; Ssniff® EFR/M D12330 mod.*/Surwit) preparada por Ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Alemania), mientras que el otro grupo fue alimentado con dieta normal (ND, “normal diet”). A su vez, se realizaron 3 subgrupos en función del tratamiento administrado:

- Grupo control, ratones que no recibieron ningún tipo de tratamiento.
- Grupo vehículo, ratones administrados con el vehículo del fármaco (DMSO).
- Grupo RPV, ratones administrados con el fármaco RPV.

La dosis de RPV fue calculada usando un factor de escalado alométrico entre especies, basado en cálculos del área de superficie corporal, establecido por la FDA para alcanzar en ratón una dosis equivalente a la dosis terapéutica diaria máxima en humanos (25 mg) (157). Los animales fueron tratados diariamente vía oral (*p.o.*) con 0,1 mg de RPV disuelto en 10 μL de DMSO. También fueron pesados

semanalmente. Al final del procedimiento fueron sacrificados mediante hipovolemia tras exanguinación previa anestesia con isoflurano 5%. Para la obtención de plasma, las muestras de sangre fueron recogidas de la vena cava, homogeneizadas con un 10% de EDTA 0,5 M a pH 8 y centrifugadas a 1500 g durante 15 min a 4°C. Los hígados fueron pesados y fijados en solución de formaldehído Histofix® Preservative (Panreac) para su posterior análisis histológico, o rápidamente congelados en N₂ líquido para su almacenaje a -80°C.

III.2.3. MUESTRAS DE PACIENTES EN TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

En colaboración con el grupo de la Dra. María Luisa Montes, de la Unidad de VIH del Hospital Universitario La Paz de Madrid, se emplearon muestras de ADN complementario (ADNc) obtenido de PBMC y muestras de biopsias hepáticas de pacientes infectados con VIH-1 de dicho hospital, ya recogidas durante un procedimiento previamente aprobado por su Comité Ético (ref. PI-2248). Las muestras proceden de pacientes adultos de ambos sexos con infección por VIH-1 en tratamiento antirretroviral estable (incluyendo regímenes con y sin RPV) y con una carga viral < 50 copias/mL, que presentaron una elevación de transaminasas de cualquier nivel durante más de seis meses sin causa aparente. Estos pacientes se sometieron a un estudio protocolizado de despistaje de enfermedad hepática autoinmune, genética o metabólica con analítica, ecografía abdominal, medida de rigidez hepática y esteatosis mediante elastografía de transición y CAP (“Controlled Attenuation Parameter”; método no invasivo para la determinación de esteatosis basado en la elastografía). Se excluyeron todos los sujetos que presentaban coinfección por VHB y VHC, así como los consumidores habituales de alcohol (más de 30 g/día para hombres y de 20 g/día para mujeres), los consumidores habituales de cualquier otra droga y aquellos con potencial hepatotoxicidad farmacológica.

III.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA

III.3.1. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las células se recogieron al finalizar los correspondientes tratamientos. En el caso de las LX-2, inmediatamente después de recoger el medio de cultivo, las células fueron lavadas con PBS atemperado y despegadas mediante la adición de tripsina-EDTA 0,25% (a 37°C durante 1 min). La suspensión resultante se centrifugó a 500 *g* durante 3 min a temperatura ambiente (Universal 320 Centrifuge, Heitich, Tuttlingen, Alemania), se descartó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 1 mL de PBS frío.

En el caso de los MDM, tras recoger el medio de cultivo, las células fueron despegadas rascando con un raspador de células la superficie del pocillo con 1 mL de PBS frío.

En ambos casos, la suspensión resultante de células en PBS se centrifugó en una microcentrífuga (5415-R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 500 *g* durante 5 min a 4°C. Finalmente, los sobrenadantes fueron descartados y los pellets de células almacenados a -80°C hasta su uso. Del mismo modo, el medio retirado tras el tratamiento se centrifugó a 500 *g* durante 5 min a 4°C para retirar cualquier resto celular, se recogió y se conservó a -80°C para su posterior uso.

III.3.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA CELULAR TOTAL

Los pellets de MDM fueron resuspendidos en 60 µL de tampón de lisis compuesto por 90% de PhosphoSafe™ Extraction Reagent (Merck Milipore) y 10X de cComplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche Life Science), un cóctel de inhibidores de serin-, cisteín- y metaloproteasas. Tras vortear durante 10 s, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se centrifugaron

a 16000 *g* durante 5 min a 4°C. Por último, se recogió el sobrenadante (extracto de proteína celular total) y se almacenó a - 80°C hasta su uso.

III.3.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES Y CITOSÓLICAS

Al finalizar el tratamiento, las células LX-2 se recogieron como se ha descrito previamente con PBS y tripsina-EDTA 0,25%. Se empleó el kit “NUCLEAR EXTRACTION KIT Millipore 2900” (Merck Milipore) y, según las instrucciones del fabricante, se realizó un lavado previo del pellet con 70 µL de “Cytoplasmic Lysis Buffer” (proporcionado) suplementado con ditioneitol (DTT) 0,5 mM e inhibidores de proteasas en dilución 1:1000, incubando en hielo durante 15 min y centrifugando a 200 *g* durante 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió de nuevo el pellet evitando la formación de espuma en 70 µL de “Cytoplasmic Lysis Buffer” suplementado de la misma manera que en el paso anterior. Se procedió a la lisis mecánica de las células pasándolas 4 veces por una aguja de 25 G. A continuación, se centrifugó a 8000 *g* durante 20 min a 4°C y se recogió el sobrenadante como fracción citosólica. El pellet restante se lavó con 40 µL de “Cytoplasmic Lysis Buffer” suplementado y se centrifugó a 8000 *g* durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 70 µL de “Nuclear Extraction Buffer” (proporcionado) suplementado con DTT 0,5 mM e inhibidores de proteasas en dilución 1:1000. Se lisaron los núcleos pasándolos 4 veces por una aguja de 25 G y se incubaron en un agitador rotativo tipo noria a 4°C durante 45 min. Finalmente, se centrifugaron a 16000 *g* durante 5 min a 4°C y se recogieron las fracciones nucleares. Los extractos se almacenaron a - 80°C hasta su uso.

III.3.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: ENSAYO DE ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA)

El contenido en proteínas se cuantificó empleando el ensayo de BCA. Este ensayo está basado en la reacción de Biuret, la cual consiste en la reducción de Cu²⁺ con

residuos oxidables de los aminoácidos como tirosina, cistina, triptófano o cisteína. Los iones Cu^+ producidos se unen a dos moléculas de BCA, formando un complejo de color morado intenso que absorbe luz a 562 nm. La absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente en un amplio rango de concentraciones (0,02-2 mg/mL) (158).

Para el ensayo se utilizó el “BCA Protein Assay Kit” (Pierce Chemicals, Boulder, CO, EE.UU.). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se realizó una curva estándar con diluciones seriadas de albúmina de suero bovino (BSA, “bovine serum albumin”) para relacionar la variación de la absorbancia con la cantidad de proteína. En una placa de 96 pocillos sobre hielo se agregaron 20 μL /pocillo de muestra diluida (1:20), curva patrón (0,03125 - 1 mg/mL) o blanco (agua). Después, se añadieron 200 μL del reactivo por cada pocillo. El reactivo se preparó siempre en el momento del ensayo, mezclando 50 partes del reactivo A (que contiene BCA, carbonato sódico, tartrato sódico y bicarbonato sódico en 0,1 M de NaOH) con 1 parte del reactivo B (Cu_2SO_4 al 4%). El ensayo se realizó siempre por duplicado y la placa se incubó 30 min a 37°C con agitación constante y protegida de la luz.

La medición de la absorbancia a 570 nm se realizó con un lector espectrofotométrico de placas Multiskan™ Ascent (Thermo Labsystems, Beverly, MA, EE.UU.).

III.3.5. WESTERN BLOTTING (WB)

III.3.5.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Los geles de poliacrilamida se prepararon usando una solución de acrilamida/bisacrilamida en proporción 37,5:1 (Panreac). Los geles de resolución, con diferentes porcentajes de poliacrilamida (8-15%), se prepararon en Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 y SDS 0,1%. Los geles de concentración se prepararon en Tris-HCl

0,125 M pH 6,8 y SDS 0,1%. Para catalizar la reacción de polimerización, se usó persulfato de amonio (APS) (SERVA, Heidelberg, Alemania) y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (Fluka, Sigma-Aldrich).

Antes de ser cargados en el gel, los extractos proteicos se prepararon con la misma cantidad de proteína y se trataron con el tampón de carga de Laemmli (0,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% glicerol v/v, 10% SDS, 0,5% β -mercaptoetanol y 0,5% de azul de bromofenol). A continuación, se hirvieron durante 5 min a 95°C para desnaturalizar las proteínas. Junto a las muestras, siempre se añadió un marcador para determinar el peso molecular de los polipéptidos en el gel (EZ-RUN™ Pre-stained Rec Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific).

La electroforesis se realizó usando el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell Electrophoresis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) y el tampón de electroforesis (Trizma base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%) a un voltaje constante de 120 V.

III.3.5.2. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

Una vez realizada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m (GE Healthcare Life Science), utilizando un "Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell" (Bio-Rad) en presencia de tampón de transferencia (Trizma base 25 mM, glicina 192 mM, MeOH 20%), tal y como indica el protocolo de Bio-Rad. La transferencia se realizó durante 1 h, a 4°C y a una corriente eléctrica constante de 400 mA.

III.3.5.3. TINCIÓN CON ROJO PONCEAU Y MARCAJE CON LOS ANTICUERPOS

Después de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se incubó 1 min con la solución rojo Ponceau (0,1% Ponceau/5% solución de ácido acético) (Sigma-Aldrich), que tiñe las proteínas reversiblemente y se utiliza como control de la

cantidad de proteínas cargadas y de la calidad del proceso de transferencia. La tinción de Ponceau se eliminó con agua destilada y se procedió a incubar la membrana en agitación continua con una solución bloqueadora (leche en polvo sin grasa o BSA al 5% preparada en el tampón Tris salino con Tween 20 0,1% v/v (TBS-T)) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo y suplementado con azida sódica 0,02% (NaN_3 , Merck Milipore), y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Tras la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó 3 veces durante 10 min con TBS-T en agitación fuerte para eliminar el exceso de anticuerpo. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario preparado en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados de 10 min con TBS-T en agitación fuerte. Todos los anticuerpos primarios y secundarios empleados se encuentran detallados en la Tabla III.3.

Tabla III.3. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los experimentos de WB.

ANTICUERPOS PRIMARIOS				
PROTEINA	ESPECIE	PM (KDa)	DILUCIÓN	COMPAÑÍA (ref.)
STAT1	Conejo	84, 91	1:1000	Cell signaling (14994S)
p-STAT1	Ratón	84, 91	1:1000	Abcam (ab29045)
STAT3	Conejo	88	1:1000	Abcam (ab68153)
p-STAT3	Conejo	88	1:1000	Abcam (ab76315)
p65	Ratón	65	1:1000	Invitrogen (339900)
p-p65	Conejo	65	1:1000	Cell signaling (3033)
Caspasa-1	Conejo	20, 45	1:1000	Cell signaling (2225S)
NLRP3	Conejo	110	1:1000	Cell signaling (13158)
p38 MAPK	Conejo	38	1:1000	Sigma-Aldrich (506123)
p-p38 MAPK	Conejo	38	1:1000	Cell signaling (9216)
JNK	Ratón	46, 54	1:1000	Invitrogen (AHO1362)
p-JNK	Conejo	46, 54	1:1000	Invitrogen (700031)
Nucleolina	Conejo	105	1:2000	Sigma-Aldrich (N2662)
GAPDH	Conejo	36	1:25000	Sigma-Aldrich (G9545)

ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
ANTICUERPO	MARCAJE	DILUCIÓN	COMPAÑÍA (ref.)
Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón	HRP	1:2000	Thermo Fisher (31430)
Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo	HRP	1:5000	Vector (PI-1000)

III.3.5.4. DETECCIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA

El revelado del inmunomarcaje se realizó utilizando los reactivos Immobilon™ Crescendo Western HRP substrate (Merck Millipore), Immobilon™ Forte Western HRP substrate (Merck Millipore) o SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific). Este método de detección está basado en una reacción de oxidación de luminol catalizada por la enzima peroxidasa de rábano (HRP, "horseradish peroxidase") conjugada al anticuerpo secundario que, en presencia de peróxido de hidrógeno, genera 3-aminofalato con una emisión a 425 nm. El tiempo de exposición varió según la intensidad de la señal de cada proteína y el reactivo utilizado. La visualización del inmunomarcaje se realizó con una máquina de revelar automática Amersham ImageQuant 800 (GE Life Science). Los análisis densitométricos de estos resultados se realizaron usando el software Multi Gauge V3.0 (Fujifilm, Tokio, Japón). Se utilizó GAPDH como control de carga del extracto proteico total.

III.3.5.5. REUTILIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

Con el fin de reutilizar la membrana de nitrocelulosa y analizar en ella otros anticuerpos, se procedió a la eliminación de los anticuerpos primarios y secundarios, rompiendo su unión con la membrana. Dicho proceso se realizó sumergiendo la membrana en una solución de glicina 0,5 M pH 2,5 durante 1 h a temperatura ambiente, bajo agitación constante. Posteriormente se realizaron 3

lavados de 10 min con TBS-T a temperatura ambiente. A partir de este punto, el WB se continuó con el protocolo estándar anteriormente descrito (apartado III.3.5.3), iniciando con el bloqueo de la membrana.

III.4. ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

La secreción de CCL2 (MCP-1) en cultivo celular por parte de las células LX-2 y MDM se midió mediante ELISA, usando el kit “Human MCP-1 ELISA Kit” (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, los pocillos fueron lavados dos veces con 300 μL de “Wash Buffer” (proporcionado). Se realizaron diluciones seriadas 1:2 para la recta patrón de MCP-1 humano con el “Assay Buffer” (proporcionado) (1-0,03125 ng/mL). Se añadieron 100 μL de las diluciones seriadas para realizar la recta patrón y 80 μL de “Assay Buffer” con 20 μL de cada muestra (sobrenadantes sin diluir de medio de cultivo de LX-2 tratadas o sobrenadantes de medio de MDM diluidos 1:100 con “Assay Buffer”) para evaluar las muestras. Se usaron 100 μL de “Assay Buffer” como blanco. Cada muestra, punto de la recta, blanco o control se analizó por duplicado. Después de añadir 50 μL de anticuerpo monoclonal anti-MCP-1 humano conjugado con HRP a todos los pocillos, la placa fue incubada a temperatura ambiente durante 2 h en un agitador de placas. Para retirar cualquier exceso de anticuerpo, los pocillos se lavaron tres veces con 300 μL de “Wash Buffer”. La señal se reveló con la adición de 100 μL de “Substrate solution” (tetrametil-benzidina), incubando la placa durante 10 min protegida de la luz. La reacción enzimática se detuvo con 100 μL de “Stop Solution” (ácido fosfórico 1 M). La absorbancia se midió inmediatamente después usando una longitud de onda de 450 nm y la longitud de onda de 620 nm como referencia con el espectrofotómetro Infinite® 200 PRO series (TECAN Trading AG, Männedorf, Suiza).

III.5. INMUNOFLUORESCENCIA

Tras aislar los PBMC por el método del Ficoll explicado en la sección III.2.1.2, se sembraron $0,5 \times 10^6$ células por pocillo en placas de 24 pocillos con un cubreobjetos circular de vidrio (12 mm). Las células se cultivaron y trataron como se detalla en el apartado III.2.1.

Siete días después del aislamiento, las células se lavaron con 0,5 mL de PBS atemperado y estéril y se fijaron con 0,4 mL de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS atemperado durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron 2 veces con PBS durante 5 min, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 10 min y se lavaron 2 veces con PBS durante 5 min. Se incubaron con un tampón de bloqueo (5% de suero de cabra en PBS y Tritón X-100 al 0,3%) durante 1 h a temperatura ambiente y, posteriormente, con el anticuerpo primario (Phospho-Stat6 (Tyr641) (D8S9Y) Cell Signaling #56554) a 4°C durante toda la noche, a una dilución 1:300 en solución para anticuerpo (10% de BSA en PBS y Tritón X-100 al 0,3%). El día siguiente, las células se lavaron 3 veces con 0,5 mL de PBS durante 5 min y se incubaron con el anticuerpo secundario (Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 nm) a una dilución 1:500 en solución de anticuerpo durante 2 h protegido de la luz. Finalmente, se lavaron las células 3 veces con 0,5 mL de PBS durante 5 min y se procedió al montaje con “ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI” (Invitrogen) sobre un portaobjetos.

Las imágenes se tomaron con el microscopio confocal Leica SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se analizaron con el software CellProfiler 4.2.1 (Cambridge, MA, EE.UU.).

III.6. CITOMETRÍA DE FLUJO

Se despegaron los MDM rascando con 0,4 mL de PBS frío y se recogieron en tubos de citómetro. Se añadió el mix de anticuerpos a todas las condiciones con el volumen indicado por el fabricante (Tabla III.4), excepto al tubo empleado para detectar autofluorescencia, y se incubaron durante 15 min en oscuridad. Se añadieron 240 μ L de solución de lisado BD™ FACS™ (BD, San Jose, CA, EE.UU.) y se incubaron durante 10 min en oscuridad. La fluorescencia se detectó utilizando un citómetro BD LSRFortessa™ X-20 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) y los datos se analizaron con el software BD FACSDiva™ (BD Bioscience).

Tabla III.4. Anticuerpos empleados en citometría de flujo.

ANTICUERPOS		
PROTEINA	FLUOROCROMO	COMPAÑÍA (ref.)
CD14	Brilliant Violet 510™	Biolegend (301842)
CD163	PE/Cyanine7	Biolegend (333614)
CD86	Alexa Fluor 647	Biolegend (305416)
CD206	VioBlue®	Miltenyi biotec (130-127-809)

III.7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

III.7.1. EXTRACCIÓN DE ARN DE CULTIVO CELULAR

El ARN total celular se obtuvo usando el kit “illustra™ RNAspin Mini” (GE Healthcare), según las instrucciones del fabricante. Los pellets se resuspendieron en 350 μ L de tampón de lisis con 3,5 μ L de β -mercaptoetanol, se lisaron las células pasándolas a través de una aguja de 25 G y se filtró el lisado resultante. A continuación, se añadieron 350 μ L de etanol 70% y se transfirieron las muestras a una columna que retiene ARN. Se realizaron diferentes pasos de desalado, digestión de ADN con ADNasa I y lavados con los tampones proporcionados con el kit para finalmente eluir el ARN con 30 μ L de agua “libre de ARNasas”.

La concentración y pureza del ARN obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.). Como control de la pureza del ARN extraído, se consideró como válido un valor para el ratio entre las absorbancias a 260 y 280 nm de entre 2 y 2,2.

III.7.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE TEJIDO HEPÁTICO

La extracción de ARN de tejido hepático se realizó usando el reactivo TriPure Isolation Reagent (Roche Life Science). Las muestras hepáticas (30-40 mg) fueron homogeneizadas con MACS™ Dissociator (MACS, Miltenyi Biotec) en 750 μ L TriPure y centrifugadas a 16000 *g* durante 15 min a 4°C. A continuación, se añadieron 150 μ L de cloroformo al sobrenadante para separar las diferentes fases (acuosa, interfase y orgánica), se vortearon las muestras, se incubaron en hielo 15 min y se centrifugaron a 16000 *g* durante 15 min a 4°C. La fase superior transparente y acuosa, que contiene el ARN, se recogió en nuevos tubos, a los que se añadieron 500 μ L de isopropanol para precipitar el ARN, y se incubaron las muestras durante toda la noche a -20°C. El ARN precipitado se recogió mediante centrifugación a 16000 *g* durante 20 min a 4°C, se lavó con 1 mL de etanol al 70% para centrifugar de nuevo a 16000 *g* durante 15 min a 4°C. Finalmente, el pellet de ARN se dejó secar al aire a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 μ L de agua libre de ARNasas. La concentración y pureza del ARN obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

III.7.3. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO POR RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

La síntesis de ADNc se realizó utilizando la transcriptasa reversa PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japón) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se transcribió 1 μ g de ARN total con

PrimeScript Buffer, 1 μL PrimeScript RT Enzyme Mix I, 50 pmol Random 6-mers and 25 pmol Oligo dT Primer en un volumen final de 20 μL . La reacción tuvo lugar en un termociclador GeneAmp[®] PCR System 2400 (PerkinElmer Inc, Waltham, MA, EE.UU.) con las siguientes condiciones: 37°C durante 15 min, 85°C durante 5 s y 4°C hasta su almacenamiento a -20°C.

III.7.4. RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (qRT-PCR)

Para realizar la qRT-PCR se empleó TB Green[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa Bio Inc.), que contiene TaKaRa Ex Taq HS, un mix de dNTP, Mg²⁺, Tli ARNasa H y SYBR Green I (un fluoróforo que emite fluorescencia únicamente cuando se une a ADN de doble cadena; tras cada ciclo, éste se excita y se mide su emisión de luminiscencia pudiendo cuantificar la cantidad de producto obtenido). La reacción se realizó con 1 μL de ADNc, 5 μL TB Green[®] Premix Ex Taq[™], cebadores 2 μM (sentido y antisentido) y agua libre de ARNasas en un volumen final de reacción de 10 μL . Las qRT-PCR se realizaron en un termociclador Lightcycler[®] 96 Real-Time PCR System (Roche Life Science), siguiendo el siguiente protocolo: 30 s a 95°C; 5 s a 95°C, 20 s a 60°C (50 ciclos); 1 s a 95 °C; 15 s a 65°C; 1 s a 95°C y 30 s a 40°C. En cada experimento se incluyó un control negativo al cual, en vez de ADNc, se adicionó 1 μL de agua; todas las reacciones se realizaron por duplicado. Las parejas de cebadores empleadas para genes humanos (Tabla III.5) y de ratón (Tabla III.6) fueron sintetizadas por IDT[®] (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EE.UU.) o Metabion (Planegg, Alemania). Antes de su uso, los cebadores se testaron empleando un análisis del punto de fusión del producto y una electroforesis en un gel de agarosa del 2% con Serva DNA Stain G (Serva) y tampón TAE (20 mM Tris pH 7,8, 0,5 mM EDTA y 10 mM acetato de sodio).

Tabla III.5. Parejas de cebadores para genes de ratón empleados en qRT-PCR.

PAREJAS DE CEBADORES PARA GENES DE RATÓN		
GEN	SENTIDO (5'→3')	ANTISENTIDO (5'→3')
Actb	GCCAACCGTGAAAAGATGACC	GAGGCATACAGGGACAGCAC
Adgre1	TGACTCACCTTGTGGTCCTAA	CTTCCCAGAATCCAGTCTTTCC
Arg1	GTGGGGAAAGCCAATGAAGAG	TCAGGAGAAAGGACACAGTTG
Ccr2	CCAGAAGAGGGCATTGGATT	CCAGAAGAGGGCATTGGATT
Pparg	ACCACTCGCATTCTTTGAC	CCACAGACTCGGCACTCAAT
Stat6	GAGCTACTGGTCAGATCGGC	ACTCCGGAAGCCTCATCTT

Tabla III.6. Parejas de cebadores para genes humanos empleados en qRT-PCR.

PAREJAS DE CEBADORES PARA GENES HUMANOS		
GEN	SENTIDO (5'→3')	ANTISENTIDO (5'→3')
ACTB	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
ARG1	AGGGACAGCCACGAGGAGGG	AGTTTCTCAAGCAGACCAGCCTTTC
CASP1	AGAGAAAAGCCATGGCCGAC	CCTTCACCCATGGAACGGAT
CCL2	AGCAGCAAGTGTCCCAAAGA	GGTTGTGGAGTGAGTGTTCAAG
CD206	CTTTGGACGGATGGACGAGG	CAAGGAAGGGTCGGATCGTG
CD86	ACCAACACAATGGAGAGGGAA	TTGCCAGGAACTTACAAAGGA
IFNG	GGCTGAACTGTGCCAGCAGC	GTTGGCTGCCTAGTTGGCCCC
IL10	GTGATGCCCAAGCTGAG	CACGGCCTTGCTCTTGTTTT
IL1B	TTCGACACATGGGATAACGAGG	TTTTTGCTGTGAGTCCCGGAG
IL6	CACTGGTCTTTGGAGTTGAGG	ATTTGTGGTTGGGTCAGGGG
CXCL8	AGAGACAGCAGAGCACACAAG	AATTTGGGGTGGAAAGGTTTGG
NLRP3	AGAAGTGCATCGGGTGGAG	AACTGGAAGTGAGGTGGCTG
PPARG	GACAGGAAAAGACAACAGACAAATC	GGGGTGATGTGTTGAACTTG
PYCARD	CAAACGTTGAGTGGCTGCTG	GAGCTTCCGCATCTTGCTTG
STAT6	AGCCCAAGGATGAGGCTTTC	AATCAGGGGCCATTCCAAGG
TNFA	AGCCGAATCGCCGTCTCTTA	CAGCGTGAGTCGGTCACCC

Los datos de qRT-PCR fueron analizados usando el método comparativo C_T (159) obteniendo la expresión génica relativa del gen de interés. Este método se basa en esta ecuación: $\text{Fold Change} = 2^{-\Delta(\Delta C_T)}$, donde $\Delta C_T = C_T$ (gen de interés) - C_T (gen de control de carga), y $\Delta(\Delta C_T) = \Delta C_T$ (tratado) - ΔC_T (control). Se usó *ACTB/Actb* (β -actina) como control de carga.

Para cuantificar el número de copias amplificadas en el ADNc de los pacientes, generamos rectas patrón utilizando diluciones seriadas de un producto de PCR (ADN) previamente purificado para cada par de cebadores. Los datos se normalizaron utilizando *ACTB* como control de carga y la expresión génica se representó como una relación entre el número de copias del gen de interés y *ACTB*.

III.7.5. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

El ARN total de tejido hepático se aisló como se detalla en el apartado III.7.2. con TriPure Isolation Reagent (Roche Life Science). Los pasos siguientes para el análisis transcriptómico se llevaron a cabo en la Unidad de Análisis Multigénico de la Unidad Central de Investigación de Medicina (Facultad de Medicina, Universitat de València).

La concentración y pureza de las muestras de ARN se determinaron usando el Genequant Pro Classic spectrophotometer (GE Healthcare). El análisis de integridad se realizó con el RNA-6000 Nano Lab-on-a-Chip kit y el Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). El array usado en este análisis transcriptómico fue el GeneChip Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE.UU.). Antes, todas las muestras se normalizaron a 300 ng de ARN y se hibridaron con el Hybridization Oven 645 (Affymetrix) durante 16 h a 45°C. Fluidics Station 450 (Affymetrix) se empleó en todos los procesos de lavado necesarios. Finalmente, las muestras se escanearon mediante el GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix).

III.7.5.1. ANÁLISIS DE DATOS

El análisis bioinformático de los datos obtenidos de la transcriptómica se realizó en colaboración con el Dr. Francisco García García, de la Unidad de Bioestadística del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia).

Los datos se estandarizaron usando el método Robust Multi-array Average (160) y la normalización por cuantiles. La expresión génica diferencial se analizó utilizando los paquetes Limma (161) y MaSiPpro (162) de Bioconductor. El ajuste del p-valor de pruebas múltiples se realizó de acuerdo con la metodología de Benjamini y Hochberg (163) y el análisis de conjuntos de genes se llevó a cabo utilizando los términos “Gene Ontology” (GO) mediante un modelo de regresión logística (164,165). Este método detecta bloques de genes funcionalmente relacionados en listas de genes ordenados por expresión diferencial regulados significativamente al alza o a la baja. Dado que muchos términos funcionales se prueban simultáneamente, los resultados de los tests se corrigen por pruebas múltiples para obtener un p-valor ajustado. El análisis de conjuntos de genes devuelve p-valores ajustados basados en el método “False Discovery Rate method” (163,166). La nomenclatura GO para los genes en el microarray se tomó de la versión Ensembl 78 (<http://www.ensembl.org>) (167).

III.8. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

La IHQ es una técnica que permite detectar la distribución y localización de proteínas y otros antígenos dentro de secciones de tejido usando anticuerpos específicos.

III.8.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Inmediatamente tras el sacrificio de los animales, las muestras de hígado de ratón fueron conservadas en Histofix® Preservative listo para usar para diagnóstico clínico (Panreac) a 4°C. El tejido fijado en formaldehído fue embebido en parafina y cortado en secciones de 5 µm con el microtomo Leica RM2245 (Leica). Las secciones embebidas en parafina (FFPE, “formalin-fixed, paraffin-embedded”) se montaron en portaobjetos de vidrio y se desecaron en una estufa.

En el caso de las biopsias hepáticas de pacientes, las muestras proporcionadas se encontraban como FFPE.

III.8.2. DESPARAFINACIÓN Y EXPOSICIÓN DE LOS EPÍTOPOS

Previo a su desparafinación, los cortes se incubaron en un horno a 55°C durante 30 min para derretir la parafina. Las FFPE se lavaron con xileno para solubilizar y retirar la parafina. A continuación, los cortes se rehidrataron en disoluciones de etanol en agua de concentración creciente para acabar en agua destilada.

Durante el proceso de fijación el formaldehído forma puentes de metileno que unen covalentemente proteínas y enmascara la accesibilidad de los antígenos evitando la unión del anticuerpo. De modo que un paso previo para exponer los antígenos es necesario para romper los enlaces ya mencionados. Con este objetivo, los cortes se sumergieron en tampón citrato pH 6 (Sigma-Aldrich) y se calentaron a 95°C en baño maría durante 30 min. A continuación, los cortes se dejaron enfriar durante 30 min y se lavaron 3 veces en agua destilada durante 5 min.

III.8.3. BLOQUEO DE LA PEROXIDASA ENDÓGENA

Debido a que escogimos como método de detección la actividad de la HRP y a que el hígado contiene peroxidasas endógenas que pueden reaccionar con la solución cromogénica sustrato produciendo señal no específica, las preparaciones se incubaron con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (Sigma-Aldrich) durante 30 min para bloquear esta reacción, y se lavaron dos veces con agua destilada durante 5 min y otras dos veces en TBS-T.

