

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS TRANSPORTADORES HEPATOBILIARES E IDENTIFICACIÓN DE LOS ELEMENTOS DE RESPUESTA EN EL PROMOTOR DEL GEN *ORGANIC SOLUTE TRANSPORTER BETA* (*SLC51B*)

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO: Octavio Morante Palacios
TUTOR: Dr. Ramiro Jover Atienza
TUTOR ACADÉMICO: Dr. José Gadea Vacas

Curso Académico: 2016/2017

VALENCIA, 7 de julio del 2017

ABREVIATURAS

ATP: Adenosín trifosfato (del inglés, *adenosine triphosphate*)

BRIC: Colestasis intrahepática recurrente benigna (del inglés, *Benign recurrent intrahepatic cholestasis*)

BSA: Albúmina de suero bovino (del inglés, *bovine serum albumin*)

CA: Ácido cólico (del inglés, *cholic acid*)

CDCA: Ácido desoxicólico (del inglés, *chenodeoxycholic acid*)

cDNA: DNA complementario a un RNA mensajero (del inglés, *complementary DNA*)

Cp: punto de cruce (del inglés, *crossing point*)

DCA: Ácido desoxicólico (del inglés, *deoxycholic acid*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (del inglés, *deoxyribonucleic acid*)

JNK: Quinasas c-Jun N-terminal (*del inglés, c-Jun N-terminal kinases*)

LCA: Ácido litocólico (del inglés, *lithocholic acid*)

LETf: Factores de transcripción enriquecidos en hígado (del inglés, *Liver-enriched transcription factors*)

mRNA: RNA mensajero (del inglés, *messenger RNA*)

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, *phosphate buffered saline*)

PFIC: Colestasis intrahepática familiar progresiva (del inglés, *Progressive familial intrahepatic cholestasis*)

qRT-PCR: PCR en tiempo real cuantitativa (del inglés, *quantitative real-time PCR*)

RNA: Ácido ribonucleico (del inglés, *ribonucleic acid*)

SD: Desviación estándar (del inglés, *standard deviation*)

SEM: Error estándar de la media (del inglés, *standard error of the mean*)

GENES/PROTEÍNAS

ABCG5: *ATP-binding cassette sub-family G member 5*

ABCG8: *ATP-binding cassette sub-family G member 8*

ASBT: *Apical sodium-dependent bile acid transporter*

BAAT: *Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase*

BCRP/ABCG2: *Breast cancer resistance protein*

BSEP/ABCB11: *Bile salt export pump*

C/EBP α /CEBPA: *CCAAT enhancer binding protein alpha*

C/EBP β /CEBPB: *CCAAT enhancer binding protein beta*

CAR/NR1I3: *Constitutive androstane receptor*

CYP27A1: *Esterol 27-hidroxilasa mitocondrial (del inglés, sterol 27-hydroxylase)*

CYP7A1: *Colesterol 7 α -hidroxilasa (del inglés, cholesterol 7 alpha-hydroxylase)*

CYP8B1: *Esterol 12 α hidroxilasa microsomal (del inglés, sterol 12-alpha-hydroxylase)*

FGF19/FGFR4: *Fibroblast growth factor 19 / Fibroblast Growth Factor Receptor 4*

FIC1/ATP8B1: *Familial intrahepatic cholestasis type 1*

FOXA1: *Forkhead Box protein A1*

FXR/NR1H4: *Farnesoid X receptor*

HNF4 α /HNF4A: *Hepatocyte nuclear factor 4 α*

HSD3B7 : *3 β -hidroxi- Δ 5-C27-esteroide deshidrogenasa/isomerasa (del inglés, Hydroxy-Delta-5-Steroid Dehydrogenase)*

LRH-1/NR5A2: *Liver Receptor Homolog 1.*

LXR α /NR1H3: *Liver X Receptor alpha*

MDR1/ABCB1: *Multidrug resistance protein 1*

MDR3/ABCB4: *Multiple Drug Resistance 3*

MRP2/ABCC2: *Multidrug resistance protein 2*

MRP3/ABCC3: *Multidrug resistance protein 3*

MRP4/ABCC4: *Multidrug resistance protein 4*

NTCP/SLC10A1: *Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide*

OATP1A2/SLCO1A2: *Organic anion-transporting polypeptide 1A2*

OATP1B1/SLCO1B1: *Organic anion-transporting polypeptide 1B1*

OATP1B3/SLCO1B3: *Organic anion-transporting polypeptide 1B3*

OST α /SLC51A: *Organic solute transporter alpha*

OST β /SLC51B: *Organic solute transporter beta*

PGC1 α /PPARGC1A: *Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α*

PPAR α /PPARA: *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*

PXR/NR1I2: *Pregnane X receptor*

RXR α /RXRA: *Retinoid X receptor alpha*

SHP/NR0B2: *Small heterodimer partner*

SULT2A1: *Sulfotransferasa 2A1 (del inglés, sulfotransferase Family 2A Member 1)*