III.8.4. MARCAJE INMUNOHISTOQUÍMICO

Las incubaciones se llevaron a cabo en una cámara humidificada. Para bloquear los sitios de unión no específicos y reducir el fondo, las muestras se incubaron con 10%

de suero normal de la especie en la que se había generado el anticuerpo secundario (cabra), más 1% de BSA diluido en TBS, en el caso de CCR2, o en TBS-T con 5% de suero de cabra para STAT1 durante 1-3 h. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla III.7) diluido en la misma solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los cortes se lavaron 3 veces durante 5 min en TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario SignalStain® Detection Reagent (Cell signaling) durante 45 min. Finalmente, previo a la detección cromogénica, los cortes se lavaron 3 veces con TBS-T durante 5 min.

Tabla III.7. Anticuerpos primarios empleados en los ensayos de inmunohistoquímica.

ANTICUERPOS PRIMARIOS			
PROTEINA	ESPECIE	DILUCIÓN	COMPAÑÍA (ref.)
CCR2	Conejo	1:100	Abcam (Ab273050)
STAT1	Conejo	1:250	Cell signaling (14994S)

III.8.5. DETECCIÓN CROMOGÉNICA

Se empleó el sustrato cromogénico para la enzima peroxidasa “3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) Enhanced Liquid Substrate System” (Sigma-Aldrich) para inmunodetectar los antígenos diana. La enzima peroxidasa, presente en el anticuerpo secundario y en complejos avidina-biotina, convierte el sustrato DAB en un precipitado insoluble marrón. DAB fue preparado siguiendo las instrucciones del fabricante y se añadió a las muestras durante 1-15 min, dependiendo de las necesidades del anticuerpo primario empleado, continuamente controlando la aparición de la señal marrón. Una vez producida la tinción, se detuvo la reacción sumergiendo los cortes en agua durante 2 min, y luego se lavaron 3 veces con PBS durante 10 min. La especificidad del marcaje se verificó mediante la ausencia de marcaje en secciones de tejido análogo sin presencia de anticuerpo primario.

III.8.6. TINCIÓN CON HEMATOXILINA

Los cortes se incubaron con “Haematoxylin solution” (Gill No. 3; Sigma-Aldrich) durante 20 s. Se realizaron lavados secuenciales en agua destilada (20 s), etanol ácido (30 s), H₂CO₄ diluido (1 min) y agua destilada (5 min). A continuación, se produjo la deshidratación sumergiendo los cortes en concentraciones crecientes de etanol en agua para finalizar en xileno y proceder al montaje con “DPX® Mountant for histology” (Sigma-Aldrich).

III.8.7. TOMA DE IMÁGENES Y CUANTIFICACIÓN DE LA SEÑAL

Para la toma de imágenes se empleó el microscopio Leica DMD 6200 (Leica Microsystems). Se utilizó el software Fiji (Bethesda, MD, EE.UU.) para cuantificar la señal nuclear de DAB en las células no parenquimales seleccionadas manualmente en 10 imágenes de cada muestra.

III.9. ENSAYO DE MIGRACIÓN DE MONOCITOS

El ensayo de migración de monocitos se realizó usando el kit “Calbiochem® Innocyte™ 96-Well Monocyte Cell Migration Assay” (Merck Milipore), basado en el principio de la cámara de Boyden, que consiste en insertar un cultivo celular revestido con una membrana porosa en una placa de cultivo diferente.

Se lavaron las células THP-1 2 veces con PBS para eliminar los restos de suero y se resuspendieron en medio X-VIVO 15 sin suplementar a una concentración de 3×10^6 células/mL. Se añadieron al pocillo inferior según corresponda 150 μ L de medio condicionado procedente de MDM tratados con RPV durante 48 h, human MCP-1 (CCL2) 10 ng/mL en medio X-VIVO 15 como control positivo o medio X-VIVO 15 sin suplementar como control negativo. Todas las condiciones se evaluaron por triplicado. Se añadieron 100 μ L de la suspensión de células en el pocillo superior y se dejaron migrar durante 15 h a 37°C y 5% de CO₂ en un incubador de células (IGO

150, Jouan). Al finalizar la migración los medios con las células migradas se transfirieron a una placa negra y cónica de 96 pocillos (proporcionada con el kit), la cual se centrifugó 10 min a 300 *g*. Se descartó el sobrenadante, se lavaron los pocillos con 200 μ L de PBS y, a continuación, se añadieron 100 μ L de “Cell Labeling Mixture” (Calcein-AM en PBS) a cada pocillo. Tras 30 min de incubación a 37°C en un incubador de CO₂, se leyó la placa usando un lector de placas de fluorescencia (SpectraMax Gemini XPS, Molecular Devices, San Jose, CA, EE.UU.), con una longitud de onda de excitación de 485 nm y 520 nm de emisión (Fig. III.2).

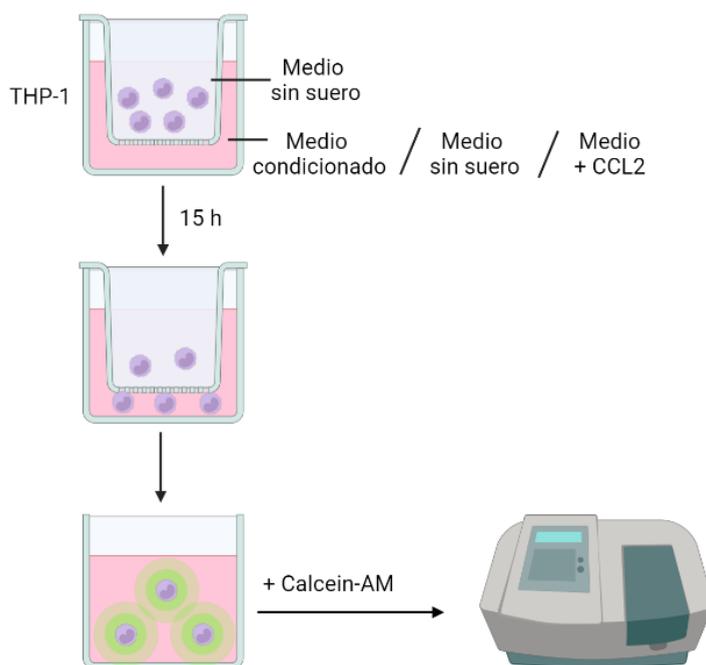


Figura III.2. Ensayo de migración de monocitos. Creado con BioRender.com.

III.10. PRESENTACIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los valores están expresados como media \pm error estándar de la media (SEM). El número de experimentos independientes (*n*) para cada parámetro está indicado en la leyenda de las figuras; todas las medidas se repitieron 3-8 veces. A menos que

se indique lo contrario, los datos están representados como porcentaje de control (ratones o células sin tratar considerados 100%). Los ratios de expresiones proteicas se expresan en tanto por 1 considerando 1 el valor del control. Los datos se analizaron usando el software GraphPad Prism® 8.0.2 (GraphPad Prism® Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.).

En los experimentos *in vivo*, las comparaciones se realizaron entre dos grupos diferentes y se analizaron independientemente mediante la prueba de *t* de Student. La significatividad estadística entre el grupo control y vehículo se expresó como # cuando $p < 0,05$, y la significatividad entre el grupo vehículo y el grupo tratado con el fármaco se expresó como * cuando $p < 0,05$.

Para los experimentos *in vitro*, se realizó en análisis ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni para comparar todos los tratamientos con su respectivo vehículo. La significatividad estadística se expresó como *, **, *** y **** cuando $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,005$ y $p < 0,0001$, respectivamente. Los análisis estadísticos del vehículo frente a los estímulos con TGF β o LPS, se realizaron usando el test *t* de Student (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,005$). Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para evaluar la fuerza y la dirección de la relación lineal de la expresión de dos genes que presentaban una distribución normal.

Para la cuantificación de las IHQ de STAT1, se realizó una transformación logarítmica (Ln) de los valores de cuantificación de señal, y se realizó una comparación entre sujetos en terapia con y sin RPV. Las diferencias en LnSTAT-1 se analizaron mediante el análisis de varianza factorial, considerando la exposición a RPV y los diagnósticos de esteatosis, esteatohepatitis y fibrosis como factores intersujetos, y el tiempo de exposición a RPV (meses) y el índice de masa corporal (IMC) como covariables.

IV. RESULTADOS

SECCIÓN I: CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE RILPIVIRINA EN UN MODELO NUTRICIONAL DE NAFLD

IV.1. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

En primer lugar, se realizó un análisis transcriptómico con muestras de tejido hepático de ratones alimentados durante 12 semanas con HFD y ratones HFD tratados con RPV que incluyó un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para detectar bloques de genes funcionalmente relacionados, significativamente regulados al alza o a la baja, agrupados como procesos biológicos de funciones.



Figura IV.1. Treemap mostrando los diferentes procesos biológicos relacionados con la inflamación y la quimiotaxis y migración de leucocitos que están significativamente reguladas a la baja en muestras hepáticas de ratones HFD tratados con RPV. Se muestran los términos “Gene Ontology” (GO). Los datos se obtuvieron del análisis bioinformático de enriquecimiento del conjunto de genes realizado después del análisis transcriptómico del ARN de tejido hepático completo de ratones de los grupos de HFD y HFD+RPV (n=3). p-valor ajustado <0,05.

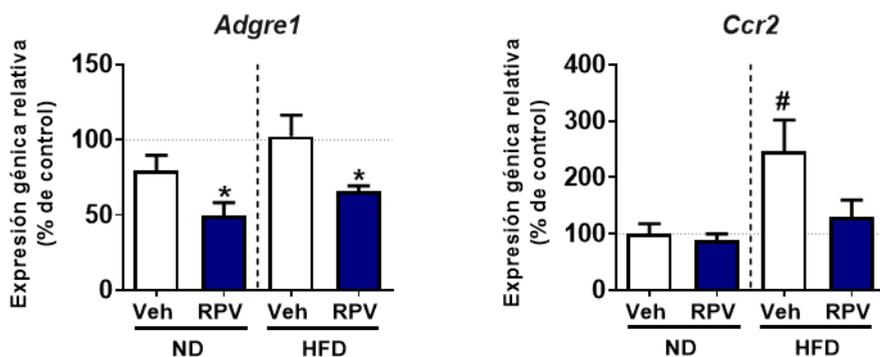
Entre los resultados obtenidos, es importante destacar los procesos biológicos relacionados con la respuesta inflamatoria y la quimiotaxis y migración de leucocitos, ya que son dos procesos íntimamente relacionados, de gran importancia en el desarrollo de la NAFLD y asociados a la activación de las células no parenquimales. En el treemap (Fig. IV.1) se observan los procesos biológicos relacionados con estas respuestas, representados jerárquicamente en rectángulos anidados, cuyo tamaño es proporcional a su expresión diferencial entre los grupos experimentales estudiados. Curiosamente, todas las funciones que se muestran fueron reguladas a la baja en respuesta a RPV. Entre ellas se encuentran las vías de señalización de las MAPK (incluidas las cascadas mediadas por JNK y p38), la señalización por NF- κ B y las vías de señalización reguladas por TLR. En los animales tratados con RPV también disminuyeron las funciones relacionadas con la regulación de citocinas y la activación de leucocitos, tal y como se muestra en la figura IV.1 y en la tabla IV.1.

Tabla IV.1. (Página siguiente) Lista de funciones biológicas relacionadas con la inflamación y la quimiotaxis y migración de leucocitos que están significativamente reguladas a la baja en ratones alimentados con HFD tratados con RPV. Se muestran los términos “Gene Ontology” (GO). Los datos se obtuvieron del análisis bioinformático de enriquecimiento del conjunto de genes realizado después del análisis transcriptómico del ARN de tejido hepático completo de ratones de los grupos de HFD y HFD+RPV (n=3). Lor: Logaritmo del odds ratio.

#término	Lor	p-valor ajustado
Vía de señalización de receptores tipo Toll (GO:0002224)	-0,39	4,8e ⁻⁴
Vía de señalización de Toll (GO:0008063)	-0,64	0,021
Importación de NF-κB al núcleo (GO:0042348)	-0,41	0,0068
Regulación de la señalización de IκB quinasa/ NF-κB (GO:0043122)	-0,27	2,4e ⁻⁵
Señalización de IκB quinasa/ NF-κB (GO:0007249)	-0,3	6,1e ⁻⁷
Regulación de la cascada de MAPK (GO:0043408)	-0,25	2,3e ⁻¹⁰
Regulación de la cascada de p38MAPK (GO:1900744)	-0,71	9,7e ⁻⁴
Regulación de la cascada de JNK (GO:0046328)	-0,27	4,9e ⁻⁴
Migración de leucocitos (GO:0050900)	-0,18	0,0032
Quimiotaxis (GO:0006935)	-0,11	0,016
Regulación de extravasación celular (GO:0002691)	-0,66	0,007
Regulación de quimiotaxis de leucocitos (GO:0002688)	-0,24	0,027
Regulación de la adhesión celular (GO:0030155)	-0,16	0,002
Regulación de la migración celular (GO:0030334)	-0,2	5,6e ⁻⁷
Quimiotaxis de leucocitos (GO:0030595)	-0,18	0,021
Regulación del proceso apoptótico de macrófagos (GO:2000109)	-0,63	0,024
Regulación de la activación de leucocitos (GO:0002694)	-0,22	4,6e ⁻⁶
Activación de macrófagos involucrada en la respuesta inmune (GO:0002281)	-0,64	0,015
Vía de señalización mediada por integrinas (GO:0007229)	-0,23	0,017
Regulación de la producción de citocinas implicadas en la respuesta inflamatoria (GO:1900015)	-0,52	0,037
Respuesta inflamatoria aguda (GO:0002526)	-0,37	1,1e ⁻⁵
Respuesta inflamatoria (GO:0006954)	-0,24	1,8e ⁻⁹
Respuesta celular al LPS (GO:0071222)	-0,19	0,018
Vía de señalización mediada por IL-1 (GO:0070498)	-0,44	0,042
Regulación de producción de IL-6 (GO:0032675)	-0,2	0,037

IV.2. ESTUDIO DE LA INFILTRACIÓN DE MACRÓFAGOS EN EL HÍGADO

Los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico nos llevaron a estudiar la capacidad de RPV para regular la infiltración de macrófagos al hígado en el modelo animal de NAFLD inducida por HFD. Para ello, analizamos mediante qRT-PCR la expresión génica del marcador de macrófagos *Adgre1*, que codifica para la proteína F4/80, en las muestras de tejido hepático de los ratones. El tratamiento con RPV produjo una disminución estadísticamente significativa en la expresión de *Adgre1* tanto en los ratones que recibieron ND como en los ratones alimentados con HFD (Fig. IV.2.A). También analizamos la expresión génica del receptor de quimiocinas *Ccr2*, característico de macrófagos infiltrados (137). El daño hepático aumentó la expresión de *Ccr2* en los ratones HFD que volvió a la normalidad en el grupo HFD+RPV. Estos resultados sugerían una reducción de la infiltración macrofágica inducida por la HFD, la cual fue confirmada a nivel histológico mediante IHQ, al observar que la administración crónica de RPV redujo el número de células CCR2⁺ en el área periportal de los hígados de los ratones HFD (Fig. IV.2.B).

A

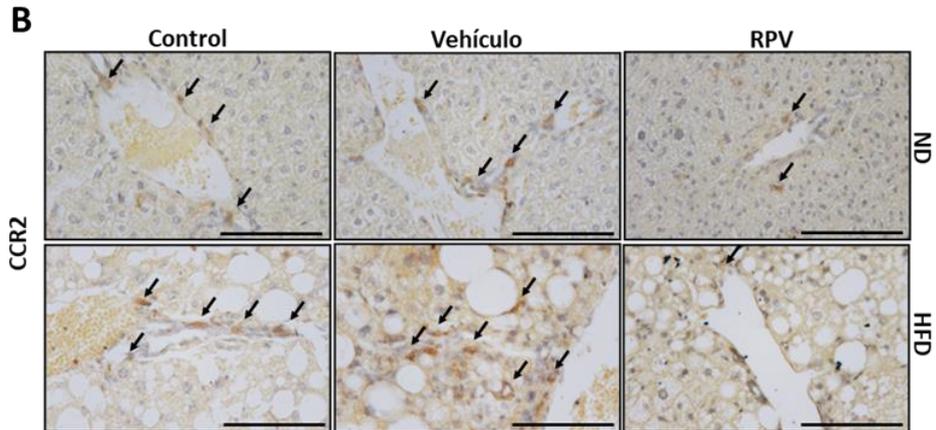


Figura IV.2. Estudio de la infiltración de macrófagos CCR2⁺ en el hígado en respuesta a HFD y tratamiento con RPV. (A) Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR del marcador de macrófagos *Adgre1* (F4/80), y de *Ccr2*, característica de macrófagos infiltrados, en tejido hepático de ratón. (B) Imágenes representativas de IHQ de CCR2 en área periportal de ratón (n=4). Las flechas negras señalan las células positivas. Barra de escala= 0,1 mm. ND: Dieta normal; HFD: Dieta rica en grasas. Los resultados (media \pm SEM; n=6) se representan como expresión relativa respecto a la observada en ratones no tratados del grupo ND (control, considerado 100%). Los datos de expresión génica se normalizaron frente a la expresión del gen *Actb*. El análisis estadístico se realizó mediante el test *t* de Student (**p*<0,05 RPV frente a Veh; #*p*<0,05 Veh ND frente a Veh HFD).

SECCIÓN II: CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIINFLAMATORIA INDUCIDA POR RILPIVIRINA EN CÉLULAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS

IV.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES DE LA INFLAMACIÓN

En primer lugar, realizamos un análisis de la expresión génica de distintos marcadores relacionados con la respuesta inflamatoria y fibrogénica en células LX-2, empleadas como modelo *in vitro* de HSC. Para ello, se trataron las células con diferentes concentraciones de RPV (1, 2, 4 y 8 μ M) durante 48 h. Las células también se cotrataron con bajas concentraciones de TGF β (2,5 ng/mL) para aumentar su activación a miofibroblastos profibrogénicos.

Los resultados mostraron la capacidad de RPV para reducir de forma significativa y dependiente de la concentración la expresión génica de la citocina proinflamatoria *IL1B* tanto en células LX-2 estimuladas con TGF β como sin estimular. Curiosamente, el propio TGF β redujo de manera significativa la expresión de *IL1B*. El tratamiento con RPV también redujo de forma significativa y concentración-dependiente la expresión génica de la principal quimiocina implicada en la infiltración de macrófagos al hígado, *CCL2*, tanto en células sin estimular como tras la inducción producida en condiciones profibrogénicas (TGF β), y no produjo ningún efecto sobre la expresión de *CXCL8*, una potente quimiocina para neutrófilos (Fig. IV.3). Finalmente, analizamos la expresión génica del receptor nuclear *PPARG*, el cual se ha asociado con efectos antiinflamatorios y antifibrogénicos en HSC (168). RPV incrementó la expresión de *PPARG* en las células sin estimular, pero no normalizó el descenso producido por el tratamiento con TGF β .

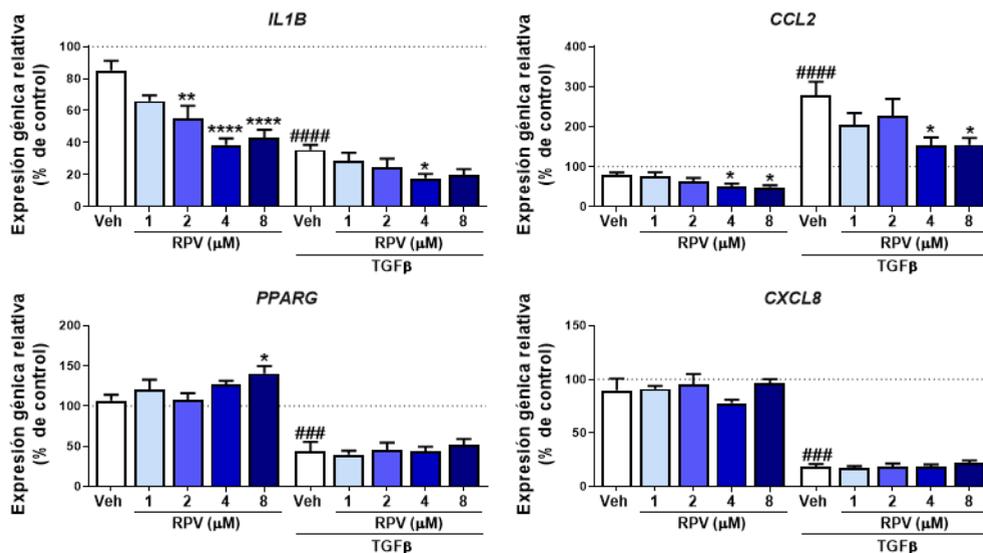


Figura IV.3. Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR de mediadores inflamatorios en células LX-2 tratadas con distintas concentraciones de RPV durante 48 h, en condiciones basales o estimuladas con TGFβ (2,5 ng/mL). Los resultados (media ± SEM; n=4-7) se representan como expresión relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 100%) y se normalizaron frente a la expresión del gen *ACTB*. El análisis estadístico se realizó mediante el test ANOVA de una vía, seguido por un test de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,0001$) en el caso del tratamiento con el fármaco respecto a su vehículo o estímulo y el test *t* de Student (### $p < 0,0005$ y ##### $p < 0,0001$) en el caso del estímulo respecto al vehículo.

IV.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA

Se evaluó la expresión génica de los inflammasomas NLRP1, NLRP3, NLRC4 y AIM2 en nuestro modelo de células LX-2 descrito en el apartado anterior. De los cuatro inflammasomas estudiados, solo se observó una reducción en la expresión del inflammasoma *NLRP3* cuando las células fueron tratadas con RPV, estimuladas o no con TGFβ (Fig. IV.4). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la expresión de *NLRP1*, y no fue posible detectar la expresión génica de los inflammasomas *NLRC4* y *AIM2*, a pesar de que ambos se expresan de manera moderada en HSC según la literatura (169). Al evaluar la expresión génica de los demás componentes del inflammasoma, observamos que RPV redujo de manera

dependiente de la concentración la expresión de *PYCARD* (ASC) y *CASP1* en condiciones basales (Fig. IV.4). En cambio, TGF β produjo una importante y significativa disminución de la expresión de ambos componentes, probablemente debido al tiempo de ensayo empleado (48 h), sin que el cotratamiento con RPV afectara estos niveles.

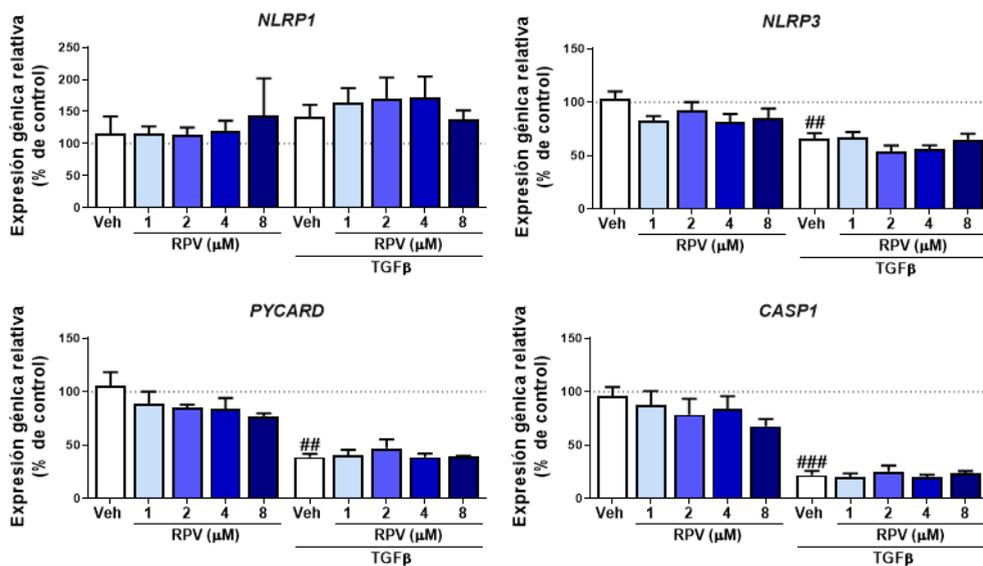


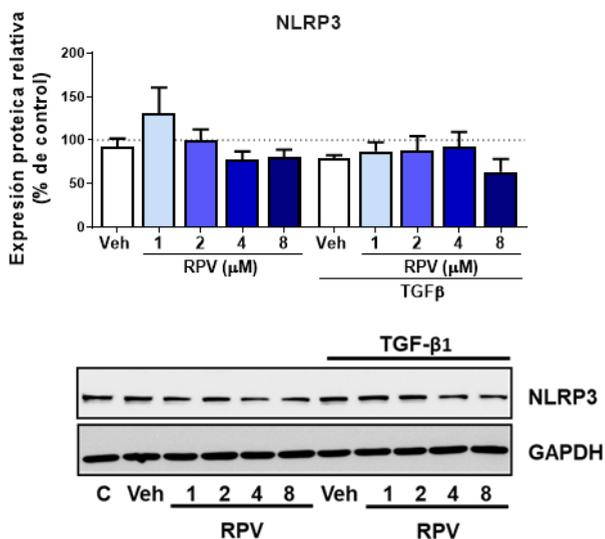
Figura IV.4. Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR de componentes del inflamasoma en células LX-2 tratadas con distintas concentraciones de RPV durante 48 h, en condiciones basales o estimuladas con TGF β (2,5 ng/mL). Los resultados (media \pm SEM; n=5-6) se representan como expresión relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 100%) y se normalizaron frente a la expresión del gen *ACTB*. El análisis estadístico se realizó mediante el test ANOVA de una vía, seguido por un test de Bonferroni en el caso del tratamiento con el fármaco respecto a su vehículo o estímulo y el test *t* de Student (##p<0,01 y ###p<0,0001) en el caso del estímulo respecto al vehículo.

Para corroborar el efecto de RPV en la activación del inflamasoma NLRP3 en células LX-2, se evaluó su expresión proteica y la de la caspasa-1.

Después de 48 h de tratamiento con el fármaco, las células mostraron una ligera disminución de la expresión de NLRP3 tanto en condiciones basales como cuando fueron estimuladas con TGF β como se puede observar en las imágenes de WB (Fig.

IV.5.A). La activación de la enzima caspasa-1 se evaluó mediante WB, por medio de la caracterización de la escisión que sufre su forma inactiva, pro-caspasa-1 (45 kDa), para generar su forma activa (20 kDa). Esta caracterización se realizó analizando el ratio entre las expresiones de ambas subunidades (p20/p45). Los resultados mostraron que el tratamiento con RPV produce una disminución de la activación de la caspasa 1 en este tipo celular, tanto en condiciones basales (sin estimular) como profibrogénicas (cotratamiento con TGFβ) (Fig. IV.5.B).

A



B

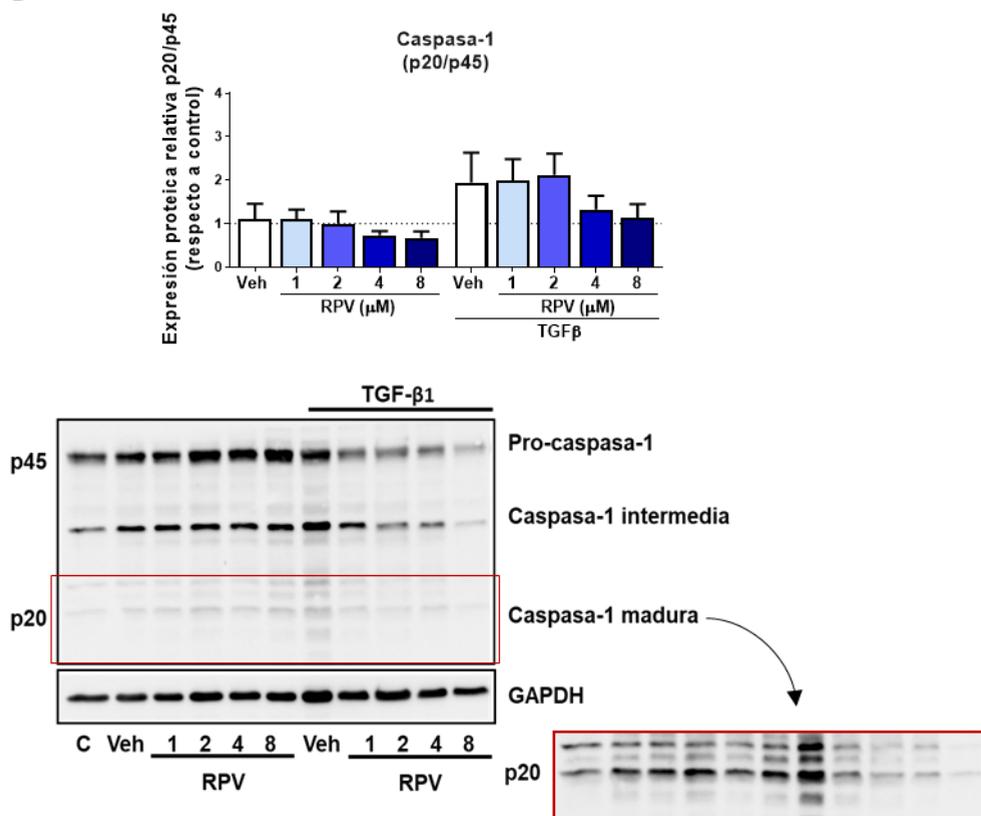


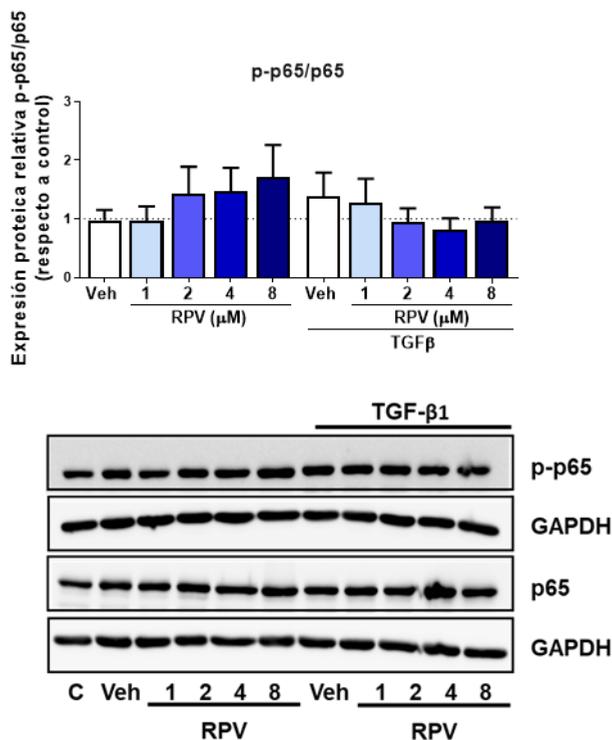
Figura IV.5. Estudio mediante WB de la activación del inflammasoma NLRP3 en células LX-2 tratadas con distintas concentraciones de RPV durante 48 h, en condiciones basales o estimuladas con TGFβ (2,5 ng/mL). Cuantificación e imágenes representativas de WB de NLRP3, caspasa-1 y caspasa-1 madura. La activación de caspasa-1 se evaluó mediante el ratio entre la forma activa, de 20 kDa, y la pro-caspasa-1, de 45 kDa. Los resultados (media ± SEM; n=6-9) se representan como expresión relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 100% o 1, en el ratio). La expresión proteica se normalizó frente a la expresión de GAPDH.

IV.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE NF-κB

NF-κB es un factor de transcripción fundamental en la respuesta inflamatoria hepática cuya activación se ha visto reducida en respuesta a RPV en distintos modelos murinos de CLD (46). Para estudiar su activación en células LX-2, analizamos el efecto del tratamiento con RPV en la fosforilación de la principal

subunidad responsable de la actividad transcripcional de NF- κ B, p65. Los resultados no mostraron ningún cambio significativo en la fosforilación de p65, aunque sí se observó una tendencia de manera concentración-dependiente a aumentar la fosforilación de p65 en condiciones basales y una tendencia a reducir la fosforilación cuando las células fueron estimuladas con TGF β (Fig. IV.6.A). Ya que p65 puede sufrir diferentes fosforilaciones y el anticuerpo empleado solo detecta la ubicada en la Serina 536, procedimos a estudiar su traslocación al núcleo analizando su expresión en extractos nucleares obtenidos de las células tratadas con las diferentes concentraciones de RPV (1, 2, 4 y 8 μ M) durante 48 h. De nuevo, no se observó ningún cambio significativo en la expresión proteica nuclear de p65 en respuesta a este fármaco antirretroviral (Fig. IV.6.B).

A



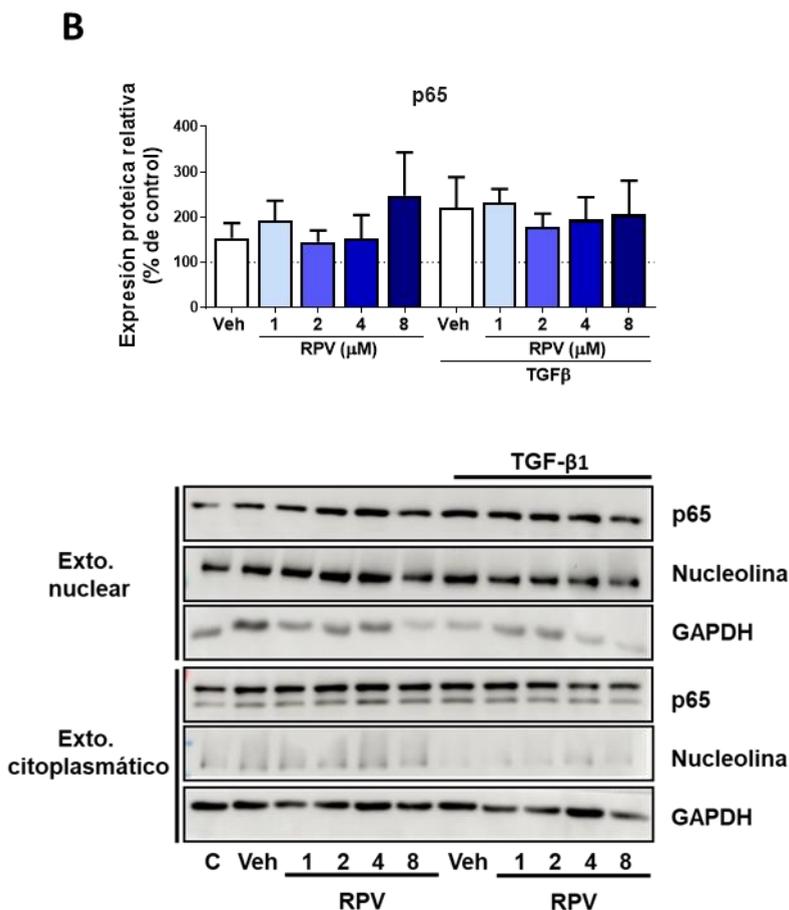


Figura IV.6. Estudio mediante WB de la activación de NF-κB en células LX-2 tratadas con distintas concentraciones de RPV durante 48 h, en condiciones basales o estimuladas con TGFβ (2,5 ng/mL). Cuantificación e imágenes representativas de WB de la activación de p65 (ratio entre la forma fosforilada, p-p65 y la forma total de la proteína) (A) y la traslocación al núcleo de p65 (B). Los resultados (media ± SEM; n=5-8) se representan como expresión relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 1 en el ratio o 100%). La expresión proteica se normalizó frente a la expresión de GAPDH (A) o nucleolína (B).

IV.6. ANÁLISIS DE LA SECRECIÓN DE CCL2

Dado que observamos una menor infiltración de los macrófagos CCR2⁺ al hígado en ratones HFD en tratamiento con RPV (Fig.IV.2), y que este fármaco redujo la expresión génica del principal ligando de CCR2, CCL2, en las células LX-2 (Fig. IV.3),

procedimos a evaluar la secreción de CCL2. Mediante ELISA, analizamos la presencia de CCL2 en medio de cultivo de las células LX-2 tratadas con RPV durante 48 h en presencia o ausencia de TGF β , un estímulo que induce la secreción de CCL2 (170). Como se muestra en la figura, TGF β aumentó significativamente los niveles de esta quimiocina en el medio de cultivo celular, mientras que RPV redujo de forma significativa y dependiente de la concentración la secreción de CCL2 en ambas condiciones (Fig. IV.7).

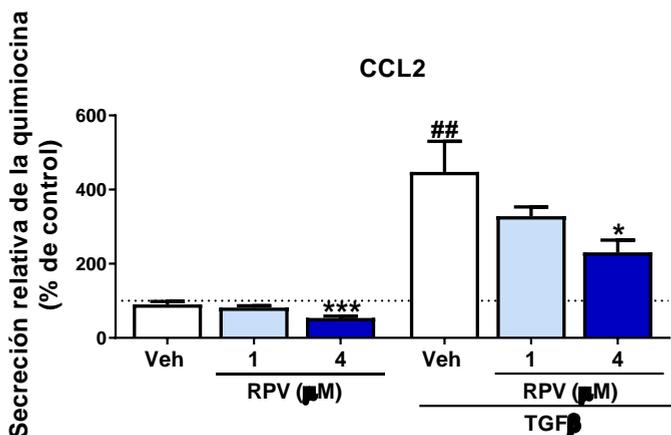


Figura IV.7. Estudio de la secreción de la quimiocina CCL2 mediante ELISA en células LX-2 tratadas con distintas concentraciones de RPV durante 48 h, en condiciones basales o estimuladas con TGF β (2,5 ng/mL). Los resultados (media \pm SEM; n=5-8) se representan como secreción relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 100%). El análisis estadístico se realizó mediante el test ANOVA de una vía, seguido por un test de Bonferroni (* p <0,05 y *** p <0,005) en el caso del tratamiento con el fármaco respecto a su vehículo o estímulo y el test t de Student (## p <0,01) en el caso del estímulo respecto al vehículo.

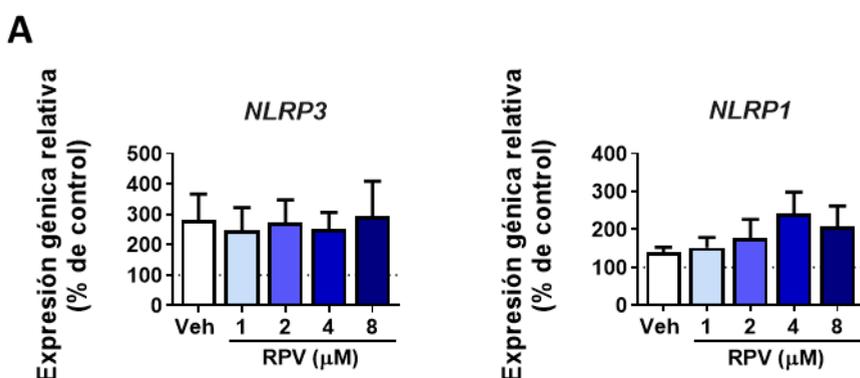
SECCIÓN III: CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIINFLAMATORIA INDUCIDA POR RILPIVIRINA EN MACRÓFAGOS

IV.7. EVALUACIÓN DE VÍAS INFLAMATORIAS

IV.7.1. VÍA DEL INFLAMASOMA

Para los ensayos *in vitro* en macrófagos se emplearon MDM diferenciados con M-CSF durante 7 días y tratados con RPV durante las últimas 48 h. El análisis de la expresión génica del inflamasoma *NLRP3* no mostró cambios significativos inducidos por RPV, mientras que la expresión de *NLRP1* fue regulada al alza y de forma concentración-dependiente por RPV. En cambio, al evaluar la expresión de los componentes del inflamasoma, sí se produjo una reducción dependiente de la concentración de RPV en la expresión génica de *PYCARD* (ASC) y *CASP1* (Fig. IV.8.A).

El análisis proteico realizado por WB mostró que RPV también reduce de manera dependiente de la concentración la expresión de NLRP3 y la activación de la enzima caspasa-1 en MDM, evaluada como la escisión de su forma inactiva, pro-caspasa-1 (45 kDa) a su forma activa (20 kDa) (Fig. IV.8.B).



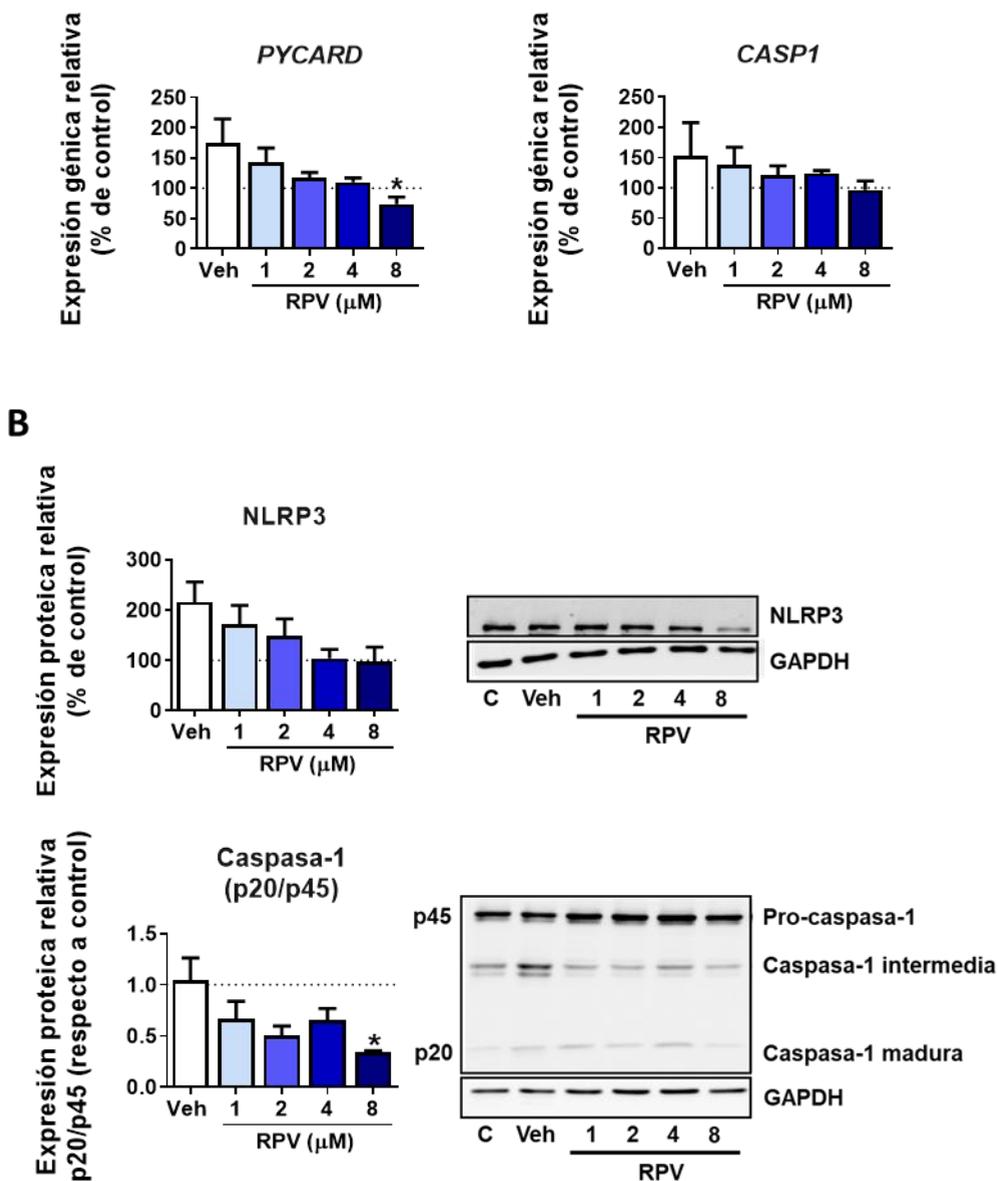


Figura IV.8. Estudio de la activación del inflamasoma en MDM tratados con distintas concentraciones de RPV durante 48 h. (A) Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR de los componentes del inflamasoma. (B) Cuantificación e imágenes representativas de WB de NLRP3 y caspasa-1. La activación de caspasa-1 se evaluó mediante el ratio entre la forma activa, de 20 kDa, y la pro-caspasa-1, de 45 kDa. Los resultados (media \pm SEM; n=3-5) se representan como expresión relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 100% o 1, en el ratio). Los datos de expresión génica se normalizaron frente a la expresión del gen *ACTB* y la expresión proteica se normalizó frente a la expresión

de GAPDH. El análisis estadístico se realizó mediante el test ANOVA de una vía, seguido por un test de Bonferroni ($*p < 0,05$) en el caso del tratamiento con el fármaco respecto a su vehículo.

IV.7.2. VÍA DE NF- κ B

Como se puede observar en la imagen y en la cuantificación por densitometría, el tratamiento de MDM con RPV disminuyó la fosforilación de la subunidad p65, aunque este efecto no alcanzó significatividad estadística (Fig.IV.9).

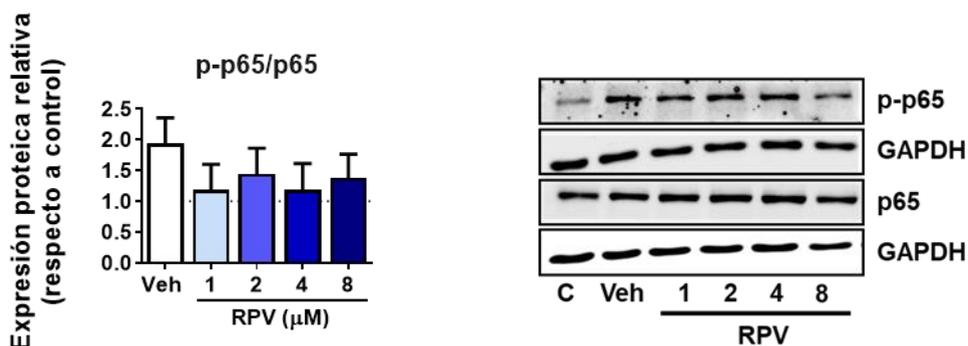


Figura IV.9. Estudio mediante WB de la activación de NF- κ B en MDM tratados con distintas concentraciones de RPV durante 48 h. Cuantificación e imágenes representativas de WB de la activación de p65 (ratio entre la forma fosforilada, p-p65 y la forma total de la proteína). Los resultados (media \pm SEM; n=5) se representan como expresión relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 1). La expresión proteica se normalizó frente a la expresión de GAPDH.

IV.7.3. VÍA DE LAS SAPK

La activación de las SAPK en los macrófagos hepáticos está asociada con el desarrollo de la inflamación y la progresión de la NAFLD. Al estudiar el efecto de RPV sobre esta vía, RPV mostró su capacidad para reducir, de manera dependiente de la concentración, la fosforilación y, por tanto, la activación de las SAPK, JNK1 y p38 en los MDM (Fig. IV.10), confirmando que la acción antiinflamatoria de RPV en estas células afecta a diferentes vías de señalización intracelular.

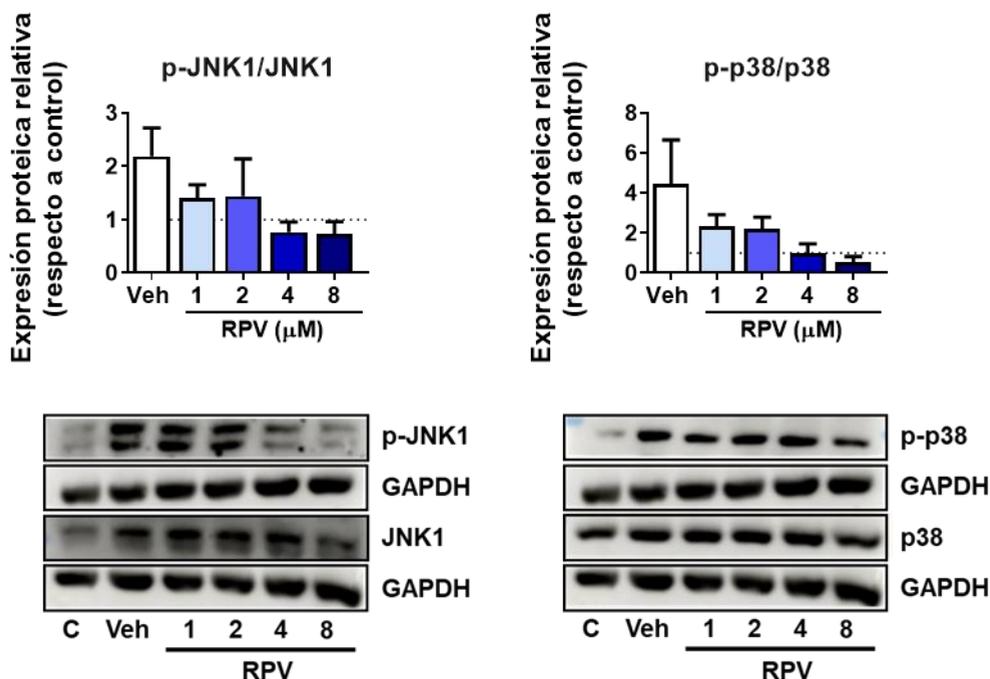
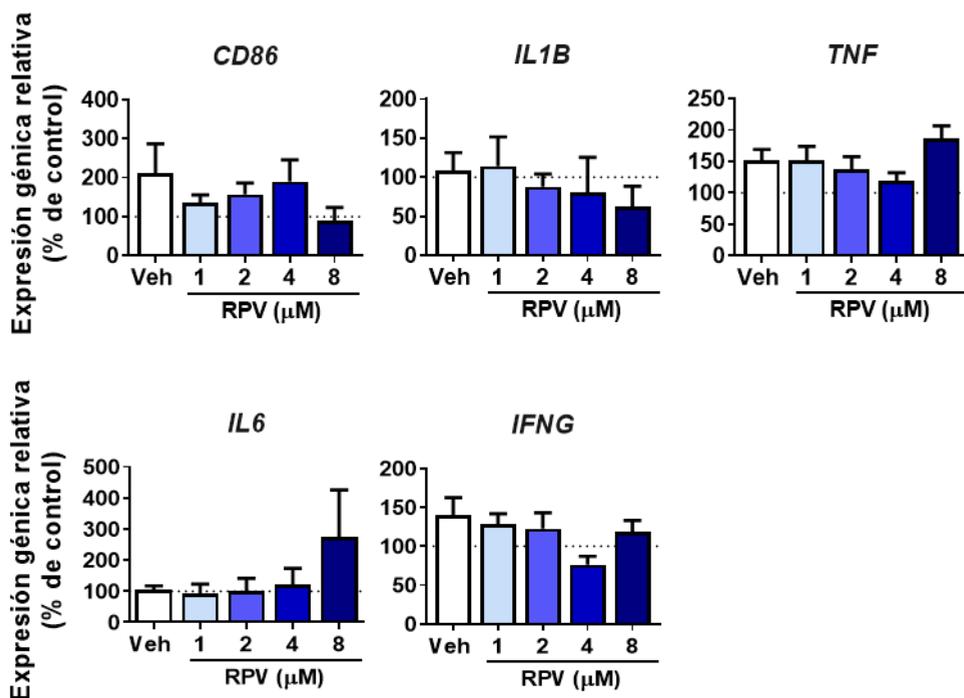


Figura IV.10. Estudio mediante WB de la activación de SAPK en MDM tratados con distintas concentraciones de RPV durante 48 h. Cuantificación e imágenes representativas de WB de la activación de JNK1 y p38 (ratio entre la forma fosforilada y la forma total de la proteína). Los resultados (media ± SEM; n=3-4) se representan como expresión relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 1). La expresión proteica se normalizó frente a la expresión de GAPDH.

IV.8. ESTUDIO DE LA POLARIZACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS

El siguiente objetivo fue caracterizar el efecto de RPV en la polarización de los macrófagos, para ello, se analizó la expresión génica mediante qRT-PCR de diferentes marcadores macrofágicos en MDM tratados con distintas concentraciones de RPV (1, 2, 4 y 8 μM) durante 48 h. Los marcadores estudiados han sido clasificados tradicionalmente como marcadores de macrófagos proinflamatorios M1 (*CD86*, *IL1B*, *TNF*, *IL6* y *IFNG*) y antiinflamatorios M2 (*CD206*, *CD163*, *TGFB1*, *IL10* y *ARG1*), aunque esta clasificación tiene importantes limitaciones debido a la gran plasticidad de los macrófagos en respuesta al

microambiente. Así, el efecto de RPV fue heterogéneo, al producir simultáneamente aumentos y disminuciones en la expresión de marcadores pertenecientes a ambos grupos. Destacando la regulación de los genes que resultó ser estadísticamente significativa, RPV redujo de manera concentración-dependiente la expresión de *CD163* e incrementó la de *TGFB1* y *ARG1* (Fig. IV.11). De manera no estadísticamente significativa, se apreció cierta tendencia a reducir la expresión de *CD86*, *CD206*, *IL1B* e *IFNG* y a incrementar la expresión de *IL6* e *IL10*. La expresión de *TNF* varió en función de la concentración de RPV empleada, observándose una ligera reducción en la expresión de esta citocina con las concentraciones de 2 y 4 μM , mientras que la mayor concentración utilizada (8 μM) indujo un aumento.

A

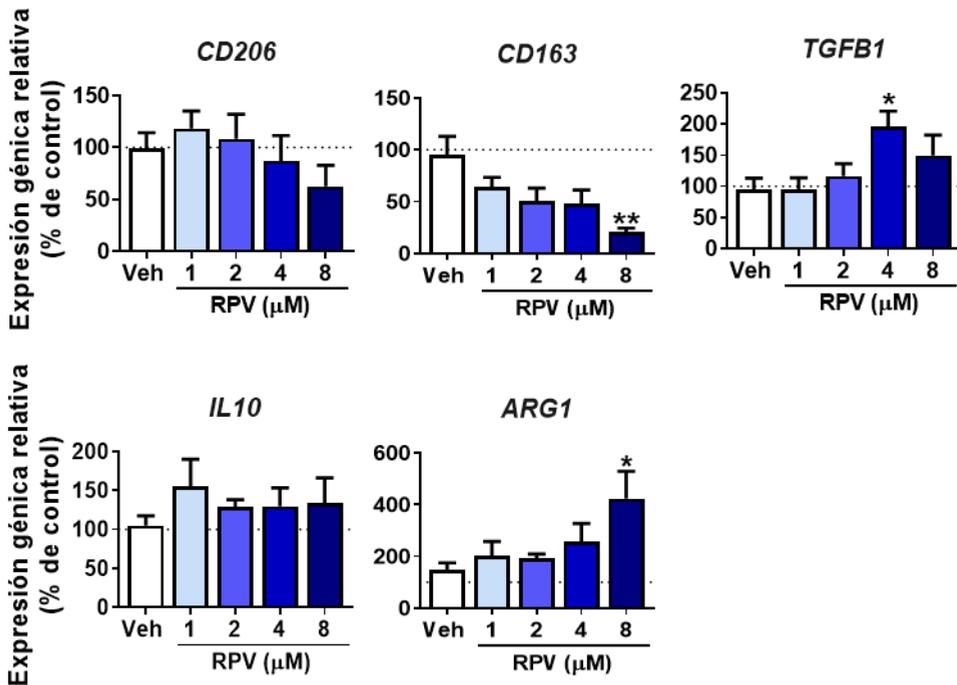
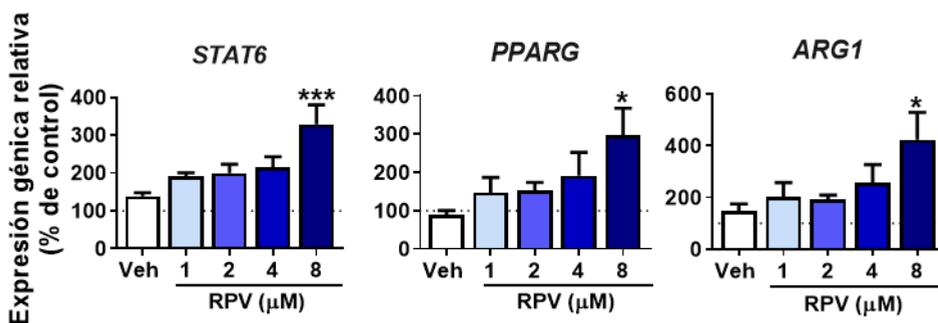
B

Figura IV.11. Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR de marcadores de polarización en MDM tratados con distintas concentraciones de RPV durante 48 h. (A) Efecto de RPV en la expresión génica de marcadores asociados a macrófagos M1 (*CD86*, *IL1B*, *TNF*, *IL6* y *IFNG*) y (B) marcadores asociados a macrófagos M2 (*CD206*, *CD163*, *TGFB1*, *IL10* y *ARG1*). Los resultados (media \pm SEM; n=4-6) se representan como expresión relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 100%) y se normalizaron frente a la expresión del gen *ACTB*. El análisis estadístico se realizó mediante el test ANOVA de una vía, seguido por un test de Bonferroni (*p<0,05 y **p<0,01) en el caso del tratamiento con el fármaco respecto a su vehículo.

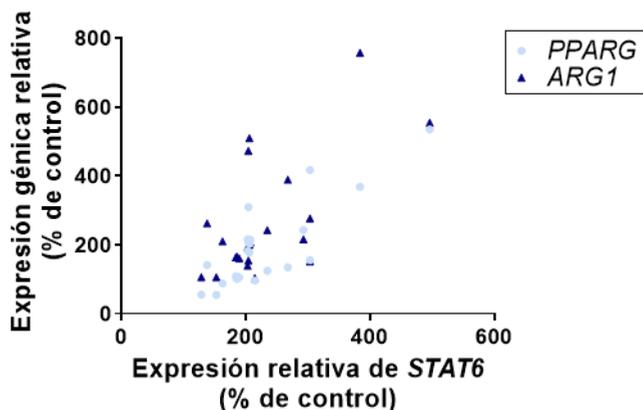
El claro incremento detectado en la expresión génica de *ARG1* nos llevó a estudiar factores de transcripción implicados en su regulación que son, además, de gran relevancia en la polarización macrofágica hacia un fenotipo antiinflamatorio. En macrófagos, el factor de transcripción STAT6, además de regular la expresión génica y proteica de PPAR γ , actúa como un factor facilitador de su actividad al promover la unión de este al ADN y, en consecuencia, aumentar la transcripción de genes diana como *ARG1* (88,171,172). De este modo, observamos que RPV

incrementó de manera significativa y dependiente de la concentración la expresión génica de *STAT6* y *PPARG* (Fig. IV.12.A). Además, en las células tratadas con RPV la expresión génica de *PPARG* y *ARG1* mostró una correlación positiva y estadísticamente significativa con la de *STAT6*, con un *r* de 0,8240 y de 0,6423, respectivamente (Fig. IV.12.B).