VDR/NR1I1: *Vitamin D Receptor*

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....
2. INTRODUCCIÓN.....	1
2.1. El hígado: anatomía y fisiología.....	1
2.2. Ácidos biliares: metabolismo y función.....	2
2.2.1. Metabolismo de ácidos biliares.....	3
2.2.2. Circulación enterohepática de ácidos biliares y ciclo colehepático.....	4
2.3. Transportadores hepatobiliares del hepatocito.....	6
2.3.1. Transportadores sinusoidales de entrada.....	7
2.3.1.1. NTCP.....	7
2.3.1.2. OATPs.....	8
2.3.2. Transportadores basolaterales de salida.....	9
2.3.2.1. MRP4.....	9
2.3.2.2. MRP3.....	9
2.3.2.3. OST α /OST β	10
2.3.3. Transportadores canaliculares.....	11
2.3.3.1. BSEP.....	11
2.3.3.2. ABCG5/ABCG8.....	11
2.3.3.3 MDR3.....	12
2.3.3.4. BCRP.....	12
2.3.3.5. MDR1.....	12
2.3.3.6. MRP2.....	12
2.4. Regulación de los transportadores hepatobiliares: factores de transcripción implicados.....	13
2.5. Patologías del transporte hepatobiliar: colestasis.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1. Cultivos celulares.....	17
4.2. Generación de los adenovirus.....	17
4.3. Infección de HepG2 con los adenovirus.....	18
4.4. Extracción de RNA y retrotranscripción.....	18
4.5. PCR en tiempo real: procedimiento y estadística.....	18
4.6. Clonación de los fragmentos del promotor de SLC51B.....	19
4.7. Preparación del DNA para la transfección en líneas celulares.....	20
4.8. Ensayos reporteros.....	21
4.9. Diseño de primers.....	22

5. RESULTADOS	22
5.1. Comparación de la expresión de los transportadores hepatobiliares y factores de transcripción entre hígado humano y HepG2.....	22
5.2. Inducciones y represiones de los transportadores hepatobiliares mediadas por los factores de transcripción.....	25
5.2.1. Transportadores sinusoidales de entrada.....	25
5.2.2. Transportadores sinusoidales de salida.....	26
5.2.3. Transportadores canaliculares.....	28
5.3. Análisis de los elementos de respuesta del promotor del gen SLC51B.....	34
5.4. Regulación de la síntesis de ácidos biliares mediada por C/EBP α y C/EBP β	38
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
6.1. Regulación de los transportadores sinusoidales de entrada.....	39
6.2. Regulación de los transportadores sinusoidales de salida.....	41
6.3. Regulación de los transportadores canaliculares.....	43
6.3.1. Transporte de ácidos biliares.....	43
6.3.2. Transporte de colesterol.....	43
6.3.3. Transporte de fosfolípidos.....	44
6.3.4. Transporte de bilirrubina.....	45
6.3.4. Transporte de fármacos.....	46
6.4. Estudio del promotor de SLC51B: localización de los elementos de respuesta a factores de transcripción.....	47
6.5. Implicaciones del papel de los C/EBP en la regulación de la biosíntesis y el transporte hepatobiliar.....	51
7. CONCLUSIONES	53
8. BIBLIOGRAFÍA	53
9. ANEXOS	60

1. RESUMEN

Los ácidos biliares son moléculas anfipáticas producidas en los hepatocitos a partir del colesterol, que facilitan la absorción intestinal de compuestos hidrofóbicos y actúan como reguladores metabólicos y moléculas de señalización. La circulación enterohepática de los ácidos biliares permite el reciclaje de los mismos y la eliminación de productos de deshecho. Este circuito está dirigido molecularmente por los transportadores hepatobiliares. La desregulación del transporte de los ácidos biliares se ha asociado con varias patologías, entre las que destaca la colestasis, que se define como la reducción o bloqueo del flujo biliar normal, de manera que se impide su llegada al duodeno. Una causa cada vez más frecuente de colestasis es el consumo de fármacos, que pueden alterar los transportadores, o los circuitos reguladores que los controlan. Por la abundante expresión hepática de múltiples receptores nucleares y *liver-enriched transcription factors*, y la elevada variabilidad poblacional en la expresión de los transportadores, hipotetizamos la existencia de multitud de circuitos reguladores actualmente no descritos. En el presente trabajo se ha estudiado, en HepG2 el impacto en la expresión génica de un grupo de transportadores hepatobiliares sinusoidales (NTCP, OATP1B1, OATP1B3, OATP1A2, MRP4, MRP3 y OST α /OST β) y canaliculares (BSEP, ABCG5/ABCG8, MDR3, MRP2, BCRP y MDR1) frente a la sobreexpresión de factores de transcripción de relevancia hepática (C/EBP α , C/EBP β , CAR, FOXA1, HNF4 α , LXR α , PGC1 α , PPAR α , PXR, RXR α y VDR), utilizando vectores adenovirales. Además, se han estudiado posibles sinergismos mediante la sobreexpresión combinada de varios factores. En total, hemos hallado 20 nuevas relaciones regulatorias de los transportadores hepatobiliares y confirmado 23 ya existentes en la bibliografía. En particular, hemos descrito un papel destacado de C/EBP α y C/EBP β en el control de la homeostasis de los ácidos biliares, desconocido hasta la fecha. En nuestro estudio, OST β ha sido el transportador que más ha respondido a la sobreexpresión de los factores de transcripción. Por ello, mediante ensayos reporteros de luciferasa en HepG2, con fragmentos del promotor de OST β (*SLC51B*), y análisis bioinformáticos con *position weight matrices*, hemos descrito la localización de los elementos de respuesta con los cuales interaccionan potencialmente los factores inductores (C/EBP α , C/EBP β , RXR α , LXR α , VDR, CAR, PXR y PGC1 α). Aportamos un modelo detallado de la regulación de OST β , proponiendo 5 nuevos elementos de respuesta (C/EBP, por duplicado, RXR α :RXR α , LXR α :RXR α y VDR:RXR α), y encontrando posibles interacciones no conocidas con los 2 ya descritos en la bibliografía (RAR α :RXR α y FXR α :RXR α). En suma, este estudio aporta una visión global de la regulación hepatobiliar y el análisis exhaustivo de los elementos de respuesta del promotor de *SLC51B*, que podrían contribuir al discernimiento de las bases moleculares de la colestasis.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El hígado: anatomía y fisiología

El hígado es un órgano fundamental presente en todos los organismos vertebrados. En los seres humanos es el órgano interno de mayor tamaño: representa aproximadamente el 2-3% de la masa corporal (Abdel-Misih *et al.*, 2010). Se divide en 2 lóbulos principales (derecho e izquierdo), separados por el ligamento falciforme, y otros dos lóbulos menores en la parte izquierda (cuadrado y caudado) (Figura 1). En su cara pósteroinferior, en el interior de la fosa cística, se aloja la vesícula biliar, que almacena la bilis generada en el hígado.