A



B

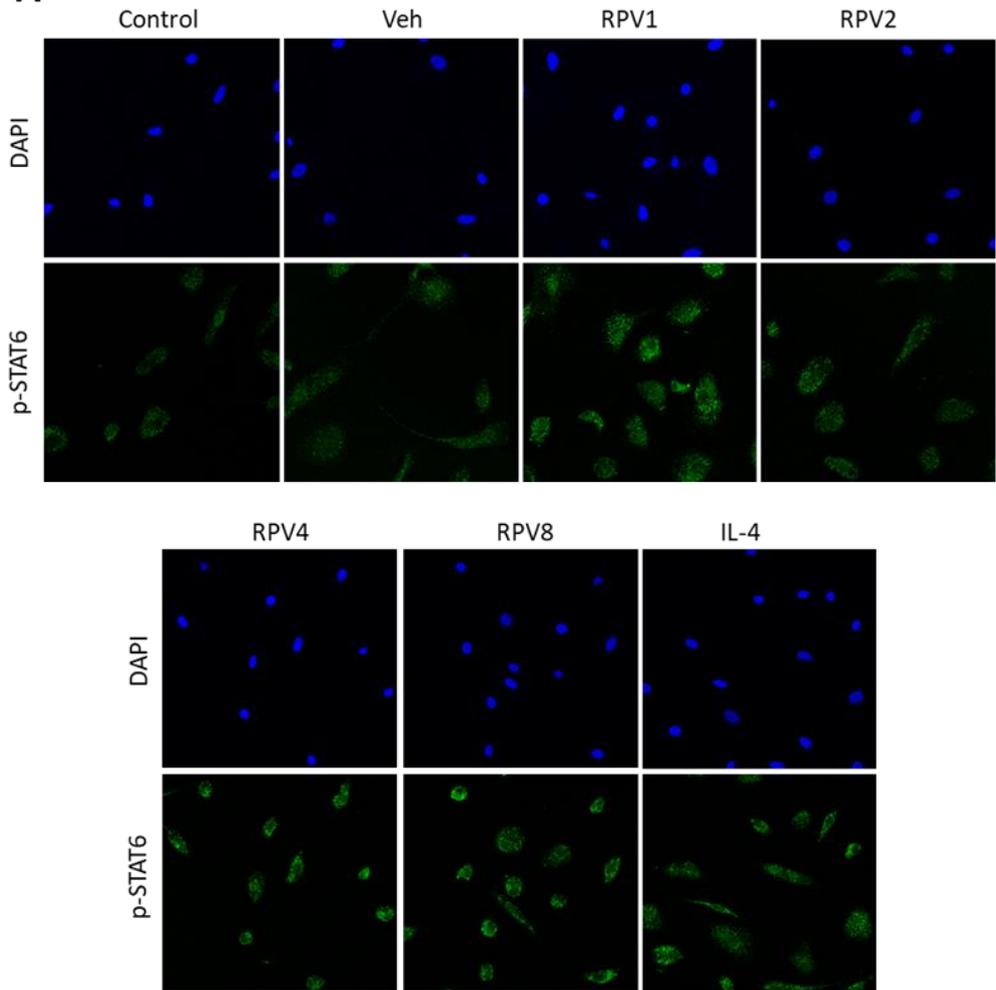


PEARSON r	<i>PPARG</i> vs <i>STAT6</i>	<i>ARG1</i> vs <i>STAT6</i>
r	0,8240	0,6423
P (bilateral)	< 0,0001	0,0013

Figura IV.12. (Página anterior) Estudio de la vía STAT6/PPARG/ARG1 mediante qRT-PCR en MDM tratados con distintas concentraciones de RPV durante 48 h. (A) Expresión génica de *STAT6*, *PPARG* y *ARG1*. (B) Correlación de Pearson de *STAT6* con *PPARG* y *ARG1*. Los resultados (media \pm SEM; n=5-6) se representan como expresión relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 100%) y se normalizaron frente a la expresión del gen *ACTB*. El análisis estadístico se realizó mediante el test ANOVA de una vía, seguido por un test de Bonferroni (* $p < 0,05$ y *** $p < 0,005$) en el caso del tratamiento con el fármaco respecto a su vehículo. r: coeficiente de correlación de Pearson.

A continuación, quisimos comprobar la activación de la vía de STAT6 a nivel proteico. Para ello, analizamos la expresión de su forma fosforilada y su traslocación al núcleo en MDM mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Al cuantificar la señal nuclear respecto a la citoplasmática por unidad celular, se observa que RPV induce una mayor traslocación al núcleo de p-STAT6 en las concentraciones de 2 y 4 μM , efecto que no se produce con las concentraciones de 1 y 8 μM (Fig. IV.13). Inusualmente, no observamos el efecto esperado para la citocina caracterizada como su principal inductor, IL4.

A



B

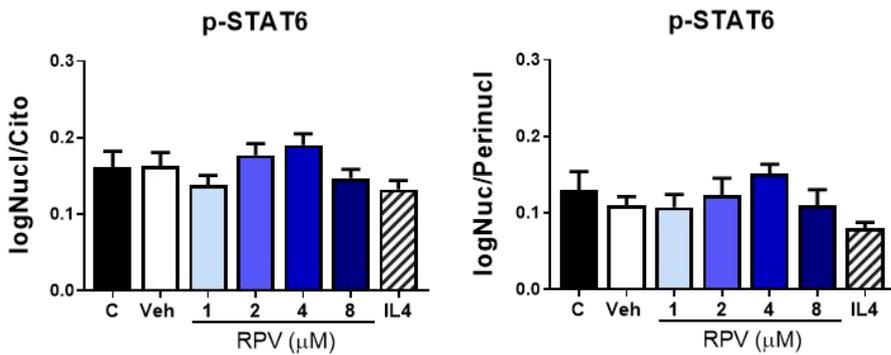


Figura IV.13. (Página anterior) Análisis de la expresión de p-STAT6 en MDM tratados con distintas concentraciones de RPV durante 48 h. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal (20x): DAPI (azul, núcleos) y anticuerpo p-STAT6 (verde). (B) Cuantificación de la señal. Los resultados (media \pm SEM; n=5) se representan como logaritmo de la señal nuclear respecto a la citoplasmática o perinuclear por célula. Control positivo: IL4 20 ng/mL.

Debido a la estrecha regulación que existe entre los diferentes miembros de la familia STAT, estudiamos la activación por fosforilación tanto de STAT1 como de STAT3 en los MDM tratados con RPV. La incubación con RPV durante 48 h redujo claramente la activación de STAT1, tal y como indica la disminución en el ratio entre la forma fosforilada y la no fosforilada observada en las imágenes representativas y en la cuantificación por densitometría. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la activación de STAT3, aunque la cuantificación de las imágenes reveló cierta tendencia a su disminución (Fig. IV.14).

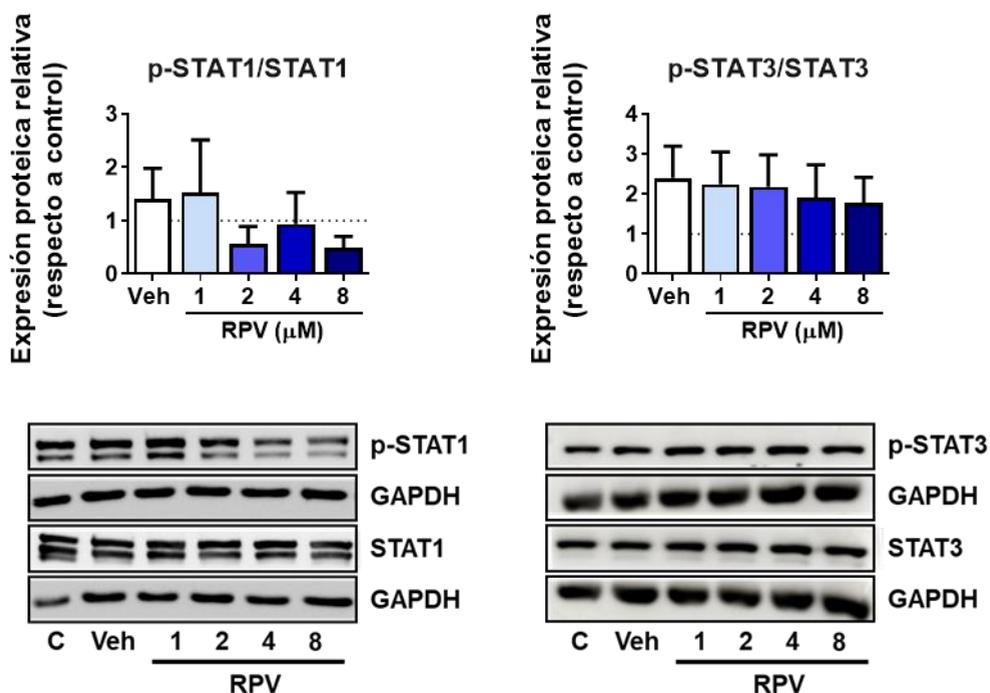


Figura IV.14. (Página anterior) Estudio mediante WB de la activación de STAT1 y STAT3 en MDM tratados con distintas concentraciones de RPV durante 48 h. Cuantificación e imágenes representativas de WB de la activación de STAT1 y STAT3 (ratio entre la forma fosforilada y la forma total de la proteína). Los resultados (media \pm SEM; n=3-5) se representan como expresión relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 1). La expresión proteica se normalizó frente a la expresión de GAPDH.

IV.9. ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN

Los macrófagos se encuentran entre las principales células secretoras de las quimiocinas que modulan la infiltración de células inmunes al hígado. Es por ello, que nos planteamos analizar el efecto que produce RPV en la expresión génica de diferentes quimiocinas de relevancia en la fisiopatología hepática en el modelo de MDM. Los resultados mostraron la capacidad de RPV para reducir de manera concentración-dependiente la expresión génica de *CCL2*, la principal quimiocina que regula la migración de macrófagos al hígado, y de *CXCL9*, que induce la migración de las células T, mientras que no indujo ningún efecto en la expresión de *CCL5* y *CXCL10*, también implicados en la migración de macrófagos (Fig. IV.15).

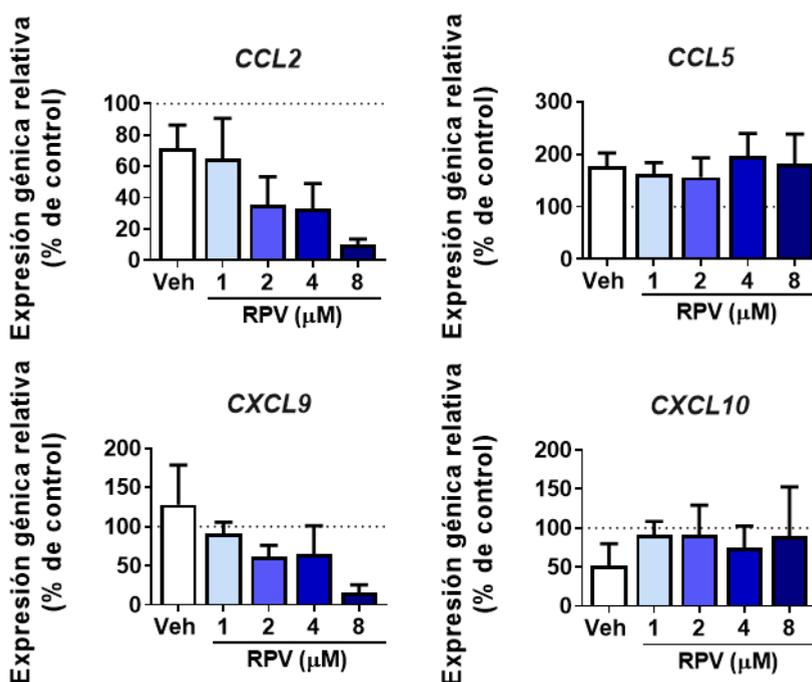


Figura IV.15. (Página anterior) Estudio de la expresión génica mediante qRT-PCR de varias quimiocinas en MDM tratados con distintas concentraciones de RPV durante 48 h. Los resultados (media \pm SEM; n=4-6) se representan como expresión relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 100%) y se normalizaron frente a la expresión del gen *ACTB*.

El análisis mediante ELISA de la secreción de CCL2 al medio de cultivo por parte de los MDM mostró una reducción significativa y concentración dependiente en los niveles de CCL2 en aquellos medios que provenían de MDM tratados con RPV durante 48 h (Fig. IV.16). Como control positivo se empleó un cocktail de LPS con IFN γ que incrementó considerablemente la secreción de CCL2, demostrando la capacidad de secreción de esta quimiocina por parte de nuestro modelo *in vitro*.

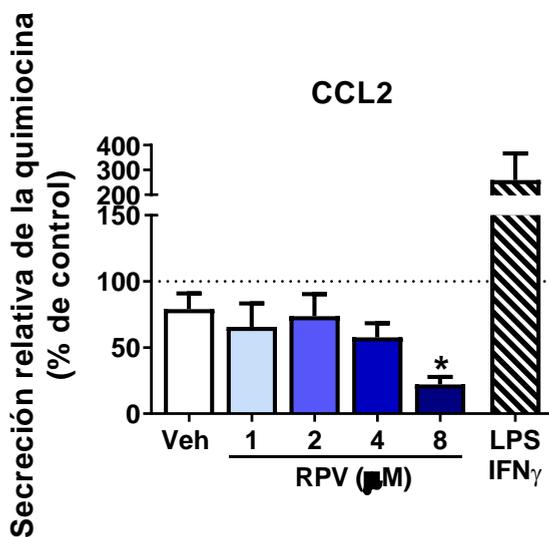


Figura IV.16. Estudio de la secreción de la quimiocina CCL2 mediante ELISA en MDM tratados con distintas concentraciones de RPV durante 48 h. Los resultados (media \pm SEM; n=4) se representan como secreción relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 100%). Control positivo: LPS (0,1 μ g/mL) + IFN γ (20 ng/mL). El análisis estadístico se realizó mediante el test ANOVA de una vía, seguido por un test de Bonferroni (*p<0,05) en el caso del tratamiento con el fármaco respecto a su vehículo.

Estos mismos medios de cultivo se utilizaron para realizar un ensayo de migración de monocitos *in vitro*. En este caso se empleó como modelo la línea celular

monocítica THP-1 por su demostrada capacidad de respuesta a la quimiocina CCL2 (173). Como control negativo se incluyó una condición con únicamente medio X-VIVO 15 (sin suero) en el pocillo inferior. Se añadió otra condición con medio X-VIVO 15 y una concentración conocida de la quimiocina CCL2, 10 ng/mL, para comprobar la capacidad de migración de las células THP-1 en nuestras condiciones de ensayo en respuesta a dicha quimiocina (Fig. IV.17). Tras 15 h de incubación se observó una menor migración de manera concentración-dependiente de estas células hacia las condiciones con medio de cultivo procedente de MDM tratados con RPV.

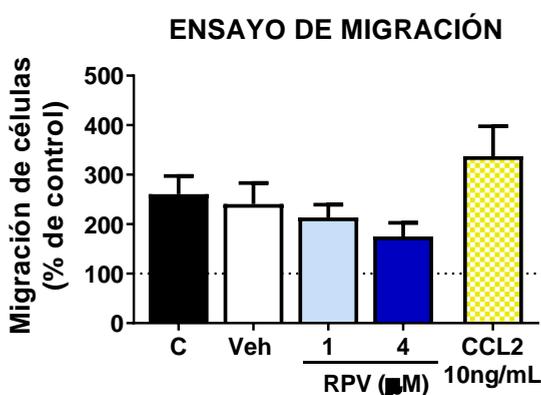


Figura IV.17. Ensayo de migración de células THP-1 hacia medio condicionado de MDM tratados con distintas concentraciones de RPV durante 48 h. Los resultados (media \pm SEM; n=4) se representan como migración relativa respecto a la observada hacia medio sin suero (control, considerado 100%). Control positivo: CCL2 (10 ng/mL).

IV.10. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO EN CONDICIONES PROINFLAMATORIAS

Para inducir las condiciones proinflamatorias, las células se pretrataron con 2 ng/mL de LPS durante 1 h y, a continuación, se incubaron con las diferentes concentraciones de RPV (1, 2, 4 y 8 μ M) durante 48 h. Al analizar la expresión génica mediante qRT-PCR de distintos marcadores proinflamatorios observamos que la

concentración empleada de LPS indujo claramente un estado inflamatorio en los macrófagos, aumentando la expresión de todos los genes analizados. Incluso en estas circunstancias, el efecto antiinflamatorio de la RPV fue evidente al reducir de manera concentración-dependiente la expresión génica de *IL1B*, *CCL2*, *IL6*, *IL8* y *NLRP3* (Fig. IV.18).

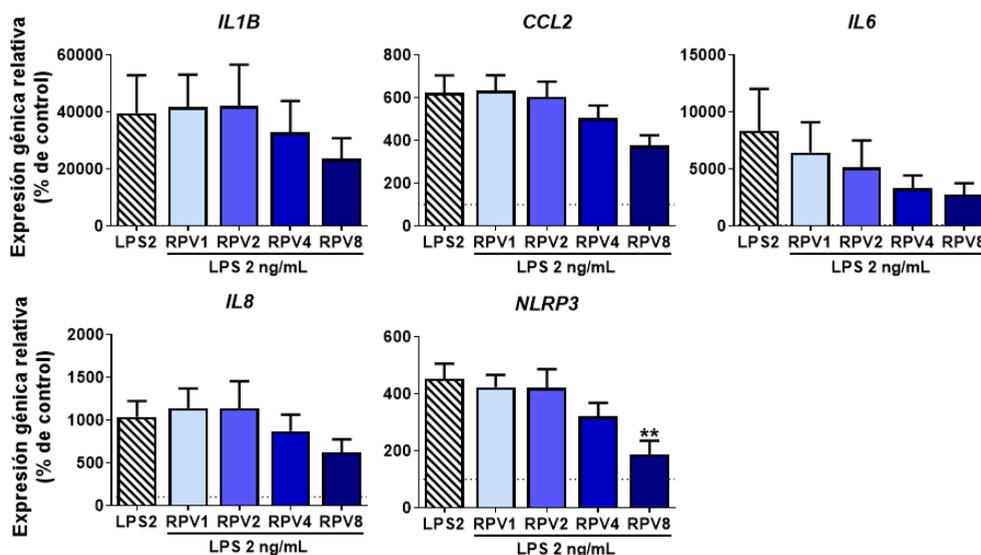
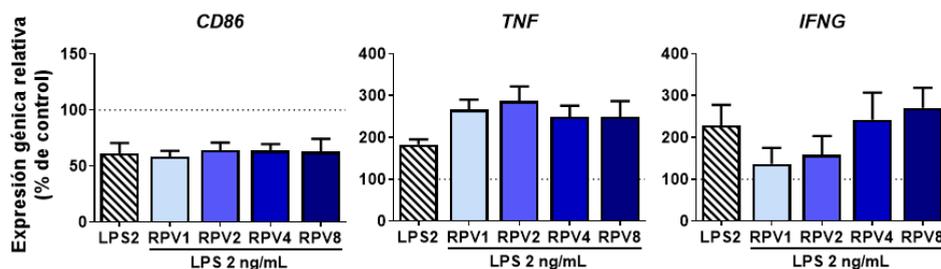


Figura IV.18. Estudio de la expresión génica mediante qRT-PCR de mediadores inflamatorios en MDM estimulados con LPS (2 ng/mL) durante 1 h y cotratados con distintas concentraciones de RPV durante 48 h. Los resultados (media \pm SEM; n=4-7) se representan como expresión relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 100%). Los datos de expresión génica se normalizaron frente a la expresión del gen *ACTB*. El análisis estadístico se realizó mediante el test ANOVA de una vía, seguido por un test de Bonferroni (**p<0,01) en el caso del tratamiento con RPV respecto al estímulo proinflamatorio (LPS).

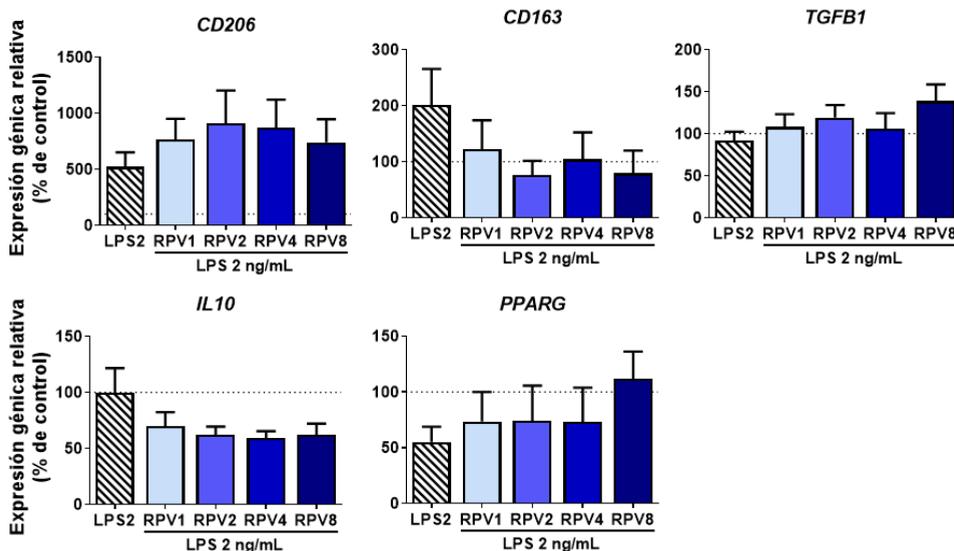
A continuación, estudiamos en estas mismas condiciones proinflamatorias el efecto de RPV en la expresión génica de marcadores asociados a los distintos fenotipos macrófagos. En consonancia con los resultados observados en el apartado IV.8, el efecto de RPV sobre los marcadores de polarización estudiados fue dispar, reduciendo e incrementando la expresión de marcadores pertenecientes a ambos grupos. De modo que, el tratamiento con RPV no produjo cambios en la expresión

de *CD86*, pero sí redujo la de *IFNG* con las concentraciones empleadas más bajas (1 y 4 μ M) e indujo un aumento de la expresión de *TNF* (Fig. IV.19.A), todos ellos considerados marcadores de macrófagos proinflamatorios M1. En lo que respecta a los marcadores de fenotipo antiinflamatorio M2, RPV incrementó la expresión génica de *CD206*, *PPARG* y *TGFB1*, pero al mismo tiempo redujo la expresión de otros marcadores de este grupo, como *CD163* e *IL10* (Fig. IV.19.B). Respecto a los marcadores de fenotipo M2 pro-resolutivo, RPV indujo la expresión de *MMP12* y *PDGFB* (Fig. IV.19.C).

A



B



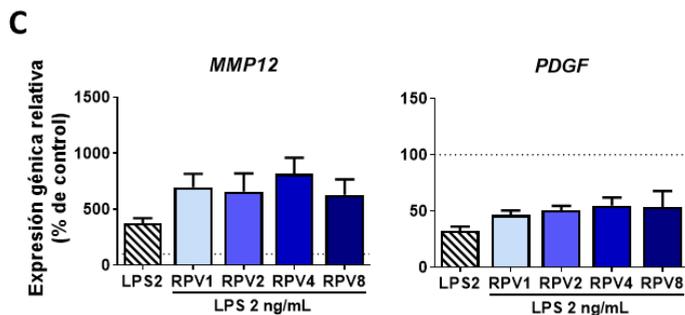


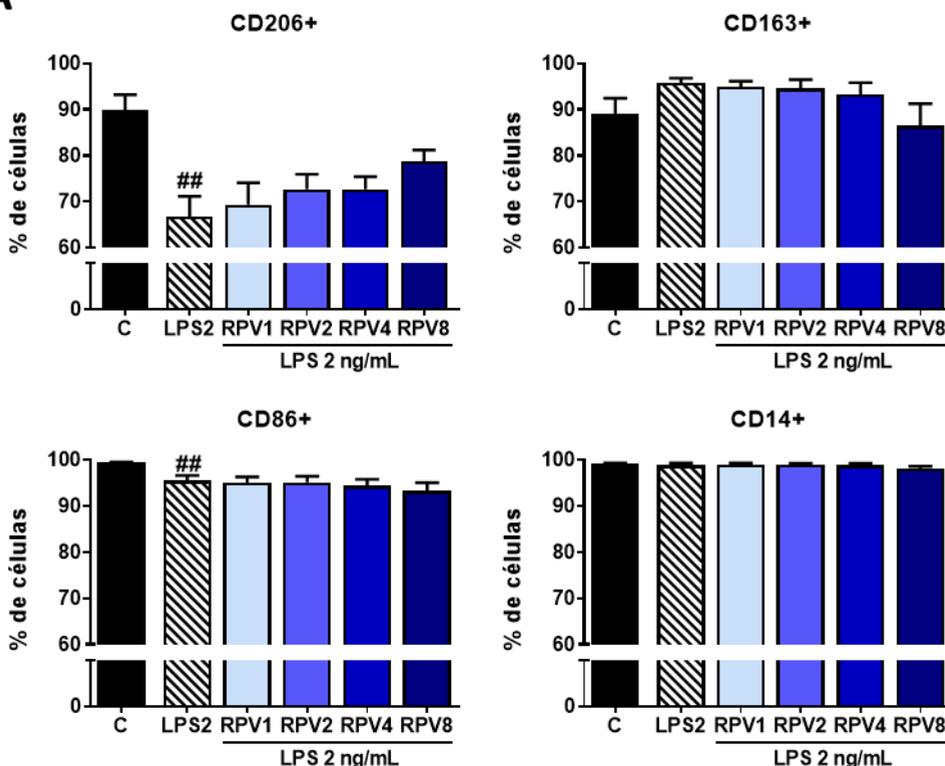
Figura IV.19. Estudio de la expresión génica mediante qRT-PCR de marcadores de polarización en MDM preestimulados con LPS (2 ng/mL) durante 1 h y cotratados con distintas concentraciones de RPV durante 48 h. (A) Efecto de RPV en la expresión génica de marcadores asociados a macrófagos M1 (*CD86*, *TNF* e *IFNG*), (B) marcadores asociados a macrófagos M2 (*CD206*, *CD163*, *TGFB1*, *IL10* y *PPARG*) y (C) marcadores asociados a fenotipo pro-resolutivo. Los resultados (media \pm SEM; n=4-7) se representan como expresión relativa respecto a la observada en las células no tratadas (control, considerado 100%) y se normalizaron frente a la expresión del gen *ACTB*.

Debido a la heterogeneidad de los resultados obtenidos con el análisis de la expresión génica, a continuación, nos planteamos estudiar el efecto de RPV en la polarización de los macrófagos mediante citometría de flujo. Para ello, se seleccionaron marcadores de superficie asociados con la polarización a macrófagos M1 (CD86 y CD14) y M2 (CD206 y CD163) y se analizó el porcentaje de células positivas y la intensidad de fluorescencia para cada uno de ellos. En primer lugar, analizamos el efecto que produjo el estímulo proinflamatorio LPS (2 ng/mL) en comparación con las células sin tratar (control). El porcentaje de células CD206⁺ y el de células CD86⁺ disminuyó significativamente en las células tratadas con LPS respecto al control, mientras que el porcentaje de células CD163⁺ aumentó con el estímulo. No se observaron cambios en la población de células CD14⁺. Por su parte, el tratamiento con RPV tiende a recuperar la positividad de las células para los marcadores M2 que habían sido alterados por LPS, mostrando una clara tendencia a aumentar el porcentaje de células CD206⁺ y a reducir la expresión de las células

CD163⁺. También se observa una tendencia a la baja en el porcentaje de células CD86⁺ con el tratamiento con RPV (Fig. IV.20.A).

En lo que a intensidad media de fluorescencia se refiere, el estímulo LPS redujo la expresión de los marcadores CD206 y CD86, mientras que incrementó la señal de CD163 y CD14. Por su parte, el tratamiento con RPV, de nuevo, indujo una ligera tendencia a normalizar la expresión de estos marcadores (Fig. IV.20.B). Si bien estos resultados son muy sutiles, nos sugieren que RPV podría ejercer un efecto en la polarización hacia un fenotipo antiinflamatorio que requiere de su comprobación mediante otros estudios.

A



B

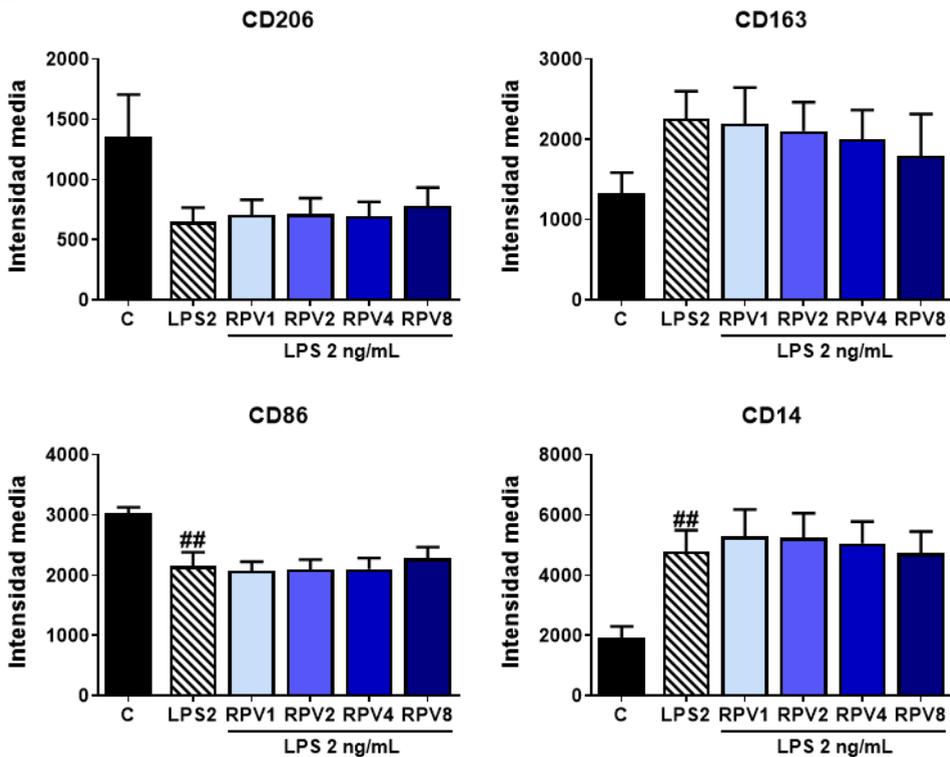


Figura IV.20. Análisis de la expresión de marcadores de superficie de macrófagos mediante citometría de flujo en MDM preestimulados con LPS (2 ng/mL) durante 1 h y cotratados con distintas concentraciones de RPV durante 48 h. (A) Porcentaje de células positivas para cada marcador (CD206, CD163, CD86 y CD14). (B) Intensidad media de fluorescencia para cada marcador. Los resultados se representan como media \pm SEM (n=5). El análisis estadístico se realizó mediante el test *t* de Student (##p<0,01) en el caso del estímulo positivo (LPS) respecto al control.

SECCIÓN IV: CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE RILPIVIRINA EN PACIENTES CON NAFLD

IV.11. ACTIVACIÓN DE STAT1 EN CÉLULAS HEPÁTICAS NO PARENQUIMALES

Estudios previos realizados en modelos murinos por nuestro grupo han demostrado que RPV ejerce un efecto antifibrótico a nivel hepático al inducir la activación selectiva de STAT1 en HSC, dando lugar a la inactivación y la apoptosis de este tipo celular (46). En consecuencia, quisimos confirmar este resultado en biopsias de hígado de pacientes infectados por el VIH diagnosticados con NAFLD.

Para ello, en colaboración con la Dra. Marisa Montes de la Unidad de VIH del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario La Paz de Madrid, se realizó un estudio transversal, en el que se incluyeron 42 pacientes con VIH bien controlados y diagnosticados con NAFLD por biopsia hepática. Los sujetos incluidos en el estudio eran 100% hombres, con una mediana de edad de 49 (44-54) años y mediana de recuento de células CD4⁺ de 802 (608-940) células/ μ L, el 60% de los cuales tenía diagnosticado síndrome metabólico. Todos los sujetos tenían carga viral de VIH indetectable y estaban bajo tratamiento con cART, con el 45% recibiendo terapia basada en RPV. No hubo diferencias significativas entre aquellos que recibieron RPV y aquellos que no en ninguna de las características demográficas analizadas (Tabla IV.2). Las biopsias hepáticas mostraron que el 43% de la población de estudio sufría una esteatosis moderada o grave (superior al 30%), el 67% mostró esteatohepatitis y el 43% fibrosis hepática F \geq 1 (Tabla IV.2).

Tabla IV.2. Principales características demográficas de la población de estudio. IMC: Índice de masa corporal; AST: aspartato transaminasa; ALT: alanina transaminasa; GGT: gamma-glutamyl transferasa; LDL: lipoproteína de baja densidad; HDL: lipoproteína de alta densidad; CAP: Parámetro de atenuación controlada; IFG: Alteración de la glucemia en ayunas. * Mediana (percentil 25; percentil 75). § Eventos cardiovasculares: cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular isquémico. & Síndrome metabólico: criterios diagnósticos según la definición “Adult Treatment Panel” (ATP) III: 3 de las 5 anomalías de riesgo (circunferencia de cintura ≥ 102 cm en hombres o ≥ 88 cm en mujeres, glucosa en ayunas ≥ 100 mg/dL o en tratamiento, triglicéridos ≥ 150 mg/dL, HDL < 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres o en tratamiento, y presión arterial sistólica ≥ 130 mmHg y/o presión arterial diastólica ≥ 85 mmHg o en tratamiento. p: p-valor obtenido en la prueba de contraste (Chi-cuadrado, Fisher’s exact test, Mann-Whitney o t-Student, según corresponda).

	Todos (N= 42)	No expues- tos a RPV (N= 23)	Expuestos a RPV (N= 19)	p
Edad (años)*	49 (44; 54)	51,6 (40; 55)	47,8 (45; 51)	0,44
Sexo, hombres, N (%)	42 (100)	23 (100)	19 (100)	---
Caucásico, N (%)	34 (89,5)	21 (95,5)	13 (81,3)	0,22
Carga viral VIH < 50 copias/mL, N (%)	42 (100)	23 (100)	19 (100)	---
Tiempo infección VIH (años)*	12,2 (7; 21)	15,4 (7; 23)	9,4 (6; 18)	0,13
Contaje de células CD4 (células/ μL)*	802 (608; 940)	816 (651; 1015)	774 (558,6; 892)	0,44
Contaje nadir de células (células/ μL)*	265 (188; 438)	262 (188; 413)	318 (187; 441)	0,64
IMC (kg/m²)*	28,8 (25,3; 30,7)	28,7 (25,2; 0,7)	28,9 (25,3; 30,8)	0,79
AST (UI/L)*	42 (35; 58)	44 (35; 56)	39 (33; 61)	0,67
ALT (UI/L)*	76 (52; 87)	81 (52; 89)	66 (50; 84)	0,44
GGT (UI/L)*	56,5 (33; 126)	56 (33; 126)	57 (33; 154)	0,77
Glucosa (mg/dL)*	104 (96; 110)	102 (99; 108)	105 (89; 112)	0,75
Colesterol (mg/dL)*	171,5 (156; 203)	167 (152; 214)	175 (162; 195)	0,66
LDL (mg/dL)*	107 (87; 124)	96 (86; 131)	114 (93; 124)	0,44
HDL (mg/dL)*	37 (31; 42)	37 (31; 42)	37 (30; 44)	0,82

Triglicéridos (mg/dL)*		152,5 (110; 225)	155 (135; 231)	125 (79; 225)	0,18
Elastografía transitoria (kPa)*		6,4 (4,4; 8,9)	7,6 (4,5; 10,1)	5,6 (4,1; 6,6)	0,11
CAP (dB/m)*		302 (257; 347)	306 (261; 353)	290 (243; 326)	0,33
Diabetes Mellitus o IFG, N (%)		29 (69)	17 (73,9)	12 (63,2)	0,52
Hipertensión arterial, N (%)		25 (59,5)	15 (65,2)	10 (52,6)	0,53
Hipercolesterolemia, N (%)		19 (45,2)	13 (56,5)	6 (31,6)	0,13
Hipertrigliceridemia, N (%)		23 (54,8)	14 (60,9)	9 (47,4)	0,53
Dislipidemia mixta, N (%)		19 (63,3)	13 (65)	6 (60)	1,00
Eventos cardiovasculares, N (%)[§]		1 (2,4)	1 (4,3)	0 (0)	1,00
Síndrome metabólico, N (%)^{&}		25 (59,5)	15 (65,2)	10 (52,6)	0,53
Fármacos hipolipemiantes, N (%)		16 (38,1)	12 (52,2)	4 (21,1)	0,06
Fármacos hipoglucemiantes	Metformina	10 (23,8)	5 (21,7)	5 (26,3)	1,00
	Insulina	2 (4,8)	2 (8,7)	0 (0)	0,49
Hallazgos histológicos					
Esteatosis, N (%)	No	5 (11,9)	1 (4,3)	4 (21,1)	
	Sí (cualquier grado)	37 (88,1)	22 (95,7)	15 (78,9)	0,16
	Leve (<33%)	19 (45,2)	12 (52,2)	7 (36,8)	
	Moderada (33-66%)	11 (26,2)	5 (21,7)	6 (31,6)	
	Severa (>66%)	7 (16,7)	5 (21,7)	2 (10,5)	0,25
Esteatohepatitis, N (%)		25 (67,6)	15 (68,2)	10 (66,7)	1,00
Fibrosis, N (%)	No	24 (57,1)	14 (60,9)	10 (52,6)	
	F1	14 (33,4)	7 (30,4)	7 (36,9)	
	F2	1 (2,4)	1 (4,3)	0 (0)	
	F≥3	3 (7,1)	1 (4,3)	2 (10,5)	0,80

La detección de la expresión de STAT1 en los núcleos de las células no parenquimales, identificados por la tinción con hematoxilina, reveló una mayor presencia de este factor de transcripción en las secciones hepáticas de pacientes con daño hepático identificado que recibían terapia basada en RPV, como demuestran las imágenes representativas de diferentes biopsias hepáticas y la cuantificación de la señal STAT1 (Fig. IV.21). Este efecto se observó en pacientes con diferentes estadios de NAFLD, desde esteatosis leve o intensa hasta

esteatohepatitis o fibrosis. Curiosamente, el aumento de la activación de STAT1 inducida por la terapia basada en RPV también fue evidente en pacientes sin fibrosis diagnosticada (F0), probablemente debido a la presencia de esteatosis o esteatohepatitis entre estos pacientes (Tabla IV.3).

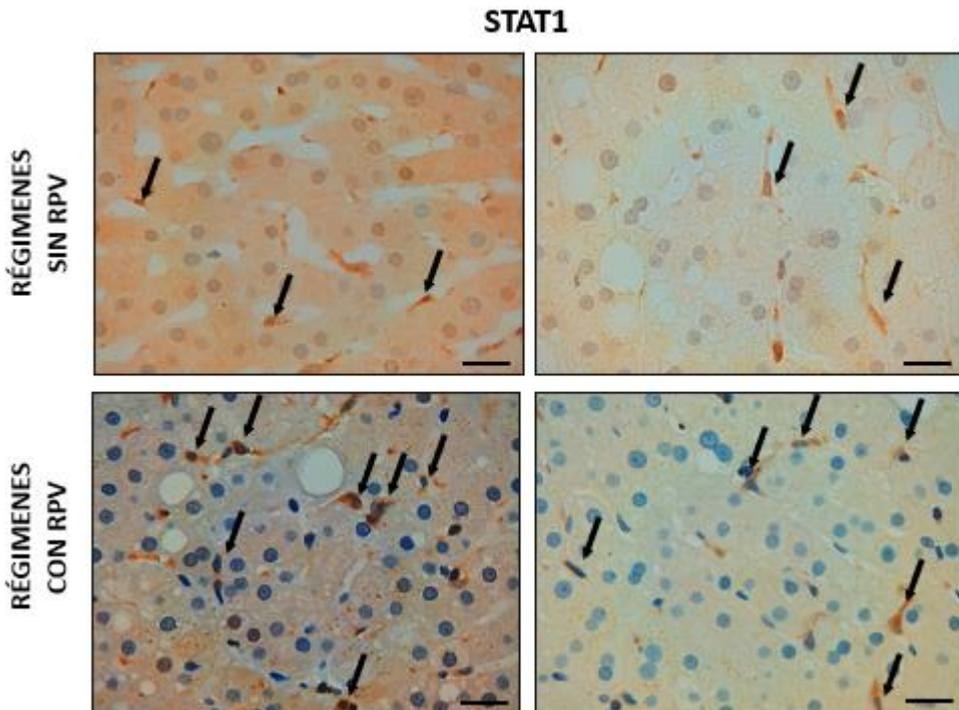


Figura IV.21. Estudio de la expresión de STAT1 en células hepáticas no parenquimales en biopsias de pacientes infectados por el VIH y diagnosticados con NAFLD. Imágenes representativas de IHQ de STAT1 de biopsias hepáticas de pacientes en terapia con y sin RPV. Barra de escala= 0,03 mm. Las flechas negras señalan las células no parenquimales positivas.

Tabla IV.3. (Página siguiente) Análisis de los niveles de STAT1 en células hepáticas no parenquimales en biopsias de pacientes infectados por el VIH diagnosticados con NAFLD. IC: Intervalo de confianza. § Media marginal (IC 95%) ajustada por tiempo de exposición a RPV (meses) e índice de masa corporal (Modelo lineal general). ¥ Media marginal (95% IC) ajustada por tiempo de exposición a RPV y EFV (meses) (Modelo lineal general). p: p-valor entre el grupo de no expuestos y expuestos a RPV.

Media LnSTAT-1 (IC 95%)		Todos	No ex- puestos a RPV	Expues- tos a RPV	Diferencia entre las medias	p
Todos §		9,8 (9,4; 10,3)	9,1 (8,3; 9,9)	10,6 (9,7; 11,4)	1,47 (0,05; 2,9)	0,04
Esteatohepatitis	No§	9,9 (9,2; 10,6)	9,7 (8,5; 10,8)	10,2 (9,1; 11,3)	0,52 (-1,24; 2,27)	0,55
	Sí §	9,9 (9,3; 10,4)	8,8 (8,0; 9,7)	10,9 (9,8; 12,0)	2,07 (0,46; 3,67)	0,01
Esteatosis > 30%	No§	9,8 (9,2; 10,3)	9,2 (8,2; 10,2)	10,3 (9,3; 11,3)	1,12 (-0,50; 2,74)	0,17
	Sí §	9,9 (9,2; 10,6)	8,9 (7,9; 9,9)	10,9 (9,7; 12,2)	2,06 (0,25; 3,87)	0,03
Fibrosis > F0	No¥	9,8 (9,3; 10,4)	9,0 (8,2; 9,9)	10,7 (9,7; 11,7)	1,66 (0,21; 3,11)	0,03
	Sí ¥	9,8 (9,1; 10,4)	8,9 (7,8; 9,9)	10,6 (9,5; 11,7)	1,77 (0,02; 3,53)	0,04

IV.12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN PBMC

Para evaluar el estado inflamatorio de estos pacientes, analizamos en los PBMC la expresión mediante qRT-PCR de 7 genes relacionados con la respuesta inflamatoria (*IL1B*, *TNFA*, *CCL2*, *IL6*, *CXCL10*, *SERPINE-1* y *NLRP3*), en cuatro de los cuales no fue posible detectar la expresión génica (*IL6*, *CXCL10*, *SERPINE-1* y *NLRP3*).

En primer lugar, se realizaron pruebas estadísticas de normalidad para caracterizar la distribución de las muestras. Los análisis mostraron para los 3 genes analizados una distribución de datos no normal que se normalizó al realizar una transformación mediante logaritmo neperiano. A continuación, se analizó la expresión de dichos genes en función de la presencia o ausencia de enfermedad hepática y considerando sus diferentes grados (esteatosis, esteatohepatitis y fibrosis), también se consideró la presencia de polimorfismos asociados con un mayor riesgo de NAFLD (*PNPLA3*, *TM6SF2* y *TMC4*) y las cART recibidas tanto en la

actualidad como en cualquier momento, el tiempo de exposición a los fármacos y el cambio sufrido en la terapia (Tabla IV.4). Los resultados estadísticamente significativos analizados con la variable transformada a Ln (p_2) muestran un incremento en la expresión génica de *IL1B* y un descenso en la expresión de *TNFA* en los pacientes con terapia actual basada en PI o EFV respectivamente, y un incremento en la expresión de *TNFA* en los pacientes que han tenido tratamiento con ddl y d4T en algún momento. Debido a la baja potencia estadística de los datos por el pequeño tamaño muestral, consideramos relevante mencionar aquellos resultados para los que el p-valor $<0,1$. Se observó un aumento en la expresión de *IL1B* en los pacientes con esteatosis diagnosticada mediante ecografía, para aquellos que han tenido tratamiento con ddl o d4T en algún momento y cuando el tratamiento actual no contiene TDF/TAF ni RPV. También se observó un incremento cuando la variante para TM6SF2 fue GG, que no está considerada de riesgo para NAFLD (Tabla IV.4). Respecto al análisis en la expresión de *TNFA* se observó un aumento en los pacientes cuyo tratamiento actual no incluye TDF/TAF ni RPV y en aquellos cuyo tratamiento actual no incluye TDF/TAF ni EFV. En cambio, se observó una disminución en la expresión de *TNFA* cuando el tratamiento actual incluía TDF/TAF y EFV. No se observaron diferencias en las distintas clasificaciones cuando se analizó la expresión de *CCL2*.

Tabla IV.4. (Páginas siguientes) Análisis de la expresión de *IL1B*, *TNFA* y *CCL2* en PBMC de pacientes infectados por el VIH y diagnosticados con NAFLD. * Mediana (percentil 25; percentil 75). p_1 : p-valor de la variable dependiente en la prueba no paramétrica (Mann-Whitney o Kruskal-Wallis). p_2 : p-valor de la variable dependiente transformada en Ln en la prueba paramétrica (t-Student o ANOVA).

		<i>IL1B/ACTINA</i>			
		N	Mediana*	p ₁	p ₂
Total		30	4,19 (3,24; 7,07)		
Esteatosis por biopsia	No	3	4,64 (2,69; 11,65)	1,000	> 0,1
	Sí	27	4,17 (3,24; 7,07)		
Esteatosis por biopsia > 30%	No	19	4,02 (3,24; 9,99)	0,832	> 0,1
	Sí	11	4,83 (3,09; 7,07)		
Esteatohepatitis por biopsia	No	11	3,60 (2,69; 11,65)	0,420	> 0,1
	Sí	19	4,66 (3,34; 7,07)		
Esteatosis ecográfica	No	3	2,69 (1,46; 4,64)	0,100	0,082
	Sí	27	4,21 (3,27; 7,84)		
> F0	F0	18	4,43 (3,34; 7,84)	0,415	> 0,1
	≥ F1	12	3,90 (2,94; 6,45)		
F3 F4	F0-F2	29	4,17 (3,24; 6,87)	0,400	> 0,1
	F3-F4	1	9,99 (9,99; 9,99)		
F2 F4	F0-F1	28	4,10 (3,16; 6,97)	0,294	> 0,1
	≥ F2	2	7,91 (5,83; 9,99)		
PNPLA3_cat	CC	10	4,74 (3,27; 7,84)	0,600	> 0,1
	CG	16	4,10 (3,17; 8,53)		
	GG	3	3,24 (3,09; 4,21)		
PNPLA3_dicot	No alelo G	10	4,74 (3,27; 7,84)	0,735	> 0,1
	Sí alelo G	19	4,02 (3,09; 7,07)		
TM6SF2_cat	GG	23	4,64 (3,24; 9,99)	0,147	0,090
	GA	4	3,40 (2,23; 3,90)		
	AA	0			
TMC4_cat	GG	7	4,21 (3,27; 5,83)	0,889	> 0,1
	GA	14	4,22 (2,79; 12,77)		
	AA	4	5,34 (3,30; 8,53)		
TMC4_dicot	No alelo A	7	4,21 (3,27; 5,83)	0,657	> 0,1
	Sí alelo A	18	4,22 (3,00; 11,65)		

ABC actual	No	23	4,21 (3,24; 6,87)	0,737	> 0,1
	Sí	7	3,79 (2,79; 16,07)		
TDF TAF actual	No	11	3,79 (3,24; 16,07)	0,471	> 0,1
	Sí	19	4,21 (3,09; 5,97)		
DTG actual	No	25	4,64 (3,27; 7,07)	0,516	> 0,1
	Sí	5	3,36 (3,24; 3,60)		
PI actual	No	28	4,10 (3,16; 6,42)	0,074	0,030
	Sí	2	15,81 (7,07; 24,54)		
EFV actual	No	25	4,64 (3,24; 7,07)	0,448	> 0,1
	Sí	5	3,34 (3,27; 4,17)		
AZT actual	No	30	4,19 (3,24; 7,07)		
	Sí	0			
d4T actual	No	30	4,19 (3,24; 7,07)		
	Sí	0			
ddI actual	No	30	4,19 (3,24; 7,07)		
	Sí	0			
RPV actual	No	18	4,19 (3,24; 7,07)	0,983	> 0,1
	Sí	12	4,33 (3,30; 6,42)		
RAL actual	No	28	4,41 (3,25; 7,46)	0,556	> 0,1
	Sí	2	3,65 (3,09; 4,21)		
ABC RPV actual	No ABC / No RPV	14	4,19 (3,09; 7,07)	0,878	> 0,1
	Sí ABC / No RPV	4	9,84 (3,19; 16,35)		
	Sí ABC / Sí RPV	3	3,79 (1,98; 12,77)		
	No ABC / Sí RPV	9	4,64 (3,36; 5,97)		
TDF TAF RPV actual	No TDF o TAF / No RPV	6	11,57 (3,60; 16,63)	0,187	0,080
	Sí TDF o TAF / No RPV	12	3,76 (2,89; 5,33)		
	Sí TDF o TAF / Sí RPV	7	4,66 (4,02; 6,87)		
	No TDF o TAF / Sí RPV	5	3,36 (3,24; 3,79)		
DTG RPV actual	No DTG / No RPV	15	4,21 (3,09; 7,84)	0,780	> 0,1
	Sí DTG / No RPV	3	3,60 (2,79; 16,63)		

	Sí DTG / Sí RPV	2	3,30 (3,24; 3,36)		
	No DTG / Sí RPV	10	4,65 (3,79; 6,87)		
TDF TAF EFV actual	No TDF-TAF / No EFV	11	3,79 (3,24; 16,07)	0,634	> 0,1
	Sí TDF-TAF / No EFV	14	4,65 (3,09; 5,97)		
	No TDF-TAF / Sí EFV	0			
	Sí TDF-TAF / Sí EFV	5	3,34 (3,27; 4,17)		
AZT ddi d4T	No	18	3,81 (3,09; 5,97)	0,415	> 0,1
	Sí	12	4,52 (3,56; 8,53)		
AZT ddi d4T EFV	Ninguno	0		0,415	> 0,1
	Sí AZT/ddi/d4T-NUNCA EFV	0			
	No AZT/ddi/d4T-No EFV	18	3,81 (3,09; 5,97)		
	Ambos	12	4,52 (3,56; 8,53)		
AZT (en cualquier momento)	No	19	4,02 (3,09; 5,97)	0,497	> 0,1
	Sí	11	4,21 (3,34; 9,99)		
ddi (en cualquier momento)	No	21	3,60 (3,09; 5,83)	0,070	0,089
	Sí	9	6,87 (4,21; 9,99)		
d4T (en cualquier momento)	No	21	3,60 (3,09; 5,83)	0,070	0,089
	Sí	9	6,87 (4,21; 9,99)		
EFV (en cualquier momento)	No	0			
	Sí	30	4,19 (3,24; 7,07)		
RPV (en cualquier momento)	No	13	4,17 (3,27; 7,07)	0,805	> 0,1
	Sí	17	4,64 (3,24; 6,87)		
	No	23	4,17 (3,24; 7,07)	0,962	> 0,1

RAL (en cualquier momento)	Sí	7	4,21 (3,09; 7,84)		
LPV (en cualquier momento)	No	27	4,17 (3,09; 6,87)	0,283	> 0,1
	Sí	3	7,07 (3,34; 24,54)		
DRV (en cualquier momento)	No	24	4,19 (3,25; 7,36)	0,820	> 0,1
	Sí	6	4,71 (3,09; 7,07)		
ATV (en cualquier momento)	No	26	4,41 (3,24; 7,84)	0,710	> 0,1
	Sí	3	4,21 (1,98; 7,07)		
ExpEFV A	No expuesto	0		0,966	> 0,1
	Exp baja (≤ 36 m)	11	4,64 (3,24; 7,07)		
	Exp mod-alta (> 36 m)	19	4,17 (3,09; 9,99)		
ExpEFV B	No expuesto	0		0,824	> 0,1
	Exp mod-baja (≤ 72 m)	21	4,64 (3,24; 6,87)		
	Exp alta (> 72 m)	9	3,79 (3,34; 9,99)		
ExpRAL A	No expuesto	23	4,17 (3,24; 7,07)	0,484	> 0,1
	Exp baja (≤ 12 m)	3	7,84 (3,09; 24,54)		
	Exp mod-alta (> 12 m)	4	3,90 (2,79; 4,52)		
ExpRAL B	No expuesto	23	4,17 (3,24; 7,07)	0,242	> 0,1
	Exp mod-baja (≤ 42 m)	6	4,52 (3,60; 7,84)		
	Exp alta (> 42 m)	1	1,98 (1,98; 1,98)		
ExpRPV A	No expuesto	13	4,17 (3,27; 7,07)	0,889	> 0,1
	Exp baja (≤ 18 m)	7	4,02 (3,09; 5,97)		
	Exp mod-alta (> 18 m)	10	4,65 (3,24; 7,84)		
ExpRPV B	No expuesto	13	4,17 (3,27; 7,07)	0,786	> 0,1
	Exp mod-baja (≤ 42 m)	17	4,64 (3,24; 6,87)		
	Exp alta (> 42 m)	0			

TDF/TAF en cART previo a RedCap	No	5	7,07 (3,60; 12,77)	0,416	> 0,1
	Sí	25	4,17 (3,24; 5,97)		
EFV en cART previo a RedCap	No	14	4,65 (3,09; 7,84)	0,448	> 0,1
	Sí	16	3,90 (3,25; 6,42)		
ABC en cART previo a RedCap	No	25	4,21 (3,27; 6,87)	0,787	> 0,1
	Sí	5	3,60 (2,51; 12,77)		
NVP en cART previo a RedCap	No	30	4,19 (3,24; 7,07)		
	Sí	0			
EFV+TDF/TAF en cART previo a RedCap	No TDF-TAF / No EFV	3	7,07 (3,60; 16,07)	0,686	> 0,1
	Sí TDF-TAF / No EFV	11	4,64 (3,00; 7,84)		
	No TDF-TAF / Sí EFV	2	7,64 (2,51; 12,77)		
	Sí TDF-TAF / Sí EFV	14	3,90 (3,27; 5,97)		
EFV+TDF/TAF en cART previo a RedCap	No	3	7,07 (3,60; 16,07)	0,283	> 0,1
	Sí	27	4,17 (3,09; 6,87)		
EFV cualquier momento / RPV cualquier momento	No EFV / No RPV	0		0,805	> 0,1
	Sí EFV / No RPV	13	4,17 (3,27; 7,07)		
	No EFV / Sí RPV	0			
	Sí EFV / Sí RPV	17	4,64 (3,24; 6,87)		
EFV cualquier momento / RPV actual	No EFV / No RPV	0		0,983	> 0,1
	Sí EFV / No RPV	18	4,19 (3,09; 7,84)		
	No EFV / Sí RPV	0			
	Sí EFV / Sí RPV	12	4,33 (3,30; 6,42)		
EFV previo / RPV actual	No EFV / No RPV	10	5,95 (3,60; 16,07)	0,124	> 0,1
	Sí EFV / No RPV	8	3,30 (2,60; 5,00)		
	No EFV / Sí RPV	4	3,82 (2,49; 4,65)		
	Sí EFV / Sí RPV	8	4,99 (3,57; 9,26)		
ABC previo / RPV actual	No ABC / No RPV	15	4,21 (3,09; 7,84)	0,992	> 0,1
	Sí ABC / No RPV	3	3,60 (2,51; 16,07)		

	No ABC / Sí RPV	10	4,33 (3,36; 5,97)		
	Sí ABC / Sí RPV	2	7,38 (1,98; 12,77)		
TDF/TAF previo / RPV actual	No TDF-TAF / No RPV	4	5,34 (3,05; 11,57)	0,583	> 0,1
	Sí TDF-TAF / No RPV	14	4,19 (3,09; 7,84)		
	No TDF-TAF / Sí RPV	1	12,77 (12,77; 12,77)		
	Sí TDF-TAF / Sí RPV	11	4,02 (3,24; 5,97)		
EFV+TDF/TAF previo / RPV actual	No EFV+TDF-TAF / No RPV	3	7,07 (3,60; 16,07)	0,502	> 0,1
	Sí EFV+TDF-TAF / No RPV	15	4,17 (2,79; 7,84)		
	No EFV+TDF-TAF / Sí RPV	0			
	Sí EFV+TDF-TAF / Sí RPV	12	4,33 (3,30; 6,42)		

		TNFA/ACTINA			
		N	Mediana*	p₁	p₂
Total		29	0,22 (0,14; 0,43)		
Esteatosis por biopsia	No	2	0,28 (0,10; 0,47)	0,768	> 0,1
	Sí	27	0,22 (0,14; 0,43)		
Esteatosis por biopsia > 30%	No	17	0,21 (0,14; 0,43)	0,711	> 0,1
	Sí	12	0,33 (0,16; 0,40)		
Esteatohepatitis por biopsia	No	10	0,21 (0,15; 0,47)	0,604	> 0,1
	Sí	19	0,22 (0,13; 0,43)		
Esteatosis ecográfica	No	2	0,15 (0,10; 0,21)	0,241	> 0,1
	Sí	27	0,22 (0,14; 0,44)		
> F0	F0	17	0,21 (0,14; 0,37)	0,744	> 0,1
	≥ F1	12	0,27 (0,16; 0,43)		

F3 F4	F0-F2	28	0,21 (0,13; 0,40)	0,552	> 0,1
	F3-F4	1	0,43 (0,43; 0,43)		
F2 F4	F0-F1	27	0,22 (0,13; 0,44)	0,768	> 0,1
	≥ F2	2	0,31 (0,18; 0,43)		
PNPLA3_cat	CC	10	0,27 (0,14; 0,45)	0,425	> 0,1
	CG	15	0,22 (0,15; 0,43)		
	GG	3	0,13 (0,11; 0,22)		
PNPLA3_dicot	No alelo G	10	0,27 (0,14; 0,45)	0,654	> 0,1
	Sí alelo G	18	0,20 (0,13; 0,36)		
TM6SF2_cat	GG	22	0,20 (0,13; 0,43)	0,918	> 0,1
	GA	4	0,21 (0,18; 0,27)		
	AA	0			
TMC4_cat	GG	7	0,22 (0,18; 0,36)	0,922	> 0,1
	GA	12	0,26 (0,15; 0,48)		
	AA	5	0,19 (0,15; 0,43)		
TMC4_dicot	No alelo A	7	0,22 (0,18; 0,36)	1,000	> 0,1
	Sí alelo A	17	0,21 (0,15; 0,44)		
ABC actual	No	23	0,21 (0,13; 0,43)	0,158	> 0,1
	Sí	6	0,34 (0,19; 0,50)		
TDF TAF actual	No	10	0,34 (0,18; 0,50)	0,151	> 0,1
	Sí	19	0,21 (0,13; 0,37)		
DTG actual	No	25	0,27 (0,14; 0,44)	0,160	> 0,1
	Sí	4	0,17 (0,14; 0,18)		
PI actual	No	26	0,21 (0,14; 0,37)	0,472	> 0,1
	Sí	3	0,44 (0,12; 0,86)		
EFV actual	No	24	0,24 (0,17; 0,44)	0,037	0,049
	Sí	5	0,13 (0,10; 0,14)		
AZT actual	No	29	0,22 (0,14; 0,43)		
	Sí	0			
d4T actual	No	29	0,22 (0,14; 0,43)		