Las funciones fisiológicas del hígado son múltiples y singulares. Por una parte, tiene un papel central en el metabolismo energético. Se encarga de realizar la gluconeogénesis, el ciclo de la urea, la síntesis del colesterol y triacilglicéridos, y del almacenamiento de glucógeno, además de llevar a cabo procesos catabólicos como la glucogenólisis y lipólisis. Además, tiene una destacada función biosintética proteica, ya que produce, entre otras, proteínas del suero como la albúmina, las lipoproteínas, la transferrina y los factores de coagulación. También genera la bilis, que facilita la absorción de las grasas a nivel intestinal. Por otra parte, interviene en procesos inmunológicos como la síntesis de proteínas propias de la inmunidad innata (sistema del complemento, proteínas de fase aguda, etc.) (Jenne *and* Kubes, 2013; Bode *et al.*, 2012).

El hígado es el órgano central en el metabolismo de fármacos y otros xenobióticos. Aunque los riñones realizan la eliminación de la mayor parte de estos compuestos, es necesario que las moléculas pasen antes por un proceso de biotransformación hepática, volviéndolas más hidrofílicas. Existen dos fases

principales en este proceso. La fase I incluye la oxigenación o hidroxilación de compuestos mediada por isoformas del complejo citocromo P450, mientras que en la fase II intervienen transferasas que añaden grupos hidrofílicos, formando moléculas más solubles en agua, como sulfatos o glucurónidos (Dietrich *and* Geier, 2014). Además, parte de la excreción de estos xenobióticos se produce directamente a través de la bilis (Trauner *and* Boyer, 2003).

El sistema circulatorio hepático presenta una configuración dual. Aproximadamente el 75% de la sangre que entra en el hígado lo hace a través de la vena porta. Esta sangre es rica en nutrientes y viaja desde el tracto gastrointestinal (Arias *et al.*, 2009). En este punto, los macrófagos residentes en el hígado (células de Kupffer), así como las células NK y otras células del sistema inmune, fagocitan o destruyen todo cuerpo extraño o microorganismo para evitar que lleguen al torrente sanguíneo (Jenne *and* Kubes, 2013).

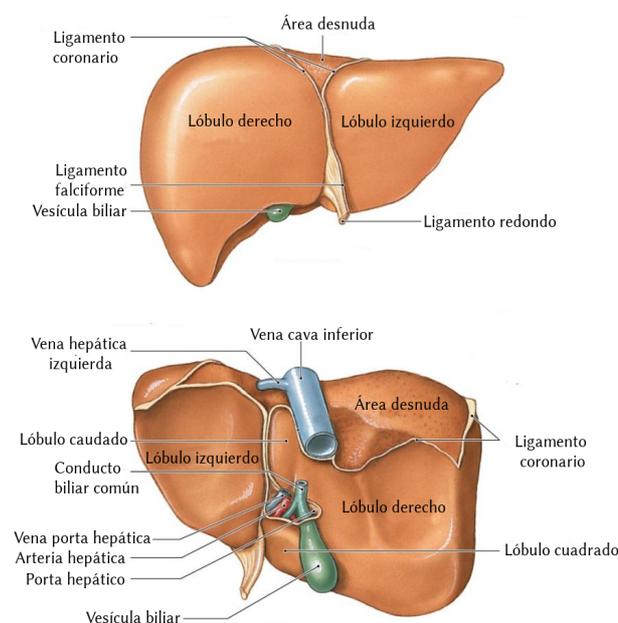


Figura 1: Anatomía del hígado por sus dos caras. Se muestran los elementos anatómicos más representativos del hígado, incluida la vesícula biliar y los principales vasos sanguíneos. Imagen adaptada de la editorial Pearson Education Inc. (2011).

Por su parte, el 25% restante lo aporta la arteria hepática desde la circulación general sanguínea. La única vía sanguínea eferente la constituyen las venas hepáticas.

Los hepatocitos, que suponen el 80% de la población celular del hígado, realizan las funciones características del órgano. La unidad funcional del hígado a escala histológica es el lobulillo hepático (Figura 2). Su forma es un prisma hexagonal, con una vena central, con hepatocitos dispuestos en filas de manera alineada (Adams *et al.*, 2006). Estas células están en contacto con el espacio perisinusoidal, también conocido como el espacio de Disse, el cual está separado de los sinusoides (capilares especializados muy permeables) por las células endoteliales, que poseen fenestraciones y carecen de membrana basal. La unión entre hepatocitos forma los canaliculos biliares, unos conductos muy pequeños que confluyen en ca-

nales biliares de cada vez mayor tamaño, revestidos por colangiocitos. Estos canaliculos están aislados de la sangre gracias a uniones estrechas. Al final, acaban convergiendo en un conducto común que se une al conducto cístico, procedente de la vesícula biliar, hasta entrar en el duodeno (Tahibian *et al.*, 2013).

2.2. Ácidos biliares: metabolismo y función

Los ácidos biliares son una clase diversa de moléculas anfipáticas, solubles en agua y derivadas del colesterol que se sintetizan en los hepatocitos. Juegan un papel fundamental facilitando la secreción hepatobiliar de metabolitos endógenos y xenobióticos así como en la absorción de las grasas de la dieta, vitaminas hidrofóbicas y fármacos (Chiang, 2009). Su acción surfactante permite la emulsión de las grasas, y otras moléculas hidrofóbicas en el quimo.