	Sí	0			
ddl actual	No	29	0,22 (0,14; 0,43)		
	Sí	0			
RPV actual	No	18	0,18 (0,14; 0,43)	0,238	> 0,1
	Sí	11	0,32 (0,17; 0,47)		
RAL actual	No	27	0,22 (0,14; 0,44)	0,596	> 0,1
	Sí	2	0,18 (0,13; 0,22)		
ABC RPV actual	No ABC / No RPV	15	0,18 (0,14; 0,43)	0,354	> 0,1
	Sí ABC / No RPV	3	0,19 (0,18; 0,50)		
	Sí ABC / Sí RPV	3	0,36 (0,32; 0,64)		
	No ABC / Sí RPV	8	0,24 (0,16; 0,42)		
TDF TAF RPV actual	No TDF o TAF / No RPV	5	0,44 (0,19; 0,50)	0,085	0,090
	Sí TDF o TAF / No RPV	13	0,14 (0,13; 0,22)		
	Sí TDF o TAF / Sí RPV	6	0,32 (0,22; 0,47)		
	No TDF o TAF / Sí RPV	5	0,32 (0,17; 0,36)		
DTG RPV actual	No DTG / No RPV	16	0,19 (0,13; 0,43)	0,133	> 0,1
	Sí DTG / No RPV	2	0,18 (0,18; 0,19)		
	Sí DTG / Sí RPV	2	0,14 (0,11; 0,17)		
	No DTG / Sí RPV	9	0,36 (0,27; 0,47)		
TDF TAF EFV actual	No TDF-TAF / No EFV	10	0,34 (0,18; 0,50)	0,082	0,081
	Sí TDF-TAF / No EFV	14	0,22 (0,15; 0,37)		
	No TDF-TAF / Sí EFV	0			
	Sí TDF-TAF / Sí EFV	5	0,13 (0,10; 0,14)		
AZT ddl d4T	No	16	0,18 (0,14; 0,31)	0,249	> 0,1
	Sí	13	0,36 (0,13; 0,45)		
AZT ddl d4T EFV	Ninguno	0		0,249	> 0,1
	Sí AZT/ddl/d4T-NUNCA	0			
	EFV				
	No AZT/ddl/d4T-No EFV	16	0,18 (0,14; 0,31)		
	Ambos	13	0,36 (0,13; 0,45)		

AZT cualquier momento)	(en No	17	0,19 (0,15; 0,34)	0,444	> 0,1
	Sí	12	0,34 (0,13; 0,47)		
ddI cualquier momento)	(en No	19	0,18 (0,13; 0,32)	0,048	0,036
	Sí	10	0,43 (0,22; 0,49)		
d4T cualquier momento)	(en No	19	0,18 (0,13; 0,32)	0,050	0,036
	Sí	10	0,43 (0,22; 0,49)		
EFV cualquier momento)	(en No	0			
	Sí	29	0,22 (0,14; 0,43)		
RPV cualquier momento)	(en No	14	0,20 (0,13; 0,44)	0,505	> 0,1
	Sí	15	0,27 (0,17; 0,37)		
RAL cualquier momento)	(en No	21	0,21 (0,14; 0,43)	0,582	> 0,1
	Sí	8	0,28 (0,16; 0,40)		
LPV cualquier momento)	(en No	25	0,22 (0,15; 0,37)	0,927	> 0,1
	Sí	4	0,28 (0,13; 0,65)		
DRV cualquier momento)	(en No	22	0,24 (0,14; 0,43)	0,709	> 0,1
	Sí	7	0,18 (0,13; 0,44)		
ATV cualquier momento)	(en No	25	0,21 (0,13; 0,43)	0,391	> 0,1
	Sí	3	0,36 (0,22; 0,44)		
ExpEFV A	No expuesto	0		0,588	> 0,1
	Exp baja (≤ 36 m)	10	0,24 (0,19; 0,44)		
	Exp mod-alta (> 36 m)	18	0,20 (0,13; 0,43)		

ExpEFV B	No expuesto	0		0,332	> 0,1
	Exp mod-baja (≤ 72 m)	19	0,22 (0,18; 0,44)		
	Exp alta (> 72 m)	9	0,17 (0,13; 0,43)		
ExpRAL A	No expuesto	21	0,21 (0,14; 0,43)	0,711	> 0,1
	Exp baja (≤ 12 m)	4	0,24 (0,13; 0,60)		
	Exp mod-alta (> 12 m)	4	0,29 (0,20; 0,40)		
ExpRAL B	No expuesto	21	0,21 (0,14; 0,43)	0,765	> 0,1
	Exp mod-baja (≤ 42 m)	7	0,22 (0,13; 0,45)		
	Exp alta (> 42 m)	1	0,36 (0,36; 0,36)		
ExpRPV A	No expuesto	14	0,20 (0,13; 0,44)	0,615	> 0,1
	Exp baja (≤ 18 m)	7	0,18 (0,17; 0,37)		
	Exp mod-alta (> 18 m)	8	0,33 (0,21; 0,43)		
ExpRPV B	No expuesto	14	0,20 (0,13; 0,44)	0,485	> 0,1
	Exp mod-baja (≤ 42 m)	15	0,27 (0,17; 0,37)		
	Exp alta (> 42 m)	0			
TDF/TAF en cART previo a RedCap	No	5	0,44 (0,19; 0,50)	0,245	> 0,1
	Sí	24	0,21 (0,13; 0,36)		
EFV en cART previo a RedCap	No	13	0,27 (0,18; 0,44)	0,308	> 0,1
	Sí	16	0,19 (0,13; 0,40)		
ABC en cART previo a RedCap	No	24	0,21 (0,13; 0,40)	0,323	> 0,1
	Sí	5	0,36 (0,19; 0,50)		
NVP en cART previo a RedCap	No	29	0,22 (0,14; 0,43)		
	Sí	0			
EFV+TDF/TAF en cART previo a RedCap	No TDF-TAF / No EFV	3	0,44 (0,19; 0,50)	0,509	> 0,1
	Sí TDF-TAF / No EFV	10	0,24 (0,15; 0,36)		
	No TDF-TAF / Sí EFV	2	0,38 (0,13; 0,64)		
	Sí TDF-TAF / Sí EFV	14	0,19 (0,13; 0,37)		
	No	3	0,44 (0,19; 0,50)	0,222	> 0,1

EFV+TDF/TAF en cART previo a RedCap	Sí	26	0,21 (0,13; 0,37)		
EFV cualquier momento / RPV cualquier momento	No EFV / No RPV	0		0,505	> 0,1
	Sí EFV / No RPV	14	0,20 (0,13; 0,44)		
	No EFV / Sí RPV	0			
	Sí EFV / Sí RPV	15	0,27 (0,17; 0,37)		
EFV cualquier momento / RPV actual	No EFV / No RPV	0		0,238	> 0,1
	Sí EFV / No RPV	18	0,18 (0,13; 0,43)		
	No EFV / Sí RPV	0			
	Sí EFV / Sí RPV	11	0,32 (0,17; 0,47)		
EFV previo / RPV actual	No EFV / No RPV	10	0,28 (0,18; 0,45)	0,102	> 0,1
	Sí EFV / No RPV	8	0,13 (0,11; 0,19)		
	No EFV / Sí RPV	3	0,27 (0,15; 0,36)		
	Sí EFV / Sí RPV	8	0,34 (0,19; 0,48)		
ABC previo / RPV actual	No ABV / No RPV	15	0,18 (0,13; 0,43)	0,387	> 0,1
	Sí ABV / No RPV	3	0,19 (0,13; 0,50)		
	No ABV / Sí RPV	9	0,27 (0,17; 0,37)		
	Sí ABV / Sí RPV	2	0,50 (0,36; 0,64)		
TDF/TAF previo / RPV actual	No TDF-TAF / No RPV	4	0,31 (0,16; 0,47)	0,258	> 0,1
	Sí TDF-TAF / No RPV	14	0,18 (0,13; 0,34)		
	No TDF-TAF / Sí RPV	1	0,64 (0,64; 0,64)		
	Sí TDF-TAF / Sí RPV	10	0,29 (0,17; 0,37)		
EFV+TDF/TAF previo / RPV actual	No EFV+TDF-TAF / No RPV	3	0,44 (0,19; 0,50)	0,118	> 0,1
	Sí EFV+TDF-TAF / No RPV	15	0,18 (0,13; 0,34)		
	No EFV+TDF-TAF / Sí RPV	0			
	Sí EFV+TDF-TAF / Sí RPV	11	0,32 (0,17; 0,47)		

		<i>CCL2/ACTINA</i>			
		N	Mediana*	p ₁	p ₂
Total		26	0,55 (0,20; 1,15)		
Esteatosis por biopsia	No	1	0,53 (0,53; 0,53)	1,000	> 0,1
	Sí	25	0,56 (0,20; 1,15)		
Esteatosis por biopsia > 30%	No	15	0,53 (0,27; 1,13)	0,878	> 0,1
	Sí	11	0,65 (0,07; 1,22)		
Esteatohepatitis por biopsia	No	8	0,52 (0,23; 1,04)	0,644	> 0,1
	Sí	18	0,61 (0,20; 1,25)		
Esteatosis ecográfica	No	1	1,13 (1,13; 1,13)	0,615	> 0,1
	Sí	25	0,53 (0,20; 1,15)		
> F0	F0	15	0,53 (0,20; 1,13)	0,959	> 0,1
	≥ F1	11	0,56 (0,11; 1,22)		
F3 F4	F0-F2	25	0,53 (0,20; 1,13)	0,154	> 0,1
	F3-F4	1	1,54 (1,54; 1,54)		
F2 F4	F0-F1	24	0,55 (0,24; 1,14)	0,960	> 0,1
	≥ F2	2	0,78 (0,02; 1,54)		
PNPLA3_cat	CC	9	0,95 (0,51; 1,13)	0,566	> 0,1
	CG	13	0,32 (0,18; 1,15)		
	GG	3	0,56 (0,04; 0,65)		
PNPLA3_dicot	No alelo G	9	0,95 (0,51; 1,13)	0,329	> 0,1
	Sí alelo G	16	0,38 (0,15; 0,96)		
TM6SF2_cat	GG	20	0,55 (0,27; 1,08)	0,573	> 0,1
	GA	3	0,18 (0,11; 1,13)		
	AA	0			
TMC4_cat	GG	6	0,53 (0,04; 1,15)	0,599	> 0,1
	GA	10	0,48 (0,27; 0,65)		
	AA	5	1,00 (0,28; 1,22)		
TMC4_dicot	No alelo A	6	0,53 (0,04; 1,15)	0,622	> 0,1
	Sí alelo A	15	0,51 (0,27; 1,13)		

ABC actual	No	20	0,61 (0,19; 1,18)	1,000	> 0,1
	Sí	6	0,41 (0,28; 1,15)		
TDF TAF actual	No	9	0,51 (0,32; 1,15)	0,792	> 0,1
	Sí	17	0,65 (0,18; 1,13)		
DTG actual	No	21	0,65 (0,20; 1,15)	0,850	> 0,1
	Sí	5	0,45 (0,28; 0,56)		
PI actual	No	24	0,52 (0,19; 1,14)	0,302	> 0,1
	Sí	2	1,11 (1,00; 1,22)		
EFV actual	No	22	0,52 (0,18; 1,15)	0,471	> 0,1
	Sí	4	0,86 (0,49; 1,25)		
AZT actual	No	26	0,55 (0,20; 1,15)		
	Sí	0			
d4T actual	No	26	0,55 (0,20; 1,15)		
	Sí	0			
ddI actual	No	26	0,55 (0,20; 1,15)		
	Sí	0			
RPV actual	No	17	0,65 (0,20; 1,13)	0,916	> 0,1
	Sí	9	0,53 (0,32; 1,15)		
RAL actual	No	24	0,55 (0,24; 1,19)	0,443	> 0,1
	Sí	2	0,35 (0,04; 0,65)		
ABC RPV actual	No ABC / No RPV	13	0,77 (0,20; 1,13)	0,990	> 0,1
	Sí ABC / No RPV	4	0,39 (0,17; 1,69)		
	Sí ABC / Sí RPV	2	0,73 (0,32; 1,15)		
	No ABC / Sí RPV	7	0,53 (0,18; 1,25)		
TDF TAF RPV actual	No TDF o TAF / No RPV	5	0,51 (0,28; 1,22)	0,985	> 0,1
	Sí TDF o TAF / No RPV	12	0,71 (0,12; 1,07)		
	Sí TDF o TAF / Sí RPV	5	0,53 (0,18; 1,25)		
	No TDF o TAF / Sí RPV	4	0,51 (0,38; 0,86)		
DTG RPV actual	No DTG / No RPV	14	0,71 (0,20; 1,13)	0,992	> 0,1
	Sí DTG / No RPV	3	0,28 (0,07; 2,87)		

	Sí DTG / Sí RPV	2	0,51 (0,45; 0,56)		
	No DTG / Sí RPV	7	0,53 (0,18; 1,25)		
TDF TAF EFV actual	No TDF-TAF / No EFV	9	0,51 (0,32; 1,15)	0,627	> 0,1
	Sí TDF-TAF / No EFV	13	0,53 (0,11; 1,13)		
	No TDF-TAF / Sí EFV	0			
	Sí TDF-TAF / Sí EFV	4	0,86 (0,49; 1,25)		
AZT ddi d4T	No	15	0,45 (0,11; 0,95)	0,164	> 0,1
	Sí	11	1,00 (0,27; 1,25)		
AZT ddi d4T EFV	Ninguno	0		0,164	> 0,1
	Sí AZT/ddi/d4T-NUNCA EFV	0			
	No AZT/ddi/d4T-No EFV	15	0,45 (0,11; 0,95)		
	Ambos	11	1,00 (0,27; 1,25)		
AZT (en cualquier momento)	No	16	0,49 (0,15; 1,04)	0,391	> 0,1
	Sí	10	0,89 (0,27; 1,22)		
ddi (en cualquier momento)	No	17	0,45 (0,18; 0,77)	0,107	> 0,1
	Sí	9	1,15 (0,51; 1,25)		
d4T (en cualquier momento)	No	17	0,45 (0,18; 0,77)	0,107	> 0,1
	Sí	9	1,15 (0,51; 1,25)		
EFV (en cualquier momento)	No	0			
	Sí	26	0,55 (0,20; 1,15)		
RPV (en cualquier momento)	No	12	0,86 (0,27; 1,18)	0,403	> 0,1
	Sí	14	0,49 (0,11; 1,15)		
	No	19	0,53 (0,20; 1,22)	0,866	> 0,1

RAL (en cualquier momento)	Sí	7	0,65 (0,04; 1,15)		
LPV (en cualquier momento)	No	23	0,51 (0,18; 1,15)	0,275	> 0,1
	Sí	3	1,00 (0,77; 1,22)		
DRV (en cualquier momento)	No	20	0,55 (0,24; 1,20)	0,533	> 0,1
	Sí	6	0,46 (0,18; 1,00)		
ATV (en cualquier momento)	No	22	0,55 (0,20; 1,13)	0,844	> 0,1
	Sí	3	1,15 (0,04; 1,22)		
ExpEFV A	No expuesto	0		0,711	> 0,1
	Exp baja (≤ 36 m)	8	0,42 (0,15; 1,18)		
	Exp mod-alta (> 36 m)	17	0,53 (0,27; 1,15)		
ExpEFV B	No expuesto	0		0,929	> 0,1
	Exp mod-baja (≤ 72 m)	18	0,61 (0,11; 1,22)		
	Exp alta (> 72 m)	7	0,45 (0,27; 0,77)		
ExpRAL A	No expuesto	19	0,53 (0,20; 1,22)	0,905	> 0,1
	Exp baja (≤ 12 m)	3	0,65 (0,03; 1,00)		
	Exp mod-alta (> 12 m)	4	0,71 (0,16; 1,27)		
ExpRAL B	No expuesto	19	0,53 (0,20; 1,22)	0,601	> 0,1
	Exp mod-baja (≤ 42 m)	6	0,46 (0,04; 1,00)		
	Exp alta (> 42 m)	1	1,15 (1,15; 1,15)		
ExpRPV A	No expuesto	12	0,86 (0,27; 1,18)	0,423	> 0,1
	Exp baja (≤ 18 m)	7	0,45 (0,07; 0,65)		
	Exp mod-alta (> 18 m)	7	0,56 (0,18; 1,25)		
ExpRPV B	No expuesto	12	0,86 (0,27; 1,18)	0,382	> 0,1
	Exp mod-baja (≤ 42 m)	14	0,49 (0,11; 1,15)		
	Exp alta (> 42 m)	0			

TDF/TAF en cART previo a RedCap	No	5	0,32 (0,28; 0,51)	0,659	> 0,1
	Sí	21	0,65 (0,18; 1,15)		
EFV en cART previo a RedCap	No	12	0,58 (0,12; 1,19)	0,940	> 0,1
	Sí	14	0,55 (0,27; 1,13)		
ABC en cART previo a RedCap	No	21	0,65 (0,18; 1,22)	0,613	> 0,1
	Sí	5	0,32 (0,28; 0,51)		
NVP en cART previo a RedCap	No	26	0,55 (0,20; 1,15)		
	Sí	0			
EFV+TDF/TAF en cART previo a RedCap	No TDF-TAF / No EFV	3	0,51 (0,28; 1,22)	0,825	> 0,1
	Sí TDF-TAF / No EFV	9	0,65 (0,07; 1,15)		
	No TDF-TAF / Sí EFV	2	0,29 (0,27; 0,32)		
	Sí TDF-TAF / Sí EFV	12	0,67 (0,33; 1,19)		
EFV+TDF/TAF en cART previo a RedCa	No	3	0,51 (0,28; 1,22)	0,940	> 0,1
	Sí	23	0,56 (0,18; 1,15)		
EFV cualquier momento / RPV cualquier momento	No EFV / No RPV	0		0,403	> 0,1
	Sí EFV / No RPV	12	0,86 (0,27; 1,18)		
	No EFV / Sí RPV	0			
	Sí EFV / Sí RPV	14	0,49 (0,11; 1,15)		
EFV cualquier momento / RPV actual	No EFV / No RPV	0		0,916	> 0,1
	Sí EFV / No RPV	17	0,65 (0,20; 1,13)		
	No EFV / Sí RPV	0			
	Sí EFV / Sí RPV	9	0,53 (0,32; 1,15)		
EFV previo / RPV actual	No EFV / No RPV	10	0,58 (0,07; 1,22)	0,997	> 0,1
	Sí EFV / No RPV	7	0,77 (0,20; 1,13)		
	No EFV / Sí RPV	2	0,67 (0,18; 1,15)		
	Sí EFV / Sí RPV	7	0,53 (0,32; 1,25)		
ABC previo / RPV actual	No ABC / No RPV	14	0,86 (0,07; 1,22)	0,818	> 0,1
	Sí ABC / No RPV	3	0,28 (0,27; 0,51)		

	No ABC / Sí RPV	7	0,53 (0,18; 1,25)		
	Sí ABC / Sí RPV	2	0,73 (0,32; 1,15)		
TDF/TAF previo / RPV actual	No TDF-TAF / No RPV	4	0,39 (0,27; 0,87)	0,949	> 0,1
	Sí TDF-TAF / No RPV	13	0,77 (0,07; 1,13)		
	No TDF-TAF / Sí RPV	1	0,32 (0,32; 0,32)		
	Sí TDF-TAF / Sí RPV	8	0,55 (0,31; 1,20)		
EFV+TDF/TAF previo / RPV actual	No EFV+TDF-TAF / No RPV	3	0,51 (0,28; 1,22)	0,978	> 0,1
	Sí EFV+TDF-TAF / No RPV	14	0,71 (0,07; 1,13)		
	No EFV+TDF-TAF / Sí RPV	0			
	Sí EFV+TDF-TAF / Sí RPV	9	0,53 (0,32; 1,15)		

Por último, analizamos la presencia de correlación entre las expresiones de los distintos genes analizados. Se obtuvo una correlación positiva y estadísticamente significativa para la expresión de *TNFA* con *IL1B* y para *CCL2* con *IL6* (Tabla V.5).

Tabla IV.5. Correlación entre las expresiones de distintos genes en PBMC de pacientes VIH. Rho: coeficiente de correlación de Spearman.

	IL1B_ACTINA			TNFA_ACTINA		
	N	Rho	p	N	Rho	p
TNFA	28	0,765	0,000			
IL6	13	0,000	1,000	13	0,126	0,681
CCL2	25	0,182	0,383	25	0,283	0,170

V. DISCUSIÓN

La introducción de la cART para el tratamiento de la infección por VIH-1, hace casi 30 años, transformó la enfermedad de ser casi invariablemente fatal a convertirse en una condición crónica manejable. Hoy en día, la existencia de fármacos que suprimen mejor la replicación del virus, que son menos tóxicos y más seguros, que generan menos resistencias y requieren una menor cantidad de dosis diarias (a menudo una al día), junto con las mejoras en la atención médica a estos pacientes, la detección temprana y la promoción de la salud, ha logrado mejorar su pronóstico hasta lograr una esperanza de vida cercana a la de la población general (174). A pesar de este éxito, la pandemia aún no ha sido controlada, la infección por VIH sigue siendo una enfermedad incurable que requiere tratamiento de por vida y los pacientes se enfrentan a un mayor riesgo de desarrollar otras patologías no relacionadas con el SIDA (175). En una época en la que ya existe un tratamiento eficaz para curar la infección por VHC pero con tasas crecientes de obesidad en la población, la NAFLD se ha convertido en una de las principales causas de enfermedad hepática entre las personas que viven con VIH (141,142). Además, estos pacientes presentan una mayor prevalencia de fibrosis hepática avanzada (10-15%), considerada como el predictor más fuerte de mortalidad relacionada con el hígado.

En este contexto, el estudio de RPV resulta de especial interés puesto que este fármaco no solo ha mostrado tener un mejor perfil de seguridad y tolerabilidad que EFV, sino que también mejora el perfil lipídico en pacientes previamente tratados con otros antirretrovirales (30,36,38,176). Además, su reciente aprobación como parte del primer tratamiento antirretroviral de acción prolongada secunda la continuidad de su uso (31). Es por ello que, en esta tesis, nos hemos centrado en estudiar los mecanismos moleculares que podrían ayudar a esclarecer por qué RPV es una mejor elección frente a otros fármacos antirretrovirales en pacientes VIH con CLD y, quizás, establecer nuevas opciones terapéuticas para NAFLD.

En la búsqueda de nuevas terapias para la CLD, se están explorando múltiples enfoques sobre la regulación de distintas vías clave en su inicio, progresión y regresión. Debido a la importante implicación de los macrófagos hepáticos en la homeostasis tisular, su papel como mediadores de primera línea ante el daño hepático y sus funciones duales en la promoción e inhibición en la enfermedad hepática, esta población celular se ha convertido en una diana terapéutica de gran interés. Los enfoques farmacológicos dirigidos a los macrófagos se pueden clasificar como aquellos que (i) dificultan su reclutamiento al hígado dañado, (ii) inhiben su activación y (iii) modulan su función y polarización (177). Más recientemente, se han probado terapias basadas en la infusión de macrófagos autólogos en pacientes con cirrosis hepática compensada con el objetivo de mejorar la gravedad de la enfermedad (178).

En línea con el primer enfoque, la intervención de las vías de señalización de quimiocinas ha sido ampliamente estudiada. En particular, el fármaco Cenicriviroc (CVC) (inhibidor dual de CCR2/CCR5) mostró resultados alentadores al bloquear eficazmente el reclutamiento de monocitos mediado por CCL2, además de ejercer claros efectos antiinflamatorios y antifibróticos en diferentes modelos murinos de patologías hepáticas crónicas, incluyendo la enfermedad hepática alcohólica, NAFLD y fibrosis (137,179,180). Estos datos condujeron a la realización de ensayos clínicos para evaluar su eficacia en pacientes con NASH y fibrosis hepática. Después de 1 año de tratamiento con CVC, un número relevante de pacientes con NASH respondieron bien al tratamiento, mostrando una mejoría estadísticamente significativa en el estadio histológico de fibrosis (181), efecto que se mantuvo en el segundo año de tratamiento, con una mayor respuesta en los pacientes con fibrosis avanzada (NCT02217475) (182). Sin embargo, el ensayo en fase III (NCT03028740) realizado en aproximadamente 2000 pacientes con NASH, finalizó después de que el análisis intermedio al año revelara falta de eficacia. Otros inhibidores de las vías de reclutamiento de macrófagos que se están estudiando y que han mostrado una

mejoría en la progresión de la NAFLD/NASH y fibrosis en modelos murinos son el Propagermanium (inhibidor de CCR2) (183), mNOX-E36 (oligonucleótidos antagonistas de CCL2) (184), y Maraviroc (inhibidor de CCL5/RANTES) (185).

La posibilidad de modular la activación macrofágica ha sido otra estrategia muy estudiada. Diversos trabajos han demostrado la participación del inflammasoma NLRP3 y de sus efectores, caspasa-1 e IL-1 β , en la progresión de la CLD (111), avalando su potencial como diana para su tratamiento. De hecho, diversas moléculas que intervienen esta vía ya han generado resultados prometedores en modelos murinos. Así, el tratamiento con MCC950, un inhibidor potente y específico de NLRP3, normalizó la expresión hepática de NF- κ B, caspasa-1 y pro-IL-1 β , así como los niveles plasmáticos de IL-1 β , CCL2, IL-6 y ALT/AST, en un modelo murino de NASH, reduciendo la inflamación y la fibrosis hepática (186). En la misma línea, la administración de Anakinra, un antagonista del receptor de IL-1 β , ha mejorado la fibrosis hepática en ratones con hepatitis alcohólica (187). Aunque los resultados de uno de los primeros ensayos clínicos con el inhibidor pan-caspasa, Emricasan, resultaron alentadores al reducir los niveles de ALT y mejorar los biomarcadores séricos de apoptosis en pacientes con NAFLD (188), los últimos resultados obtenidos (NCT02686762) muestran que el tratamiento con Emricasan no solo no logró mejorar la histología hepática en NASH, sino que pudo haber empeorado la fibrosis y la degeneración de los hepatocitos. Este mismo revés ha sufrido el inhibidor de ASK-1, Selonsertib. La señalización por las SAPK, p38 y JNK, ha mostrado ejercer un papel clave en la progresión de NASH, sin embargo, dada la falta general de éxito de sus inhibidores, se ha planteado su inhibición “up-stream”, a través de ASK-1, como un enfoque alternativo (116). Los primeros ensayos clínicos con Selonsertib determinaron que el fármaco era seguro y eficaz al reducir significativamente la fibrosis hepática en pacientes con NASH y fibrosis en estadio 2 o 3 (189,190). Sin embargo, los estudios de fase III en pacientes con NASH y fibrosis avanzada (NCT03053050) (191) o cirrosis compensada (NCT03053063)

(192) tuvieron que ser suspendidos por falta de efectividad, recalcando la importancia de la identificación de nuevas moléculas y dianas para el tratamiento de la NAFLD.

Debido a la dualidad funcional del fenotipo macrofágico, las terapias que tratan de modularlo se han postulado como un objetivo terapéutico para el tratamiento de la enfermedad hepática. Además, debido a su alta capacidad fagocítica, la administración sistémica empleando diversos mecanismos de administración de fármacos, como los liposomas y las microburbujas, favorecen su acumulación en el hígado (193), lo que aumenta su potencial como opción terapéutica específica para la CLD. En consecuencia, la identificación de factores clave en su diferenciación hacia un fenotipo antiinflamatorio y pro-resolutivo resultaría fundamental. En este sentido, la activación de los factores de transcripción STAT6 y PPAR γ y la inhibición de NF- κ B y STAT1, cuya regulación ha demostrado estar íntimamente interconectada, juega un papel importante en la polarización de macrófagos M2 (91,194,195). En los macrófagos, STAT6 regula la expresión génica y proteica de PPAR γ , promueve su actividad transcripcional e incrementa la capacidad fagocítica mediada por PPAR γ (88,171). Además, la activación de STAT6 se ha relacionado con una inhibición de STAT1 (87,171), lo que supone una inhibición de la regulación de STAT1 hacia un fenotipo proinflamatorio. Diversos estudios han demostrado la participación de PPAR γ en la polarización de la población macrofágica hacia un fenotipo alternativo y su papel en la prevención de enfermedades metabólicas (196,197). De hecho, se ha descrito que la delección específica de PPAR γ en macrófagos predispone a los ratones alimentados con HFD a sufrir obesidad, intolerancia a la glucosa y resistencia a insulina (198), y que la administración *in vivo* del agonista de PPAR γ , Rosiglitazona, reequilibra la polarización M1 inducida por la HFD hacia un fenotipo M2, aliviando también la esteatosis hepática y reduciendo la respuesta inflamatoria local mediante la inhibición de NF- κ B (199). La activación de

PPAR γ también se ha asociado a una inhibición de la actividad transcripcional de STAT1 y AP-1.

Teniendo toda esta información en cuenta, los resultados obtenidos con RPV en esta tesis resultan alentadores. En primer lugar, cabe destacar la capacidad de RPV para actuar sobre el primer enfoque terapéutico descrito, es decir, para reducir la infiltración de los macrófagos en el hígado en ratones alimentados con HFD. El estudio mecanístico de este efecto realizado *in vitro* con células LX-2 y MDM reveló que RPV inhibe el eje CCL2/CCR2. Además, resultados preliminares realizados en células HUVEC, como modelo de células endoteliales, y en la línea celular humana Hep3B bajo condiciones proinflamatorias han demostrado la capacidad de RPV para reducir la expresión de CCL2 en otras poblaciones celulares de relevancia en la fisiopatología hepática (200).

Atendiendo al segundo enfoque farmacológico mencionado, los datos obtenidos demuestran el efecto antiinflamatorio de RPV en MDM al actuar sobre la vía del inflamasoma NLRP3 y la caspasa-1, y reducir la activación de NF- κ B y las SAPK, JNK1 y p38, rutas todas ellas de especial relevancia en la progresión de la CLD. Este potencial antiinflamatorio de RPV se confirmó en experimentos clave realizados en MDM bajo el potente estímulo proinflamatorio LPS. En estas condiciones, RPV redujo de manera dependiente de la concentración la expresión génica de diversos marcadores proinflamatorios (*IL1B*, *CCL2*, *IL6*, *IL8* y *NLRP3*).

Por último, de especial interés resulta el análisis de cómo RPV influye en la polarización de los macrófagos. En una primera aproximación, la expresión génica de diferentes marcadores asociados a los fenotipos M1 (*CD86*, *IL1B*, *TNF*, *IL6* y *IFNG*) y M2 (*CD206*, *CD163*, *TGFB1*, *IL10* y *ARG1*) sufrió alteraciones en ambos sentidos en los dos grupos. Este resultado que, en principio, podría parecer sorprendente y contradictorio, está respaldado por el hecho de que no existe una absoluta dicotomía en el fenotipo macrofágico tal y como se ha descrito tradicionalmente,

sino que los macrófagos abarcan un amplio espectro de estados de activación en los que coexiste la expresión de diversos marcadores (55). Sin embargo, nuestros resultados más destacados revelaron que el tratamiento de MDM con RPV *in vitro* produce una inducción en la expresión génica de los factores de transcripción STAT6 y PPAR γ , y de su gen diana *ARG1*, todos ellos marcadores clásicos de macrófagos M2. Esta activación de STAT6 mediada por RPV se confirmó al observar una mayor traslocación de este factor de transcripción al núcleo en las células tratadas. Dicho efecto no se observó en MDM tratados con IL-4, la citocina caracterizada como estímulo de STAT6. Aunque la literatura avala la concentración utilizada en estos experimentos, el tiempo de tratamiento empleado podría no ser el adecuado.

Considerando que todos los resultados obtenidos con RPV en MDM apuntan a una diferenciación hacia un perfil antiinflamatorio, nos planteamos evaluar cómo afecta el tratamiento con RPV a la polarización macrofágica en condiciones proinflamatorias. De nuevo, la expresión génica de los marcadores fenotípicos evaluados resultó heterogénea. Es importante destacar que el tratamiento con RPV en estas condiciones de daño indujo la expresión de diversos marcadores asociados con un fenotipo antiinflamatorio y pro-resolutivo (*CD206*, *PPARG*, *TGFB1*, *MMP12* y *PDGFB*), entre los que se encuentran genes diana de STAT6 (*PPARG* y *MMP12*) (201). Finalmente, y a pesar de no obtener resultados estadísticamente significativos, el estudio de la polarización mediante citometría de flujo sugiere que el tratamiento con RPV tiende a invertir el efecto producido por LPS. Una de las limitaciones a las que nos enfrentamos en este objetivo es la de tratar de simplificar una respuesta tan compleja como la respuesta macrofágica. Por ello, para lograr una mayor comprensión de lo que sucede a nivel fenotípico sería conveniente analizar estos parámetros en modelos *in vivo*. Aun así, la información que se puede extraer de todo este conjunto de experimentos es que la RPV tiende a inducir un fenotipo antiinflamatorio y restaurador en los macrófagos.

Un resultado que merece ser analizado a nivel individual es el efecto que produce RPV en la expresión de *IL6*. Aunque RPV reduce la expresión de *IL6* en condiciones proinflamatorias, podemos observar que en condiciones basales induce su expresión. Este resultado es de gran interés, ya que IL-6, además de ser una citocina proinflamatoria, se caracteriza por regular STAT3 induciendo un efecto hepatoprotector al promover la supervivencia de los hepatocitos y la regeneración hepática (202). En esta línea, la secreción de IL-6 por parte de KC se ha relacionado tanto con un efecto antiapoptótico y antiesteatótico en hepatocitos (203) como con un efecto antifibrótico en modelos murinos (202). Esta inducción de STAT3 ligada a una mayor proliferación de hepatocitos ya se ha descrito para RPV en nuestro laboratorio en un modelo murino de NAFLD (46). En este mismo trabajo, experimentos realizados *in vitro* demostraron la capacidad de RPV para inducir una activación de STAT3 en hepatocitos mediante la secreción de IL-6 por parte de HSC tratados con RPV. En vista a estos resultados sería interesante estudiar si la secreción de IL-6 por parte de los macrófagos tratados con RPV afectaría de la misma manera a la proliferación de los hepatocitos.

Entre las limitaciones del estudio con macrófagos nos encontramos las inherentes a emplear células primarias y su consecuente variabilidad interindividual. Esta variabilidad se trató de reducir al incluir en el estudio únicamente a los voluntarios que declararon no padecer ninguna patología crónica y no haber recibido un tratamiento antiinflamatorio, además se incluyó en todos los ensayos una condición control respecto a la cual se normalizaron los resultados. Aun así, la variabilidad interindividual y la dificultad para conseguir voluntarios sanos para realizar más repeticiones de los ensayos ha dificultado obtener resultados con significatividad estadística en muchos casos.

En esta tesis demostramos que el efecto antiinflamatorio de RPV no se limita únicamente a su acción sobre los macrófagos, sino que también actúa sobre las

HSC. En esta población celular, la respuesta inflamatoria adquiere un protagonismo especial ya que se trata de las principales células efectoras de la fibrosis hepática (74). RPV inhibe la vía del inflamasoma NLRP3/caspasa-1 en células LX-2, incluso en condiciones profibrogénicas. Diversos estudios han demostrado la participación de esta vía en el desarrollo de NAFLD y fibrosis (108,204). Aunque algunos de los efectos producidos por el propio TGF β podrían ser inesperados, ya que redujo de manera significativa la expresión génica de los diferentes componentes del inflamasoma y de *IL1B*, se ha descrito en la literatura que el efecto que produce TGF β en estas células depende del tiempo de ensayo empleado, aumentando la expresión de *IL1B* en periodos de tiempos cortos (10 min) y disminuyéndola en periodos más largos (60 min). Por tanto, este efecto podría ser resultado de un mecanismo de regulación autocrina para limitar la respuesta inflamatoria (205). RPV además indujo la expresión génica de PPAR γ , el cual se ha asociado con efectos antiinflamatorios y antifibrogénicos en HSC (168), ya que su activación mantiene a las HSC en su fenotipo quiescente (206). La importancia de estas observaciones en la progresión de la fibrosis se ha demostrado recientemente *in vivo* en un estudio que demuestra que la deficiencia de PPAR γ en HSC de ratones promueve el desarrollo de la fibrosis y retrasa su resolución (207). Aunque una activación de PPAR γ en hepatocitos podría ser preocupante por su implicación en el desarrollo de esteatosis (168), resultados previos de nuestro grupo obtenidos en el modelo de NAFLD demuestran que este efecto de RPV es específico del tipo celular, ya que no activa este factor de transcripción en hepatocitos (46).

Si bien los resultados obtenidos con RPV *in vitro* y en animales de experimentación resultan esperanzadores, es importante evaluar sus efectos en pacientes, ya que muchos potenciales tratamientos pierden su efectividad en los ensayos *in vivo*. Por ello, nos propusimos determinar si las acciones hepatoprotectoras inducidas por este fármaco en modelos murinos se reproducían en pacientes con patología hepática. A falta de fármacos capaces de inducir la reversión o resolución de la

fibrosis hepática, la regulación de la señalización de JAK-STAT se ha postulado como una buena diana para el tratamiento de enfermedades hepáticas (208). En este sentido, la activación de STAT1 en aHSC ha resultado ser beneficiosa al reducir su proliferación e inducir su apoptosis (209), y retrasando la progresión del daño hepático al promover la reversión de la fibrosis hepática (210). Por el contrario, los efectos nocivos descritos de la activación de STAT1 en hepatocitos son consecuencia de la inducción directa de apoptosis en este tipo celular (208). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio revelaron un mecanismo mediante el cual RPV ejerce su efecto antifibrótico en modelos murinos al inducir de forma selectiva la apoptosis en aHSC mediante la activación de STAT1. Esta regulación, a su vez, supuso la activación secundaria de la señalización de STAT3 en hepatocitos provocando un aumento en su proliferación y restaurando así la homeostasis del parénquima hepático (46). En esta tesis hemos confirmado la activación selectiva de STAT1 en células hepáticas no parenquimales en biopsias de pacientes VIH con diagnóstico de NAFLD que reciben terapia basada en RPV. Además, este aumento en la señal de STAT1 se observó en pacientes que presentaban diferentes estadios de NAFLD, desde esteatosis moderada/intensa hasta esteatohepatitis o fibrosis, lo que apunta a un efecto hepatoprotector de este tratamiento inactivando a las aHSC para reducir la progresión del daño hepático. Es importante destacar que, de nuevo, la activación de STAT1 no afectó a los hepatocitos (datos no mostrados), lo que iría en concordancia con estudios previos realizados *in vitro* con la línea Hep3B en los que el tratamiento con RPV no afectó a la viabilidad de este tipo celular (45).

Un objetivo planteado en la tesis fue valorar el estado inflamatorio de pacientes VIH mediante el análisis de la expresión génica de marcadores inflamatorios en sus PBMC. Este estudio se enfrentó a distintas limitaciones. En primer lugar, la baja expresión de algunos de los genes de interés en los PBMC (*IL6*, *CXCL10*, *SERPINE-1* y *NLRP3*) impidió que fueran detectados mediante la técnica empleada y, por tanto,

obtener resultados para todas las muestras analizadas. Además, la estratificación de la población en distintos grupos en función de las características a considerar supuso que se redujera aún más el número de individuos pertenecientes a cada grupo y mermó la potencia estadística del estudio. Esto, sumado a la presencia de otras variables como las distintas combinaciones de fármacos dificultó la posibilidad de obtener resultados más concluyentes. Aun así, se pudo observar que los pacientes que han recibido tratamiento con ddl o d4T en cualquier momento tienen una mayor expresión de *IL1B* y *TNFA*. Ambos fármacos pertenecen al grupo de NRTI y se han postulado como los antirretrovirales inhibidores de la Polγ más potentes (211), comprometiendo el funcionamiento mitocondrial (212). Además, el daño mitocondrial en PBMC de pacientes con VIH se ha asociado con una mayor producción de ROS y una mayor respuesta inflamatoria (213), lo que está en línea con nuestros resultados. También observamos una mayor expresión de *IL1B* y *TNFA* cuando el tratamiento actual no incluía TDF/TAF ni RPV, aunque no se pudo asociar una menor expresión de estos marcadores a la presencia de RPV en el tratamiento. La presencia de PI en el tratamiento actual se asoció con un aumento de la expresión de *IL1B*. Estos resultados van acordes a los obtenidos por nuestro grupo en un estudio previo realizado en otra población de pacientes donde el tratamiento que contenía PI se asociaba con un aumento en la expresión génica de algunas citocinas proinflamatorias (*IL18* y *CXCL10*) en comparación al grupo control constituido por donantes sanos (214). Se ha descrito que esta familia de fármacos antirretrovirales puede alterar diversos procesos celulares, induciendo disfunción mitocondrial, resistencia a insulina e inflamación (215). Sorprendentemente, la presencia del NNRTI de primera generación EFV en el tratamiento redujo la expresión de *TNFA* en nuestra población de estudio, a pesar de inducir un claro papel proinflamatorio en diversos modelos celulares *in vitro*, incluyendo hepatocitos y adipocitos (216).

La complejidad de la fisiopatología hepática y las distintas acciones que produce RPV subrayan la importancia de evaluar su efecto en las distintas poblaciones hepáticas y las interacciones que se producen entre ellas. Un punto clave para entender su mecanismo de acción, sería estudiar las interacciones que se producen entre los macrófagos y las HSC, ya que muchas de las citocinas que se han visto moduladas por RPV en MDM son reguladoras de la activación de las HSC y, potencialmente, esta regulación supondría un efecto antifibrótico. También sería de gran interés estudiar la interacción de los monocitos con las LSEC para comprender más en profundidad los mecanismos por los que RPV regula su infiltración, analizando si RPV regula la expresión de mediadores proinflamatorios y moléculas de adhesión en LSEC, y si se produce una menor interacción monocito-LSEC que reduzca su infiltración al hígado.

Para concluir, el presente estudio revela una clara acción antiinflamatoria de RPV sobre los macrófagos al reducir su infiltración al hígado mediada por el eje CCL2/CCR2 y modular la activación de distintas vías proinflamatorias (NLRP3/caspasa-1, NF- κ B y SAPK) claves en el desarrollo de NAFLD. Además, este efecto podría estar acompañado de una polarización hacia fenotipo antiinflamatorio y pro-resolutivo dependiente de STAT6/PPAR γ y de una respuesta antiinflamatoria y antifibrótica en HSC. Al mismo tiempo, demostramos por primera vez el potencial antifibrótico de RPV en pacientes infectados con VIH y NAFLD al inducir la activación de STAT1 en células no parenquimales.

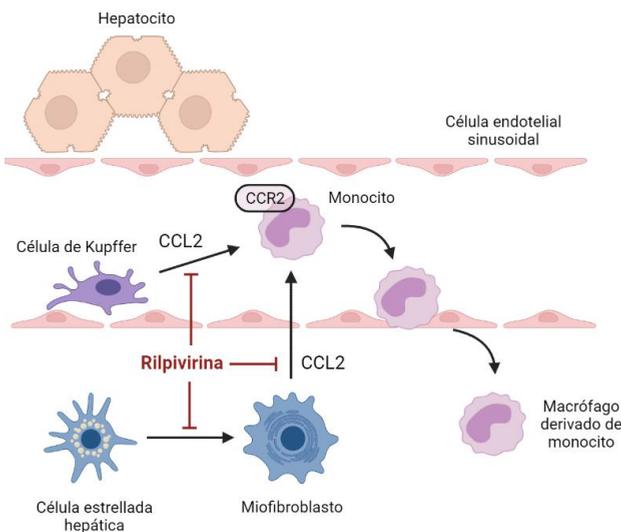


Figura V.1. Representación esquemática de los efectos de Rilpivirina en la migración de monocitos y activación de células estrelladas hepáticas. Rilpivirina inhibe la activación de las células estrelladas hepáticas a miofibroblastos y reduce la síntesis y secreción de la quimiocina CCL2 por parte de las células de Kupffer y miofibroblastos, lo que supone una menor infiltración de los macrófagos al hígado. Creado con BioRender.com.

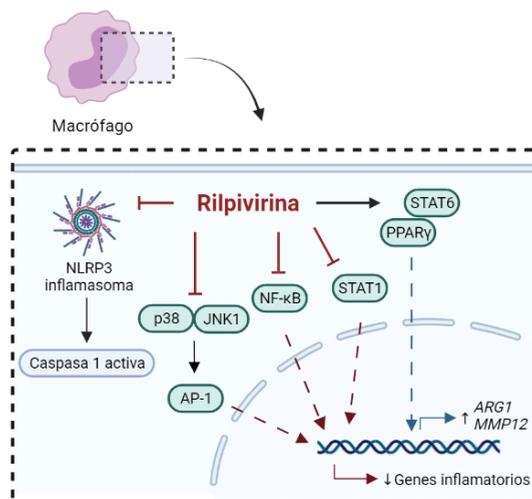


Figura V.2. Representación esquemática de los efectos de Rilpivirina en la activación de los macrófagos. Rilpivirina inhibe la activación del inflammasoma NLRP3 y caspasa-1, las rutas inflamatorias y de respuesta a estrés mediadas por NF-κB, p38, JNK1 y STAT1 e induce los factores de transcripción STAT6/PPARγ, lo que supone una menor producción de genes inflamatorios (*IL1B*, *CCL2*, *IL6*, *IL8* y *NLRP3*) y el incremento en la expresión de marcadores de macrófagos M2. Creado con BioRender.com.

En vista a estos resultados y evidencias previas, y teniendo en cuenta las limitaciones inherentes a este estudio, consideramos que RPV estaría especialmente indicada en pacientes infectados por el VIH con especial susceptibilidad a sufrir ciertas enfermedades hepáticas, como NAFLD. Además, profundizar en su estudio podría tener una gran relevancia clínica como factor clave para mejorar la terapia farmacológica de las enfermedades hepáticas con componente fibrótico e inflamatorio, sirviendo de base para descubrir nuevas dianas terapéuticas, como una opción terapéutica en sí misma y mejorando nuestra comprensión actual de los mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología hepática.

VI. CONCLUSIONES

1. Rilpivirina reduce la infiltración de macrófagos en el hígado en un modelo nutricional de NAFLD. Los resultados *in vitro* indican que esta regulación se produce mediante la inhibición de la secreción de la quimiocina CCL2 por parte de los macrófagos y las células estrelladas hepáticas.
2. Rilpivirina inhibe la vía del inflamasoma NLRP3/caspasa-1 en células estrelladas hepáticas e induce la expresión de PPAR γ , ejerciendo efectos antiinflamatorios y antifibróticos en esta población celular.
3. Rilpivirina ejerce un claro efecto antiinflamatorio en macrófagos incluso bajo la potente inducción proinflamatoria mediada por LPS. Este efecto implica la regulación de la vía del inflamasoma NLRP3/caspasa-1 y la inhibición de las rutas inflamatorias y de respuesta a estrés mediadas por NF- κ B, p38 y JNK1.
4. El tratamiento con Rilpivirina podría inducir una polarización del fenotipo macrofágico hacia un perfil antiinflamatorio y pro-resolutivo. Este efecto está mediado por la regulación de los factores de transcripción STAT6/PPAR γ y la inhibición de la activación de STAT1.
5. Los pacientes infectados con VIH que presentan NAFLD en diferentes estadios y que reciben terapia antirretroviral basada en RPV muestran un aumento en la activación de STAT1 en células no parenquimales, lo que podría indicar una atenuación del daño hepático por apoptosis o inactivación de células estrelladas activadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet [Internet]. [citado 18 de octubre de 2021]. Disponible en: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
2. McLaren PJ, Fellay J. HIV-1 and human genetic variation. *Nat Rev Genet.* 2021; 22(10):645-57.
3. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet Lond Engl.* 2014; 384(9939):258-71.
4. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell.* 1998; 93(5):681-4.
5. Liu Y, Liu H, Kim BO, Gattone VH, Li J, Nath A, et al. CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor. *J Virol.* 2004; 78(8):4120-33.
6. Chen P, Chen BK, Mosoian A, Hays T, Ross MJ, Klotman PE, et al. Virological synapses allow HIV-1 uptake and gene expression in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2011; 22(3):496-507.
7. Ramdas P, Sahu AK, Mishra T, Bhardwaj V, Chande A. From Entry to Egress: Strategic Exploitation of the Cellular Processes by HIV-1. *Front Microbiol.* 2020; 11:3021.
8. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Primer.* 2015; 1(1):1-22.
9. Barré-Sinoussi F, Ross AL, Delfraissy J-F. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11(12):877-83.
10. de Béthune M-P. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: A review of the last 20 years (1989–2009). *Antiviral Res.* 2010; 85(1):75-90.

11. Gruevska A, Moragrega ÁB, Cossarizza A, Esplugues JV, Blas-García A, Apostolova N. Apoptosis of Hepatocytes: Relevance for HIV-Infected Patients under Treatment. *Cells*. 2021;10(2):410.
12. Arribas JR, Polo R, García JG, Palacios R. Esteban Martínez (GeSIDA). :145.
13. Sherman KE, Peters M, Koziel MJ. HIV and liver disease forum: Conference proceedings. *Hepatology*. 2007; 45(6):1566-77.
14. Antiretroviral Therapy for Prevention of Human Immunodeficiency Virus Infection - ScienceDirect [Internet]. [citado 19 de octubre de 2021]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025712516000432?via%3Dihub>
15. Jones M, Núñez M. Liver Toxicity of Antiretroviral Drugs. *Semin Liver Dis*. 2012; 32(2):167-76.
16. Núñez M. Clinical syndromes and consequences of antiretroviral-related hepatotoxicity. *Hepatology*. 2010; 52(3):1143-55.
17. Bakasis A-D, Androutsakos T. Liver Fibrosis during Antiretroviral Treatment in HIV-Infected Individuals. Truth or Tale? *Cells*. 2021; 10(5):1212.
18. Kovari H, Weber R. Influence of antiretroviral therapy on liver disease. *Curr Opin HIV AIDS*. 2011; 6(4):272-7.
19. Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, Sevastianova K, Bergholm R, Johansson LM, et al. Prediction of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Liver Fat Using Metabolic and Genetic Factors. *Gastroenterology*. 2009; 137(3):865-72.
20. Manosuthi W, Sukasem C, Lueangniyomkul A, Mankatitham W, Thongyen S, Nilkamhang S, et al. CYP2B6 haplotype and biological factors responsible for

hepatotoxicity in HIV-infected patients receiving efavirenz-based antiretroviral therapy. *Int J Antimicrob Agents*. 2014; 43(3):292-6.

21. Trends in underlying causes of death in people with HIV from 1999 to 2011 (D:A:D): a multicohort collaboration - ScienceDirect [Internet]. [citado 11 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673614606048>

22. Division of AIDS (DAIDS) Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events. 2017:35.

23. Mata-Marín JA, Gaytán-Martínez J, Grados-Chavarría BH, Fuentes-Allen JL, Arroyo-Anduiza CI, Alfaro-Mejía A. Correlation between HIV viral load and aminotransferases as liver damage markers in HIV infected naive patients: a concordance cross-sectional study. *Virology*. 2009; 6(1):181.

24. Sterling RK, Chiu S, Snider K, Nixon D. The Prevalence and Risk Factors for Abnormal Liver Enzymes in HIV-Positive Patients without Hepatitis B or C Coinfections. *Dig Dis Sci*. 2008; 53(5):1375-82.

25. Puoti C, Guarisco R, Bellis L, Spilabotti L. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology*. 2009; 50(1):322-322.

26. Martín-Carbonero L, Núñez M, González-Lahoz J, Soriano V. Incidence of liver injury after beginning antiretroviral therapy with efavirenz or nevirapine. *HIV Clin Trials*. 2003; 4(2):115-20.

27. Sonderup MW, Wainwright HC. Human Immunodeficiency Virus Infection, Antiretroviral Therapy, and Liver Pathology. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017; 46(2):327-43.

28. Sulkowski MS. Drug-induced liver injury associated with antiretroviral therapy that includes HIV-1 protease inhibitors. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2004; 38 Suppl 2:S90-97.
29. Otto AO, Rivera CG, Zeuli JD, Temesgen Z. Hepatotoxicity of Contemporary Antiretroviral Drugs: A Review and Evaluation of Published Clinical Data. *Cells.* 2021; 10(5):1263.
30. Bagella P, De Socio GV, Ricci E, Menzaghi B, Martinelli C, Squillace N, et al. Durability, safety, and efficacy of rilpivirine in clinical practice: results from the SCOLTA Project. *Infect Drug Resist.* 2018; 11:615-23.
31. Research C for DE and. FDA Approves Cabenuva and Vocabria for the Treatment of HIV-1 Infection. FDA [Internet]. 27 de enero de 2021 [citado 27 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://www.fda.gov/drugs/human-immunodeficiency-virus-hiv/fda-approves-cabenuva-and-vocabria-treatment-hiv-1-infection>
32. Verloes R, Deleu S, Niemeijer N, Crauwels H, Meyvisch P, Williams P. Safety, tolerability and pharmacokinetics of rilpivirine following administration of a long-acting formulation in healthy volunteers. *HIV Med.* 2015; 16(8):477-84.
33. EDURANT-pi.pdf [Internet]. [citado 27 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.janssenlabels.com/package-insert/product-monograph/prescribing-information/EDURANT-pi.pdf>
34. Lade JM, Avery LB, Bumpus NN. Human Biotransformation of the Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Rilpivirine and a Cross-Species Metabolism Comparison. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(10):5067-79.

35. Benedicto AM, Fuster-Martínez I, Tosca J, Esplugues JV, Blas-García A, Apostolova N. NNRTI and Liver Damage: Evidence of Their Association and the Mechanisms Involved. *Cells*. 2021; 10(7):1687.
36. Behrens G, Rijnders B, Nelson M, Orkin C, Cohen C, Mills A, et al. Rilpivirine versus efavirenz with emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate in treatment-naïve HIV-1-infected patients with HIV-1 RNA \leq 100,000 copies/mL: week 96 pooled ECHO/THRIVE subanalysis. *AIDS Patient Care STDs*. 2014; 28(4):168-75.
37. Neukam K, Espinosa N, Collado A, Delgado-Fernández M, Jiménez-Aguilar P, Rivero-Juárez A, et al. Hepatic Safety of Rilpivirine/Emtricitabine/Tenofovir Disoproxil Fumarate Fixed-Dose Single-Tablet Regimen in HIV-Infected Patients with Active Hepatitis C Virus Infection: The hEPatic Study. *PloS One*. 2016; 11(5):e0155842.
38. Tebas P, Sension M, Arribas J, Duiculescu D, Florence E, Hung C-C, et al. Lipid levels and changes in body fat distribution in treatment-naive, HIV-1-Infected adults treated with rilpivirine or Efavirenz for 96 weeks in the ECHO and THRIVE trials. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2014; 59(3):425-34.
39. Thamrongwonglert P, Chetchotisakd P, Anunnatsiri S, Mootsikapun P. Improvement of lipid profiles when switching from efavirenz to rilpivirine in HIV-infected patients with dyslipidemia. *HIV Clin Trials*. 2016; 17(1):12-6.
40. Taramasso L, Tatarelli P, Ricci E, Madeddu G, Menzaghi B, Squillace N, et al. Improvement of lipid profile after switching from efavirenz or ritonavir-boosted protease inhibitors to rilpivirine or once-daily integrase inhibitors: results from a large observational cohort study (SCOLTA). *BMC Infect Dis*. 2018; 18:357.
41. Curran A, Rull A, Navarro J, Vidal-González J, Martín-Castillo M, Burgos J, et al. Lipidomics Reveals Reduced Inflammatory Lipid Species and Storage Lipids

after Switching from EFV/FTC/TDF to RPV/FTC/TDF: A Randomized Open-Label Trial. *J Clin Med*. 2020; 9(5):E1246.

42. Gianotti N, Poli A, Nozza S, Spagnuolo V, Tambussi G, Bossolasco S, et al. Efficacy and safety in clinical practice of a rilpivirine, tenofovir and emtricitabine single-tablet regimen in virologically suppressed HIV-positive patients on stable antiretroviral therapy. *J Int AIDS Soc*. 2015; 18:20037.

43. Lee MJ, Berry P, D'Errico F, Miquel R, Kulasegaram R. A case of rilpivirine drug-induced liver injury. *Sex Transm Infect*. 2020; 96(8):618-9.

44. Ahmed Y, Siddiqui W, Enoch CB, Albrecht H, Bookstaver PB. Rare case of rilpivirine-induced severe allergic hepatitis. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68(2):484-6.

45. Blas-García A, Polo M, Alegre F, Funes HA, Martínez E, Apostolova N, et al. Lack of mitochondrial toxicity of darunavir, raltegravir and rilpivirine in neurons and hepatocytes: a comparison with efavirenz. *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69(11):2995-3000.

46. Martí-Rodrigo A, Alegre F, Moragrega ÁB, García-García F, Martí-Rodrigo P, Fernández-Iglesias A, et al. Rilpivirine attenuates liver fibrosis through selective STAT1-mediated apoptosis in hepatic stellate cells. *Gut*. 2020; 69(5):920-32.

47. Gonzalez-Serna A, Corma-Gomez A, Tellez F, García-Martin S, Rivero-Juarez A, Frias M, et al. Liver stiffness change with HCV cure in HIV-infected patients on non-nucleoside analogues. *J Antimicrob Chemother*. 2021; 76(9):2375-9.

48. Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver — from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016; 13(2):88-110.

49. Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V. Orchestrating liver development. *Dev Camb Engl*. 2015; 142(12):2094-108.

50. Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, Tuma F. *Physiology, Liver*. Treasure Island: StatPearls; 2021
51. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol*. 2017; 27(21):R1147-51.
52. Roohani S, Tacke F. Liver Injury and the Macrophage Issue: Molecular and Mechanistic Facts and Their Clinical Relevance. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(14):7249.
53. Robinson MW, Harmon C, O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol*. 2016; 13(3):267-76.
54. Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol*. 2013; 59(3):583-94.
55. Guillot A, Tacke F. Liver Macrophages: Old Dogmas and New Insights. *Hepatol Commun*. 2019; 3(6):730-43.
56. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6:425-56.
57. Zhou Z, Xu M-J, Gao B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cell Mol Immunol*. 2016; 13(3):301-15.
58. Ibrahim SH, Hirsova P, Gores GJ. Non-alcoholic steatohepatitis pathogenesis: sublethal hepatocyte injury as a driver of liver inflammation. *Gut*. 2018; 67(5):963-72.
59. Kubes P, Mehal WZ. Sterile Inflammation in the Liver. *Gastroenterology*. 2012; 143(5):1158-72.
60. McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*. 2013; 39(2):357-71.

61. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017; 14(7):397-411.
62. Blomhoff R, Wake K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J*. 1991; 5(3):271-7.
63. She H, Xiong S, Hazra S, Tsukamoto H. Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *J Biol Chem*. 2005; 280(6):4959-67.
64. Kitto LJ, Henderson NC. Hepatic Stellate Cell Regulation of Liver Regeneration and Repair. *Hepatol Commun*. 2021; 5(3):358-70.
65. Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest*. 127(1):55-64.
66. Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA. The role of TGF β 1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol*. 1999; 30(1):77-87.
67. Lee YA, Friedman SL. Inflammatory and fibrotic mechanisms in NAFLD—Implications for new treatment strategies. *J Intern Med*. 2021. 291(1):11-31.
68. Sherman MH. Stellate Cells in Tissue Repair, Inflammation, and Cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2018; 34(1):333-55.
69. Gupta G, Khadem F, Uzonna JE. Role of hepatic stellate cell (HSC)-derived cytokines in hepatic inflammation and immunity. *Cytokine*. 2019; 124:154542.
70. Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA, et al. Ito Cells Are Liver-Resident Antigen-Presenting Cells for Activating T Cell Responses. *Immunity*. 2007; 26(1):117-29.