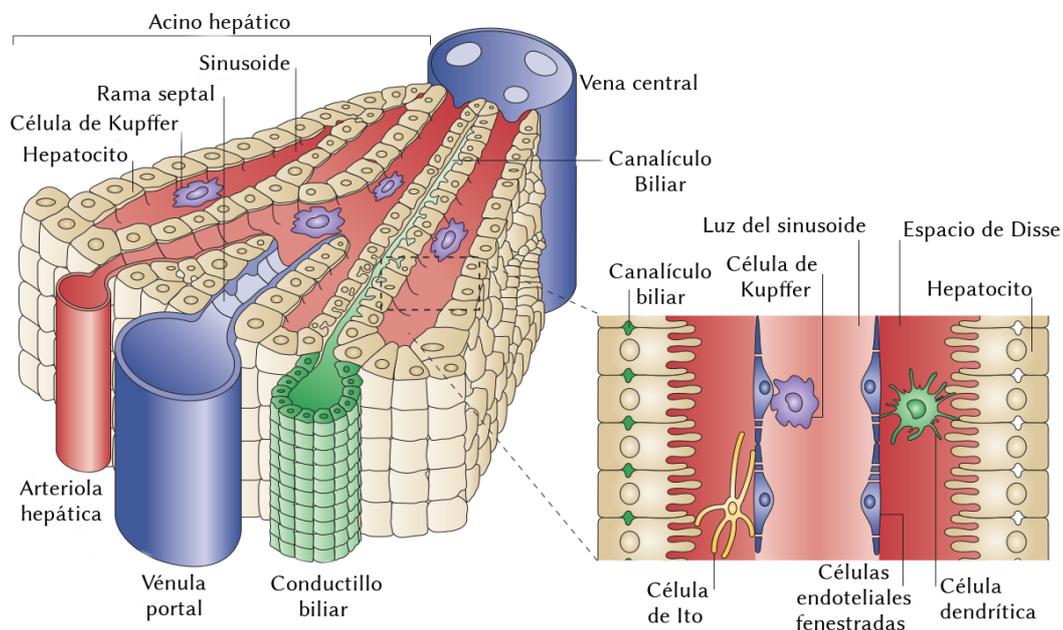


Figura 2: Representación gráfica del lobulillo hepático. En la imagen se observa la estructura tridimensional básica de una porción longitudinal de un lobulillo hepático. En el sinusoide se mezcla la sangre de la circulación general, proveniente de la arteriola hepática, con la sangre portal, proveniente de la vénula portal. Existe un gradiente a lo largo del sinusoide, de manera que los hepatocitos más próximos a la vénula portal (periportales) presentan características funcionales y de expresión génica diferentes con respecto a los hepatocitos más próximos a la vena central (perivenosos). Imagen adaptada de Adams *et al.*, 2006.

Además, también son moléculas de señalización, con funciones paracrinas y endocrinas, principalmente en la regulación metabólica (Chiang, 2013).

En condiciones fisiológicas, los ácidos biliares suelen presentarse en forma de sales sódicas o potásicas. Son el componente orgánico principal de la bilis, donde forman micelas mixtas junto con el colesterol y fosfolípidos como la fosfatidilcolina. Este fluido, que también contiene agua y sales inorgánicas, se almacena en la vesícula biliar, para ser secretado cuando se necesite en el tracto intestinal, facilitando la digestión y absorción de nutrientes. Por otra parte, la bilis también contiene bilirrubina, el producto de deshecho de la hemoglobina (Gonzalez, 2012).

2.2.1. Metabolismo de ácidos biliares

La síntesis de los ácidos biliares es especialmente costosa a nivel energético e implica 17 pasos enzimáticos (Figura 3). Por ello, existen mecanismos para su reciclaje (Sección 2.2.2). Sin embargo, la progresiva degradación de los mismos y el pequeño porcentaje de moléculas que no se reabsorbe, y se excreta en las heces, debe ser reemplazado mediante biosíntesis *de novo* (Li and Chiang, 2013).

Los ácidos biliares se sintetizan a partir del colesterol de manera exclusiva en el hígado (Chiang, 2009). El ácido cólico (CA, del inglés *cholic acid*) y el ácido quenodesoxicólico (CDCA, del inglés *chenodeoxycholic acid*) son los dos ácidos biliares primarios en humanos. Existen dos rutas biosintéticas principales de ácidos biliares: la clásica y la alternativa, aunque han sido descritas otras cuantitativamente menores que pueden ser de importancia bajo ciertas condiciones (Axelson *et al.*, 2000).

La vía clásica supone el 90% de la síntesis total y se conoce también como la ruta neutra,

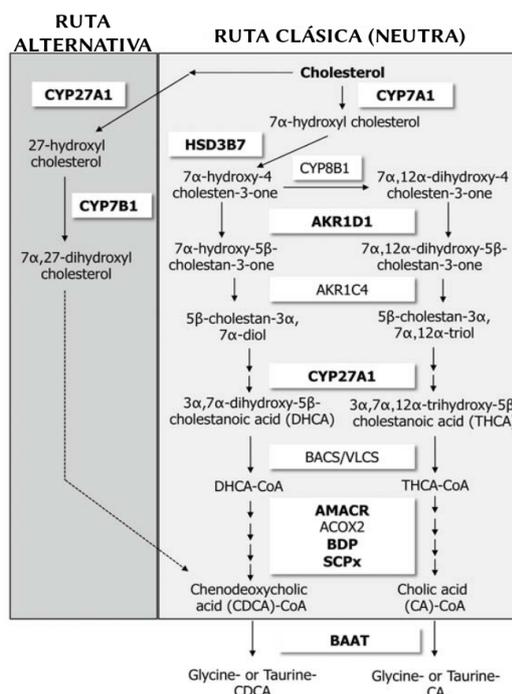


Figura 3: Esquema de las dos rutas principales de biosíntesis de ácidos biliares. Las enzimas en negrita representan aquellas para las que se ha descrito una deficiencia genética. Imagen adaptada de Marin *et al.*, 2016

debido a que sus metabolitos intermediarios son esteroides neutros. La ruta comienza en el retículo endoplasmático de los hepatocitos con la enzima CYP7A1 (Colesterol 7 α -hidroxilasa), un citocromo microsomal que cataliza la fase limitante de la ruta biosintética, transformando el colesterol en 7 α -hidroxicolesterol. Posteriormente, esta molécula se transforma en 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one por otra enzima microsomal, la 3 β -hidroxi- Δ 5-C27-esteroide deshidrogenasa/isomerasa (HSD3B7).

La síntesis de CA requiere la hidroxilación del compuesto anterior, llevado a cabo por la enzima CYP8B1 (esterol 12 α hidroxilasa microsomal). De esta manera, regula el ratio entre el CA y el CDCA, que en condiciones fisiológicas es de 1:1 en humanos (Li and Chiang, 2013). Posteriormente, el 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one y el 7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholesten-3-one, precursores del CDCA y el CA respectivamente, se someten a otras 9 reacciones enzimáticas

hasta dar lugar a los ácidos biliares libres. El paso final es la conjugación del ácido carboxílico de la cadena terminal con los aminoácidos glicina o taurina, llevado a cabo por la aminoácido N-aciltransferasa (BAAT), que es una enzima mayoritariamente peroxisomal (Pellicoro *et al.*, 2007).

Por su parte, CYP27A1 (esterol 27-hidroxilasa mitocondrial) inicia la ruta alternativa, también conocida como ruta ácida, ya que en sus metabolitos intermediarios la oxidación de la cadena lateral del colesterol precede a la modificación del anillo esteroide. Tras formar 27-hidroxicolesterol a partir del colesterol, se transforma a 7 α ,27-dihidroxicolesterol gracias a la oxisterol 7 α -hidroxilasa microsomal (CYP7B1). Varias reacciones posteriores producen CDCA, que puede conjugarse de la manera descrita anteriormente. Varias enzimas de esta fase se expresan también en tejidos extrahepáticos, pero tan solo el hígado presenta la ruta completa (Marin *et al.*, 2016).

En humanos, el ratio de conjugados de taurina frente a los de glicina es de 1:3, mientras que en ratones la mayor parte de ácidos biliares (95%) están conjugados con taurina (Li *and* Chiang, 2012). Estos ácidos biliares conjugados en el hígado se denominan ácidos biliares primarios. Mientras que el pKa de los ácidos biliares libres es de entre 5 y 6,5, las formas conjugadas tienen un pKa entre 1 y 4. Esto permite que los ácidos biliares conjugados estén mayoritariamente en forma desprotonada (aniónica) en el duodeno, lo cual aumenta su solubilidad a ese pH ácido, minimiza la absorción pasiva y previene la digestión por parte de las enzimas pancreáticas del intestino.

Posteriormente, en el intestino delgado y en el colon, ciertas bacterias, principalmente de los géneros *Staphylococcus* y *Lactobacillus*, son

capaces de desconjugar y deshidroxilar los ácidos biliares primarios, formando los ácidos biliares secundarios. Algunos de los más representativos son el ácido desoxicólico (DCA, del inglés *deoxycholic acid*), producido a partir del CA, y el ácido litocólico (LCA, del inglés *lithocholic acid*), producido a partir del CDCA.

Estos ácidos biliares secundarios son hidrofóbicos y muy citotóxicos (Vogel *et al.*, 2012). Una parte se excreta en las heces y otra se re-conjuga y detoxifica en los hepatocitos. La sulfatación llevada a cabo por la sulfotransferasa SULT2A1 es la ruta principal para la detoxificación de ácidos biliares hidrofóbicos en humanos (Hofmann, 2004).

2.2.2. Circulación enterohepática de ácidos biliares y ciclo colehepático

En personas sanas, la concentración basal de ácidos biliares en sangre periférica es inferior a 10 μ M, mientras que en la bilis es del orden de mM (Marin *et al.*, 2015). Los ácidos biliares se mantienen confinados en la circulación enterohepática, que comprende el hígado, el sistema de conductos biliares, el intestino, la vena porta y la vesícula biliar, donde se alcanza la concentración máxima (50-100mM). Este sistema permite el reciclaje de los ácidos biliares, cuya biosíntesis supone un gran coste energético, así como la eliminación de fármacos y moléculas de deshecho como la bilirrubina.

Los conductos biliares constituyen una red tridimensional de vasos de varios tamaños y propiedades que se dividen funcional y anatómicamente en 2 compartimentos diferenciados, intrahepático y extrahepático (Lemaigre, 2009). Los más pequeños son los canalículos biliares, que están formados por hepatocitos alineados. Posteriormente, los canales de Hering representan la transición anatómica y fisiológica entre estos canalículos, formados por hepatoci-

tos, y el resto de canales biliares, de mayor tamaño, tapizados por colangiocitos.

Los colangiocitos son una población heterogénea de células epiteliales cuya función fisiológica principal consiste en la modificación de la composición de la bilis a medida que se transporta por los canales, así como su movilización a lo largo de la red biliar. Esta modificación es posible mediante procesos de secreción y absorción de diferentes moléculas a través de su membrana canalicular (Tabibian *et al.*, 2013). Los colangiocitos están unidos entre sí mediante uniones estrechas en sus membranas apicales así como uniones comunicantes entre células adyacentes (Bode *et al.*, 2002). Cada colangiocito posee un único cilio primario capaz de actuar como sensor y transmitir señales que modifiquen la función celular (Huang *et al.*, 2006).