71. Seki E, De Minicis S, Österreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, et al. TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med.* 2007; 13(11):1324-32.
72. Watanabe A, Hashmi A, Gomes DA, Town T, Badou A, Flavell RA, et al. Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9. *Hepatology.* 2007; 46(5):1509-18.
73. Harvey SAK, Dangi A, Tandon A, Gandhi CR. The Transcriptomic Response of Rat Hepatic Stellate Cells to Endotoxin: Implications for Hepatic Inflammation and Immune Regulation. *PLOS ONE.* 2013; 8(12):e82159.
74. Seki E, Schwabe RF. Hepatic inflammation and fibrosis: Functional links and key pathways. *Hepatology.* 2015; 61(3):1066-79.
75. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer Cells in the Liver. *Compr Physiol.* 2013; 3(2):785-97.
76. Cai J, Zhang X-J, Li H. The Role of Innate Immune Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology.* 2019; 70(3):1026-37.
77. Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17(5):306-21.
78. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut.* 2012; 61(3):416-26.
79. Roh YS, Zhang B, Loomba R, Seki E. TLR2 and TLR9 contribute to alcohol-mediated liver injury through induction of CXCL1 and neutrophil infiltration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015; 309(1):G30-41.

80. Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C, et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1⁺ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2009; 50(1):261-74.
81. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(11):750-61.
82. Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol*. 2014; 60(5):1090-6.
83. MacParland SA, Liu JC, Ma X-Z, Innes BT, Bartczak AM, Gage BK, et al. Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nat Commun*. 2018; 9(1):4383.
84. Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology*. 2014; 59(5):2034-42.
85. Platanitis E, Decker T. Regulatory Networks Involving STATs, IRFs, and NFκB in Inflammation. *Front Immunol*. 2018; 9:2542.
86. Wang C, Ma C, Gong L, Guo Y, Fu K, Zhang Y, et al. Macrophage Polarization and Its Role in Liver Disease. *Front Immunol*. 2021; 12:5381.
87. Ohmori Y, Hamilton TA. IL-4-induced STAT6 suppresses IFN-gamma-stimulated STAT1-dependent transcription in mouse macrophages. *J Immunol*. 1997; 159(11):5474-82.
88. Szanto A, Balint BL, Nagy ZS, Barta E, Dezso B, Pap A, et al. STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPARγ-regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. *Immunity*. 2010; 33(5):699-712.

89. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998; 391(6662):79-82.
90. Li N, Salter RC, Ramji DP. Molecular mechanisms underlying the inhibition of IFN- γ -induced, STAT1-mediated gene transcription in human macrophages by simvastatin and agonists of PPARs and LXRs. *J Cell Biochem*. 2011; 112(2):675-83.
91. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ . *Nature*. 2005; 437(7059):759-63.
92. Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021; 18(3):151-66.
93. Ramachandran P, Henderson NC. Antifibrotics in chronic liver disease: tractable targets and translational challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2016; 1(4):328-40.
94. Bai L, Liu X, Zheng Q, Kong M, Zhang X, Hu R, et al. M2-like macrophages in the fibrotic liver protect mice against lethal insults through conferring apoptosis resistance to hepatocytes. *Sci Rep*. 2017; 7(1):10518.
95. Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, Boulter L, Aucott RL, Ali A, et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(46):E3186-3195.
96. Fischer R, Cariers A, Reinehr R, Häussinger D. Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells. *Gastroenterology*. 2002; 123(3):845-61.

97. Kong X, Feng D, Wang H, Hong F, Bertola A, Wang F-S, et al. Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2012; 56(3):1150-9.
98. Xiao C, Ghosh S. NF-kappaB, an evolutionarily conserved mediator of immune and inflammatory responses. *Adv Exp Med Biol*. 2005; 560:41-5.
99. Schmitz ML, Baeuerle PA. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J*. 1991; 10(12):3805-17.
100. Luedde T, Schwabe RF. NF-κB in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011; 8(2):108-18.
101. Son G, Iimuro Y, Seki E, Hirano T, Kaneda Y, Fujimoto J. Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 293(3):G631-639.
102. Pradere J-P, Kluwe J, De Minicis S, Jiao J-J, Gwak G-Y, Dapito DH, et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology*. 2013; 58(4):1461-73.
103. Zannetti C, Roblot G, Charrier E, Ainouze M, Tout I, Briat F, et al. Characterization of the Inflammasome in Human Kupffer Cells in Response to Synthetic Agonists and Pathogens. *J Immunol*. 2016; 197(1):356-67.
104. Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases. *J Hepatol*. 2012; 57(3):642-54.
105. Evavold CL, Ruan J, Tan Y, Xia S, Wu H, Kagan JC. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity*. 2018 ;48(1):35-44.e6.

106. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. 2015; 526(7575):660-5.
107. Lin K-M, Hu W, Troutman TD, Jennings M, Brewer T, Li X, et al. IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(2):775-80.
108. Wree A, McGeough MD, Peña CA, Schlattjan M, Li H, Inzaugarat ME, et al. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J Mol Med*. 2014; 92(10):1069-82.
109. Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology*. 2011; 54(1):133-44.
110. Csak T, Pillai A, Ganz M, Lippai D, Petrasek J, Park J-K, et al. Both bone marrow-derived and non-bone marrow-derived cells contribute to AIM2 and NLRP3 inflammasome activation in a MyD88-dependent manner in dietary steatohepatitis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2014; 34(9):1402-13.
111. Dixon LJ, Flask CA, Papouchado BG, Feldstein AE, Nagy LE. Caspase-1 as a central regulator of high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2013; 8(2):e56100.
112. Ganz M, Csak T, Szabo G. High fat diet feeding results in gender specific steatohepatitis and inflammasome activation. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(26):8525-34.
113. Adachi Y, Bradford BU, Gao W, Bojes HK, Thurman RG. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology*. 1994 Aug;20(2):453-60.

114. DeSantis DA, Ko C, Liu Y, Liu X, Hise AG, Nunez G, et al. Alcohol-Induced Liver Injury Is Modulated by Nlrp3 and Nlr4 Inflammasomes in Mice. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:e751374.
115. Win S, Than TA, Zhang J, Oo C, Min RWM, Kaplowitz N. New insights into the role and mechanism of c-Jun-N-terminal kinase signaling in the pathobiology of liver diseases. *Hepatology.* 2018; 67(5):2013-24.
116. Nikolic I, Leiva M, Sabio G. The role of stress kinases in metabolic disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2020; 16(12):697-716.
117. Seki E, Brenner DA, Karin M. A Liver Full of JNK: Signaling in Regulation of Cell Function and Disease Pathogenesis, and Clinical Approaches. *Gastroenterology.* 2012; 143(2):307-20.
118. Malhi H, Barreyro FJ, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut.* 2007;56(8):1124-31.
119. Kodama Y, Kisseleva T, Iwaisako K, Miura K, Taura K, De Minicis S, et al. c-Jun N-terminal Kinase-1 From Hematopoietic Cells Mediates Progression From Hepatic Steatosis to Steatohepatitis and Fibrosis in Mice. *Gastroenterology.* 2009; 137(4):1467-1477.e5.
120. Han MS, Jung DY, Morel C, Lakhani SA, Kim JK, Flavell RA, et al. JNK Expression by Macrophages Promotes Obesity-induced Insulin Resistance and Inflammation. *Science.* 2013; 339(6116):10.1126/science.1227568.
121. Kluwe J, Pradere J-P, Gwak G-Y, Mencin A, Minicis SD, Österreicher CH, et al. Modulation of Hepatic Fibrosis by c-Jun-N-Terminal Kinase Inhibition. *Gastroenterology.* 2010; 138(1):347-59.

122. Solinas G, Naugler W, Galimi F, Lee M-S, Karin M. Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(44):16454-9.
123. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420(6913):333-6.
124. Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, et al. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2006; 43(1):163-72.
125. Cicuéndez B, Ruiz-Garrido I, Mora A, Sabio G. Stress kinases in the development of liver steatosis and hepatocellular carcinoma. *Mol Metab*. 2021; 50:101190.
126. Hale KK, Trollinger D, Rihaneck M, Manthey CL. Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999; 162(7):4246-52.
127. Kang YJ, Chen J, Otsuka M, Mols J, Ren S, Wang Y, et al. Macrophage Deletion of p38 α Partially Impairs Lipopolysaccharide-Induced Cellular Activation. *J Immunol*. 2008; 180(7):5075-82.
128. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 1994; 372(6508):739-46.
129. Jiménez-García L, Herránz S, Luque A, Hortelano S. Critical role of p38 MAPK in IL-4-induced alternative activation of peritoneal macrophages. *Eur J Immunol*. 2015; 45(1):273-86.

130. Saccani S, Pantano S, Natoli G. p38-dependent marking of inflammatory genes for increased NF- κ B recruitment. *Nat Immunol.* 2002; 3(1):69-75.
131. Zhang X, Fan L, Wu J, Xu H, Leung WY, Fu K, et al. Macrophage p38 α promotes nutritional steatohepatitis through M1 polarization. *J Hepatol.* 2019;71(1):163-74.
132. p38 γ and p38 δ reprogram liver metabolism by modulating neutrophil infiltration. *EMBO J.* 2016;35(5):536-52.
133. Marra F, Tacke F. Roles for Chemokines in Liver Disease. *Gastroenterology.* 2014;147(3):577-594.e1.
134. Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front Immunol.* 2019; 10: 2759.
135. Bakos E, Thaiss CA, Kramer MP, Cohen S, Radomir L, Orr I, et al. CCR2 Regulates the Immune Response by Modulating the Interconversion and Function of Effector and Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2017; 198(12):4659-71.
136. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006; 116(6):1494-505.
137. Krenkel O, Puengel T, Govaere O, Abdallah AT, Mossanen JC, Kohlhepp M, et al. Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis. *Hepatology Baltim Md.* 2018; 67(4):1270-83.
138. Seki E, de Minicis S, Inokuchi S, Taura K, Miyai K, van Rooijen N, et al. CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatology Baltim Md.* 2009; 50(1):185-97.

-
139. 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*. 2018; 15(1):11-20.
140. Burra P, Becchetti C, Germani G. NAFLD and liver transplantation: Disease burden, current management and future challenges. *JHEP Rep*. 2020; 2(6):100192.
141. Iogna Prat L, Roccarina D, Lever R, Lombardi R, Rodger A, Hall A, et al. Etiology and Severity of Liver Disease in HIV-Positive Patients With Suspected NAFLD: Lessons From a Cohort With Available Liver Biopsies. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. 2019; 80(4):474-80.
142. Maurice JB, Patel A, Scott AJ, Patel K, Thursz M, Lemoine M. Prevalence and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease in HIV-monoinfection. *AIDS*. 2017; 31(11):1621-32.
143. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016; 64(1):73-84.
144. 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*. 2020; 73(1):202-9.
145. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016; 65(8):1038-48.
146. Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Narimatsu K, et al. Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: Mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2014; 59(1):154-69.

147. Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, Govaere O, Heikenwalder M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019; 16(7):411-28.
148. Neuschwander-Tetri BA. Therapeutic Landscape for NAFLD in 2020. *Gastroenterology*. 2020; 158(7):1984-1998.e3.
149. Sumida Y, Yoneda M. Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH. *J Gastroenterol*. 2018; 53(3):362-76.
150. Schattenberg JM, Anstee QM, Caussy C, Bugianesi E, Popovic B. Differences between current clinical guidelines for screening, diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease and real-world practice: a targeted literature review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021; 15(11):1253-66.
151. Luci C, Bourinet M, Leclère PS, Anty R, Gual P. Chronic Inflammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Front Endocrinol*. 2020; 11:939.
152. Prasoppokakorn T, Pitisuttithum P, Treeprasertsuk S. Pharmacological Therapeutics: Current Trends for Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease (MAFLD). *J Clin Transl Hepatol*. 2021; 9(6):939-46.
153. Tzanaki I, Agouridis AP, Kostapanos MS. Is there a role of lipid-lowering therapies in the management of fatty liver disease? *World J Hepatol*. 2022; 14(1):119-39.
154. Reimer KC, Wree A, Roderburg C, Tacke F. New drugs for NAFLD: lessons from basic models to the clinic. *Hepatol Int*. 2020; 14(1):8-23.
155. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019; 18(1):41-58.

156. Aouri M, Barcelo C, Guidi M, Rotger M, Cavassini M, Hizrel C, et al. Population Pharmacokinetics and Pharmacogenetics Analysis of Rilpivirine in HIV-1-Infected Individuals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 61(1):e00899-16.
157. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008; 22(3):659-61.
158. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985; 150(1):76-85.
159. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 2005;29(3):151-9.
160. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinforma Oxf Engl.* 2003; 19(2):185-93.
161. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004;3:Article3.
162. Conesa A, Nueda MJ, Ferrer A, Talón M. maSigPro: a method to identify significantly differential expression profiles in time-course microarray experiments. *Bioinforma Oxf Engl.* 2006; 22(9):1096-102.
163. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* 1995; 57(1):289-300.
164. Sartor MA, Leikauf GD, Medvedovic M. LRpath: a logistic regression approach for identifying enriched biological groups in gene expression data. *Bioinforma Oxf Engl.* 2009;25(2):211-7.

165. Montaner D, Dopazo J. Multidimensional Gene Set Analysis of Genomic Data. *PLoS One*. 2010; 5(4):e10348.
166. Ge Y, Sealfon SC, Speed TP. Some step-down procedures controlling the false discovery rate under dependence. *Stat Sin*. 2008; 18(3):881-904.
167. García-Alcalde F, García-López F, Dopazo J, Conesa A. Paintomics: a web based tool for the joint visualization of transcriptomics and metabolomics data. *Bioinforma Oxf Engl*. 2011;27(1):137-9.
168. Morán-Salvador E, Titos E, Rius B, González-Pérez A, García-Alonso V, López-Vicario C, et al. Cell-specific PPAR γ deficiency establishes anti-inflammatory and anti-fibrogenic properties for this nuclear receptor in non-parenchymal liver cells. *J Hepatol*. 2013;59(5):1045-53.
169. Boaru SG, Borkham-Kamphorst E, Tihaa L, Haas U, Weiskirchen R. Expression analysis of inflammasomes in experimental models of inflammatory and fibrotic liver disease. *J Inflamm Lond Engl*. 2012;9(1):49.
170. Xi S, Zheng X, Li X, Jiang Y, Wu Y, Gong J, et al. Activated Hepatic Stellate Cells Induce Infiltration and Formation of CD163+ Macrophages via CCL2/CCR2 Pathway. *Front Med*. 2021; 8:627927.
171. Lee Y-J, Kim B-M, Ahn Y-H, Choi JH, Choi Y-H, Kang JL. STAT6 Signaling Mediates PPAR γ Activation and Resolution of Acute Sterile Inflammation in Mice. *Cells*. 2021; 10(3):501.
172. Liao X, Sharma N, Kapadia F, Zhou G, Lu Y, Hong H, et al. Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2011; 121(7):2736-49.
173. Riddy DM, Goy E, Delerive P, Summers RJ, Sexton PM, Langmead CJ. Comparative genotypic and phenotypic analysis of human peripheral blood

monocytes and surrogate monocyte-like cell lines commonly used in metabolic disease research. PLOS ONE. 2018; 13(5):e0197177.

174. Trickey A, May MT, Vehreschild J-J, Obel N, Gill MJ, Crane HM, et al. Survival of HIV-positive patients starting antiretroviral therapy between 1996 and 2013: a collaborative analysis of cohort studies. Lancet HIV. 2017; 4(8):e349-56.

175. Chan AW, Patel YA, Choi S. Aging of the Liver: What This Means for Patients with HIV. Curr HIV/AIDS Rep. 2016; 13(6):309-17.

176. Ripamonti D, Bombana E, Rizzi M. Rilpivirine: drug profile of a second-generation non-nucleoside reverse transcriptase HIV-inhibitor. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014;12(1):13-29.

177. Wen Y, Lambrecht J, Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities. Cell Mol Immunol. 2021;18(1):45-56.

178. Moroni F, Dwyer BJ, Graham C, Pass C, Bailey L, Ritchie L, et al. Safety profile of autologous macrophage therapy for liver cirrhosis. Nat Med. 2019; 25(10):1560-5.

179. Ambade A, Lowe P, Kodys K, Catalano D, Gyongyosi B, Cho Y, et al. Pharmacological Inhibition of CCR2/5 Signaling Prevents and Reverses Alcohol-Induced Liver Damage, Steatosis, and Inflammation in Mice. Hepatol Baltim Md. 2019; 69(3):1105-21.

180. Kruger AJ, Fuchs BC, Masia R, Holmes JA, Salloum S, Sojoodi M, et al. Prolonged cenicriviroc therapy reduces hepatic fibrosis despite steatohepatitis in a diet-induced mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. Hepatol Commun. 2018; 2(5):529-45.

181. Friedman SL, Ratziu V, Harrison SA, Abdelmalek MF, Aithal GP, Caballeria J, et al. A randomized, placebo-controlled trial of cenicriviroc for treatment of nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis. *Hepatology*. 2018; 67(5):1754-67.
182. Ratziu V, Sanyal A, Harrison SA, Wong VW-S, Francque S, Goodman Z, et al. Cenicriviroc Treatment for Adults With Nonalcoholic Steatohepatitis and Fibrosis: Final Analysis of the Phase 2b CENTAUR Study. *Hepatology*. 2020; 72(3):892-905.
183. Mulder P, van den Hoek AM, Kleemann R. The CCR2 Inhibitor Propagermanium Attenuates Diet-Induced Insulin Resistance, Adipose Tissue Inflammation and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PloS One*. 2017; 12(1):e0169740.
184. Baeck C, Wei X, Bartneck M, Fech V, Heymann F, Gassler N, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine C-C motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6C(+) macrophage infiltration in mice. *Hepatology*. 2014; 59(3):1060-72.
185. Pérez-Martínez L, Pérez-Matute P, Aguilera-Lizarraga J, Rubio-Mediavilla S, Narro J, Recio E, et al. Maraviroc, a CCR5 antagonist, ameliorates the development of hepatic steatosis in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69(7):1903-10.
186. Mridha AR, Wree A, Robertson AAB, Yeh MM, Johnson CD, Van Rooyen DM, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J Hepatol*. 2017; 66(5):1037-46.
187. Petrasek J, Bala S, Csak T, Lippai D, Kodys K, Menashy V, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J Clin Invest*. 2012; 122(10):3476-89.

188. Shiffman M, Freilich B, Vuppalanchi R, Watt K, Chan JL, Spada A, et al. Randomised clinical trial: emricasan versus placebo significantly decreases ALT and caspase 3/7 activation in subjects with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019; 49(1):64-73.
189. Younossi ZM, Stepanova M, Lawitz E, Charlton M, Loomba R, Myers RP, et al. Improvement of hepatic fibrosis and patient-reported outcomes in non-alcoholic steatohepatitis treated with selonsertib. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2018; 38(10):1849-59.
190. Loomba R, Lawitz E, Mantry PS, Jayakumar S, Caldwell SH, Arnold H, et al. The ASK1 inhibitor selonsertib in patients with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, phase 2 trial. *Hepatology.* 2018; 67(2):549-59.
191. Gilead Sciences. A Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study Evaluating the Safety and Efficacy of Selonsertib in Subjects With Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) and Bridging (F3) Fibrosis [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2020 jun [citado 8 de marzo de 2022]. Report No.: NCT03053050. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03053050>
192. Gilead Sciences. A Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study Evaluating the Safety and Efficacy of Selonsertib in Subjects With Compensated Cirrhosis Due to Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2020 abr [citado 8 de marzo de 2022]. Report No.: NCT03053063. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03053063>
193. Ergen C, Heymann F, Al Rawashdeh W, Gremse F, Bartneck M, Panzer U, et al. Targeting distinct myeloid cell populations in vivo using polymers, liposomes and microbubbles. *Biomaterials.* 2017; 114:106-20.

194. Ding N, Wang Y, Dou C, Liu F, Guan G, Wei K, et al. Physalin D regulates macrophage M1/M2 polarization via the STAT1/6 pathway. *J Cell Physiol.* 2019; 234(6):8788-96.
195. He Y, Gao Y, Zhang Q, Zhou G, Cao F, Yao S. IL-4 Switches Microglia/macrophage M1/M2 Polarization and Alleviates Neurological Damage by Modulating the JAK1/STAT6 Pathway Following ICH. *Neuroscience.* 2020; 437:161-71.
196. Mandard S, Patsouris D. Nuclear Control of the Inflammatory Response in Mammals by Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *PPAR Res.* 2013; 2013:e613864.
197. Stienstra R, Duval C, Keshtkar S, Laak J van der, Kersten S, Müller M. Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Activation Promotes Infiltration of Alternatively Activated Macrophages into Adipose Tissue. *J Biol Chem.* 2008; 283(33):22620-7.
198. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, et al. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature.* 2007; 447(7148):1116-20.
199. Luo W, Xu Q, Wang Q, Wu H, Hua J. Effect of modulation of PPAR- γ activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.* 2017;7:44612.
200. Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *J Hepatol.* 2017;66(6):1300-12.
201. Weng S-Y, Wang X, Vijayan S, Tang Y, Kim YO, Padberg K, et al. IL-4 Receptor Alpha Signaling through Macrophages Differentially Regulates Liver Fibrosis Progression and Reversal. *EBioMedicine.* 2018;29:92-103.

202. Deng Y-R, Ma H-D, Tsuneyama K, Yang W, Wang Y-H, Lu F-T, et al. STAT3-mediated attenuation of CCl4-induced mouse liver fibrosis by the protein kinase inhibitor sorafenib. *J Autoimmun.* 2013;46:25-34.
203. Wan J, Benkdane M, Alons E, Lotersztajn S, Pavoine C. M2 kupffer cells promote hepatocyte senescence: an IL-6-dependent protective mechanism against alcoholic liver disease. *Am J Pathol.* 2014;184(6):1763-72.
204. Inzaugarat ME, Johnson CD, Holtmann TM, McGeough MD, Trautwein C, Papouchado BG, et al. NLRP3 inflammasome activation in hepatic stellate cells induces murine liver fibrosis. *Hepatology* Baltim Md. 2019;69(2):845-59.
205. TGF- β activates NLRP3 inflammasome by an autocrine production of TGF- β in LX-2 human hepatic stellate cells | SpringerLink [Internet]. [citado 10 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-022-04369-5>
206. Hazra S, Xiong S, Wang J, Rippe RA, Krishna V, Chatterjee K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces a phenotypic switch from activated to quiescent hepatic stellate cells. *J Biol Chem.* 2004; 279(12):11392-401.
207. Liu X, Xu J, Rosenthal S, Zhang L-J, McCubbin R, Meshgin N, et al. Identification of Lineage-Specific Transcription Factors That Prevent Activation of Hepatic Stellate Cells and Promote Fibrosis Resolution. *Gastroenterology.* 2020; 158(6):1728-1744.e14.
208. Gao B, Wang H, Lafdil F, Feng D. STAT proteins - key regulators of anti-viral responses, inflammation, and tumorigenesis in the liver. *J Hepatol.* 2012; 57(2):430-41.

209. Jeong W-I, Park O, Radaeva S, Gao B. STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology*. 2006;44(6):1441-51.
210. Zhang H, Chen F, Fan X, Lin C, Hao Y, Wei H, et al. Quantitative Proteomic analysis on Activated Hepatic Stellate Cells reversion Reveal STAT1 as a key regulator between Liver Fibrosis and recovery. *Sci Rep*. 2017;7:44910.
211. Pinti M, Salomoni P, Cossarizza A. Anti-HIV drugs and the mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1757(5-6):700-7.
212. Apostolova N, Blas-García A, Esplugues JV. Mitochondrial interference by anti-HIV drugs: mechanisms beyond Pol- γ inhibition. *Trends Pharmacol Sci*. 2011; 32(12):715-25.
213. Gangcuangco LMA, Mitchell BI, Siriwardhana C, Kohorn LB, Chew GM, Bowler S, et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation in peripheral blood mononuclear cells is decreased in chronic HIV and correlates with immune dysregulation. *PLOS ONE*. 2020;15(4):e0231761.
214. Gruevska A, Moragrega AB, Galindo MJ, Esplugues JV, Blas-Garcia A, Apostolova N. p53 and p53-related mediators PAI-1 and IGFBP-3 are downregulated in peripheral blood mononuclear cells of HIV-patients exposed to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antiviral Res*. 2020; 178:104784.
215. Mohan J, Ghazi T, Chuturgoon AA. A Critical Review of the Biochemical Mechanisms and Epigenetic Modifications in HIV- and Antiretroviral-Induced Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(21):12020.
216. Apostolova N, Blas-Garcia A, Galindo MJ, Esplugues JV. Efavirenz: What is known about the cellular mechanisms responsible for its adverse effects. *Eur J Pharmacol*. 2017; 812:163-73.

ANEXOS

PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA ASOCIADA A ESTA TESIS

- Polo M, Alegre F, **Moragrega ÁB**, Gibellini L, Martí-Rodrigo A, Blas-García A, Esplugues JV, Apostolova N. Lon protease: a novel mitochondrial matrix protein in the interconnection between drug-induced mitochondrial dysfunction and ER stress. *Br J Pharmacol.* 2017; 174(23):4409-4429.
- Alegre F, **Moragrega ÁB**, Polo M, Martí-Rodrigo A, Esplugues JV, Blas-García A, Apostolova N. Role of p62/SQSTM1 beyond autophagy: a lesson learned from drug-induced toxicity in vitro. *Br J Pharmacol.* 2018; 175(3):440-455.
- Martí-Rodrigo A, Alegre F, **Moragrega ÁB**, García-García F, Martí-Rodrigo P, Fernandez-Iglesias A, Gracia-Sancho J, Apostolova N, Esplugues JV, Blas-García A. Rilpivirine attenuates liver fibrosis through selective STAT1-mediated apoptosis in hepatic stellate cells. *Gut.* 2020; 69(5):920-932.
- Gruevska A*, **Moragrega ÁB***, Galindo MJ, Esplugues JV, Blas-García A, Apostolova N. p53 and p53-related Mediators PAI-1 and IGFBP-3 Are Downregulated in Peripheral Blood Mononuclear Cells of HIV-patients Exposed to Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *Antiviral Res.* 2020; 178:104784.
- Gruevska A*, **Moragrega ÁB***, Cossarizza A, Esplugues JV, Blas-García A, Apostolova N. Apoptosis of Hepatocytes: Relevance for HIV-Infected Patients under Treatment. *Cells.* 2021; 10(2):410.
- Lucantoni F, Martínez-Cerezuela A, Gruevska A, **Moragrega ÁB**, Víctor VM, Esplugues JV, Blas-García A, Apostolova N. Understanding the implication of autophagy in the activation of hepatic stellate cells in liver fibrosis: are we there yet? *J Pathol.* 2021; 254(3):216-228.
- Apostolova N, Lucantoni F, Benedicto AM, Gruevska A, **Moragrega ÁB**, Fuster-Martínez I, Esplugues JV, Blas-García A. Implication of autophagy in the antifibrogenic effect of Rilpivirine: when more is less. *Cell Death and Disease.*
- Gruevska A, **Moragrega ÁB**, Galindo MJ, Esplugues JV, Blas-García A, Apostolova N. Down-Regulation of the Longevity-Associated Protein SIRT1 in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Treated HIV Patients. *Cells.* 2022; 11(3):348.



AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2014/VSC/PEA/00188

Vista la solicitud realizada en fecha **31/10/14** con nº reg. entrada **20463** por D/D^a. **Pilar Campins Falcó**, Vicorrectora Investigación y Política Científica, centro usuario **ES462500001003**, para realizar el procedimiento:

"Estudio del efecto de la terapia antirretroviral sobre un modelo vivo de esteatohepatitis inducida con dieta rica en grasa"

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Sanidad y Bienestar Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2014/VSC/PEA/00188** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de València**

Responsable del proyecto: **Ana Blas García**

Establecimiento: **Animalario Unidad Central de Investigación**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 26 de noviembre de 2014

El director general de Producción Agraria y Ganadería


José Miguel Ferrer Arranz

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado **“Nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad hepática crónica: rutas de señalización JAK-STAT1 y JAK-STAT3 como punto de partida”** que está siendo realizado por la Dra. Nadezda Apostolova del Dpto. de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universitat de València y que ha sido evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Antecedentes

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

La búsqueda de nuevas dianas moleculares con potencial diagnóstico, pronóstico o terapéutico para la enfermedad hepática crónica.

¿Por qué se le ha pedido que participe?

Porque no ha sido diagnosticado de ninguna enfermedad y es un donante sano.

¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas se realizarán?

Su sangre se utilizará con fines científicos. La participación en este proyecto no supone ningún cambio en el tratamiento que esté llevando, si lo tiene.

¿Cuáles son los riesgos de participar en este estudio?

No se prevé ningún riesgo adicional para usted ya que utilizaremos una muestra de sangre que le será extraída junto a su donación. El único riesgo previsible es el riesgo que conlleva el propio pinchazo, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar de extracción.

¿Cuáles son los beneficios de participar en este estudio?

Es muy posible que suponga poco valor diagnóstico para usted, pero podrá ayudar a la identificación de posibles moléculas útiles para el tratamiento y el diagnóstico de la enfermedad hepática crónica para la cual no existen tratamientos específicos ni efectivos.

¿Qué pasará si decido no participar en el estudio?

Su participación es totalmente voluntaria. En caso de que no quisiera participar, no modificará en absoluto su asistencia sanitaria. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en casa de duda?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto por los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación. Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, la Dra Nadezda Apostolova en el teléfono 96383767.

Confidencialidad

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su asistencia sanitaria serán tratados con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los donantes que han colaborado en la investigación.

Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador de este estudio.

¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?

Durante su participación en este estudio, se le extraerá una muestra de sangre. Esta muestra será siempre utilizada con fines científicos, pudiéndose utilizar si usted así lo autoriza en el marco de otros proyectos de investigación previamente evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico. Además, este material no será bajo ningún concepto motivo de lucro.