La formación de bilis requiere de la cooperación de los hepatocitos y los colangiocitos. El primer paso consiste en la síntesis y secreción de los ácidos biliares primarios en los canalículos biliares por parte de los hepatocitos. Para ello, existen transportadores especializados en la membrana canalicular de los mismos capaces de impulsar la salida de los ácidos biliares en contra de gradiente. BSEP (del inglés, *Bile salt export pump*) es la principal proteína con esta función (Sección 2.3.2).

La entrada de ácidos biliares en los canalículos también conlleva el paso de agua e iones sodio por vía paracelular, debido a la ósmosis. Este proceso se denomina flujo biliar dependiente de ácidos biliares, y es la principal fuerza impulsora en la formación de la bilis. En este punto, también se produce secreción de otros componentes de la bilis como el colesterol o los fosfolípidos mediante otros transportadores (Sección 2.3.3).

Por otra parte, en su paso a través de la red de canales biliares se produce principalmente secreción de iones cloruro y bicarbonato por parte de los colangiocitos, así como glutatión reducido. Esto regula el pH del fluido e impulsa la entrada de agua por ósmosis, en un proceso denominado secreción biliar independiente de ácidos biliares (Tabibian *et al.*, 2013).

Además, también se dan fenómenos de absorción por parte de los colangiocitos, principalmente de aminoácidos, glucosa y ciertos ácidos biliares. En este sentido, existe una ruta denominada ciclo colehepático (del inglés, *cholehepatic shunt*) en la cual los ácidos biliares libres, secretados por los hepatocitos en forma aniónica, se protonan en la bilis, volviéndose más hidrofóbicos, y difunden pasivamente al citoplasma de los colangiocitos a través de sus membranas canaliculares (Jones *et al.*, 2015; Tabibian *et al.*, 2013).

Estas moléculas son transportadas al plexo capilar peribiliar, el conjunto de vasos sanguíneos que rodean los conductos biliares, para ser devueltos finalmente a los sinusoides hepáticos, donde serán transportados hacia el interior de los hepatocitos (Figura 4). Como resultado de esta absorción, cada vez que una molécula se somete a este ciclo se produce un ion bicarbonato, de manera que aumenta la presión osmótica (Alpini *et al.*, 2013). Este ciclo, por tanto, podría explicar el aumento del flujo biliar que se produce por la acción de ácidos biliares libres como el ursodesoxicólico (UDCA, del inglés, *ursodeoxycholic acid*), el cual se ha explotado farmacológicamente contra las colangiopatías y la colestasis.

Los ácidos biliares conjugados también pueden formar parte de este ciclo en ciertas condiciones, que implican la acción del transporte activo llevado a cabo por la proteína

ASBT (del inglés, *Apical sodium-dependent bile acid transporter*) (Alpini *et al.*, 2013).

Finalmente, la bilis se acumula en la vesícula biliar y se libera en la digestión, llegando hasta el duodeno. En el tracto intestinal realiza su función emulsionante de grasas. Parte de los ácidos biliares primarios se transforman por la microbiota, dando lugar a los ácidos biliares secundarios. En el íleon, existen células especializadas denominados enterocitos que absorben activamente los ácidos biliares de manera muy eficaz (aproximadamente el 95%), gracias, principalmente, al transportador ASBT. Posteriormente, los reincorporan a la circulación portal a través del transportador dimérico OST (del inglés, *Organic solute trans-*

porter), hasta llegar al espacio perisinusoidal, donde vuelven a entrar en los hepatocitos por la membrana basolateral, gracias a transportadores como NTCP (del inglés, *Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide*), cerrando así el circuito, extremadamente eficiente en humanos, conocido como circulación enterohepática de los ácidos biliares (Marin *et al.*, 2016) (Figura 4).

2.3. Transportadores hepatobiliares del hepatocito

Los hepatocitos son células epiteliales polarizadas que poseen dos dominios de membrana claramente diferenciados: canalicular/apical y sinusoidal/basolateral (Trauner *and* Boyer, 2003).

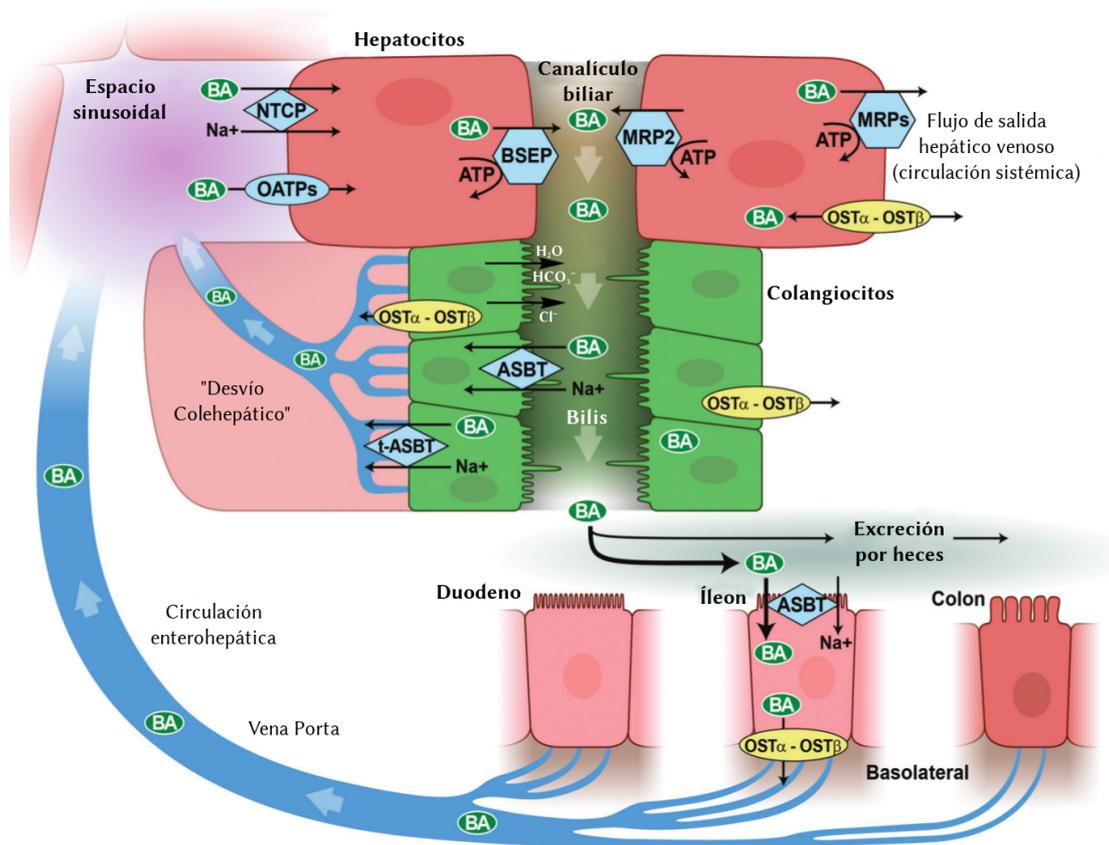


Figura 4: Circulación enterohepática y ciclo colehepático. Los ácidos biliares se sintetizan en los hepatocitos y se secretan en el canalículo biliar. En el trayecto por las vías biliares, los colangiocitos modifican la composición de la bilis y devuelven parte de los ácidos biliares a los hepatocitos por el ciclo colehepático. El resto continúa hasta el intestino. En el íleon se reabsorbe el ~95% de los ácidos biliares, que son devueltos al hígado mediante la circulación portal. Imagen adaptada de Tabibian *et al.*, 2013.

El primero está en contacto con el canalículo biliar mientras que el segundo está en contacto con el espacio perisinusoidal y, por tanto, con la circulación sanguínea, a través de las fenestraciones de las células endoteliales sinusoidales. Ambas membranas difieren en su composición bioquímica y características funcionales, y están separadas una de otra, de tal manera que se mantienen los gradientes de concentración entre la sangre y la bilis (Dawson *et al.*, 2009).

Esta polarización también es clave en el funcionamiento de la circulación enterohepática, ya que permite una captación eficaz de los ácidos biliares a través de la membrana sinusoidal y una posterior secreción de los mismos por la membrana canalicular en contra de gradiente (la concentración de ácidos biliares en el canalículo es 3 órdenes de magnitud mayor que la que hay en el citoplasma del hepatocito) (Stieger *et al.*, 1992).

Por otra parte, el transporte de ácidos biliares está estrechamente interrelacionado con el metabolismo y transporte de xenobióticos. Muchos transportadores, como veremos en los próximos apartados, no tienen una afinidad única por los ácidos biliares, sino que también pueden movilizar medicamentos hacia el interior de los hepatocitos y exportarlos a través del canalículo biliar.

Algunos de estos transportadores se expresan exclusivamente en los hepatocitos, mientras que otros también se encuentran en la membrana de los enterocitos, colangiocitos y células renales. La fina regulación de esta red de transportadores es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis hepática y biliar. A continuación, vamos a exponer las características de los principales transportadores hepatobiliares de los hepatocitos (Figura 5).

2.3.1. Transportadores sinusoidales de entrada

2.3.1.1. NTCP

La entrada de ácidos biliares conjugados en los hepatocitos, a través de la membrana sinusoidal, ocurre en un ~90% gracias al transportador NTCP, codificado en humanos por el gen *SLC10A1* (Halilbasic *et al.*, 2013). Su alta expresión en la membrana sinusoidal y afinidad por los ácidos biliares conjugados permite la extracción de los mismos de la sangre portal de manera muy efectiva, manteniendo su concentración plasmática al mínimo. Se expresa de manera uniforme a lo largo de todo el lobulillo hepático (Stieger *et al.*, 1994)

Es una glicoproteína de membrana de 349 aminoácidos, que realiza un cotransporte electrogénico de ácidos biliares y Na^+ . Es decir, cada ácido biliar entrante es acompañado por 2 iones de sodio (Weinman, 1997). Por tanto, la energía de este sistema la aporta el gradiente transmembrana de Na^+ mantenido por la bomba sodio-potasio. Este transporte es unidireccional, de manera que solo funciona de fuera a dentro de la célula.

NTCP tiene preferencia por ácidos biliares conjugados, especialmente por el ácido taurocólico (CA conjugado con taurina), pero también transporta ácidos biliares libres, en menor medida. Se estima que realiza menos de la mitad de la captación de estos ácidos biliares sin conjugar (Van Dyke *et al.*, 1982).

También interactúa con varios esteroides y fármacos como las estatinas, la bromosulfotaleína, la estrona-3-sulfato, la dehidroepiandrosterona así como otros compuestos covalentemente unidos a la taurina (Trauner *and* Boyer, 2003).

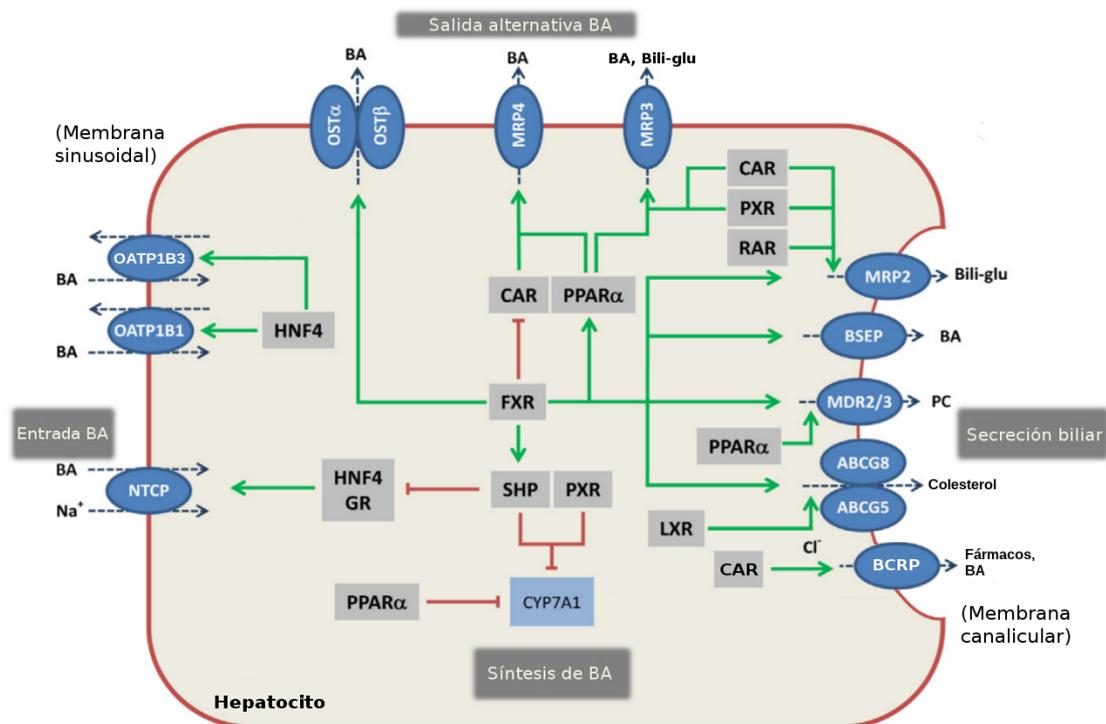


Figura 5: Principales transportadores hepatobiliares en el hepatocito. Los hepatocitos expresan una compleja red de transportadores en sus membranas sinusoidales y canaliculares. Para propiciar el balance entre la síntesis, la importación y la secreción de los ácidos biliares, la expresión de estas proteínas está finamente regulada por los factores de transcripción. Teniendo en cuenta que los ácidos biliares son potencialmente citotóxicos, esta regulación tiene relevancia para la supervivencia de la propia célula. En la imagen se muestra algunos de los transportadores hepatobiliares y receptores nucleares más relevantes. Las líneas rojas representan una represión, y las verdes una inducción. Imagen adaptada de Halilbasic et al., 2013.

2.3.1.2. OATPs

Si NTCP es la proteína representativa de la captación de ácidos biliares dependiente de iones sodio, las proteínas clasificadas dentro del grupo de las OATP (del inglés, *Organic anion-transporting polypeptides*) representan la captación de ácidos biliares independiente de iones sodio.

Los OATP son transportadores con un amplio rango de preferencia por sustratos, generalmente anfipáticos: ácidos biliares conjugados y libres, bilirrubina, micotoxinas, péptidos lineales y circulares así como numerosos fármacos (Meier et al., 1997). Teniendo en cuenta la gran afinidad de NTCP por los ácidos biliares conjugados, esta familia de transportadores tiene un papel más destacado en el transporte de ácidos biliares libres.

La mayoría de sustratos de los OATP son aniones. En consecuencia, su transporte a través de la membrana plasmática, que tiene un potencial eléctrico de aproximadamente -35mV en hepatocitos, es desfavorable energéticamente (Boyer et al., 1992).

Existe cierta controversia con respecto a la fuerza impulsora del transporte mediado por los OATP. Está descrito que es independiente de ATP y de Na^+ , pero todavía no se conoce el mecanismo exacto. Sin embargo, se ha hipotetizado que puede basarse en un sistema de intercambio aniónico. Está descrito que, en algunos casos, el bicarbonato es el anión que estos transportadores expulsan al exterior de la membrana plasmática cuando importa el sustrato (Satlin et al., 1997).

La familia OATP humana se compone de 11 proteínas de 650-700 aminoácidos, pero no todas están implicadas en el transporte de ácidos biliares. OATP1B1 y OATP1B3 (codificados por los genes *SLCO1B1* y *SLCO1B3*, respectivamente) son dos miembros de esta familia que se expresan de manera exclusiva en el hígado. OATP1B3 presenta una homología en la secuencia aminoacídica del 80% con respecto a OATP1B1. Aunque generalmente se considera que el transporte llevado a cabo por estas proteínas es electroneutro, se ha descrito la entrada neta de carga negativa, lo cual pone en duda el modelo del intercambio aniónico y sugiere una traslocación electrogénica (Stieger and Hagenbuch, 2014; Martinez-Becerra *et al.*, 2011).

Por su parte, OATP1A2 (codificado por el gen *SLCO1A2*) es un transportador ubicuo que se expresa tanto en el hígado como en el cerebro, los riñones y el intestino (Glaeser *et al.*, 2007). Su expresión hepática es mínima con lo que se cree que tiene un papel menor en el transporte de ácidos biliares (Halilbasic *et al.*, 2013).

2.3.2. Transportadores basolaterales de salida

Según hemos explicado en los apartados anteriores, en condiciones fisiológicas, lo habitual es que los hepatocitos capten los ácidos biliares a través de la membrana sinusoidal y los exporten por la membrana canalicular, para llevar a cabo la circulación enterohepática (Sección 2.2.2). Sin embargo, existen transportadores alternativos en la membrana sinusoidal, capaces de transportar los ácidos biliares en sentido opuesto, es decir, expulsándolos hacia la circulación sanguínea.

En líneas generales, este tipo de transporte tan solo tiene relevancia en situaciones patoló-

gicas, como puede ser una acumulación anormal de ácidos biliares en los hepatocitos. Cuando esto ocurre, estas moléculas pueden ser transportadas por la sangre hasta los riñones para su excreción por la orina.

2.3.2.1. MRP4

La proteína MRP4 (codificada por el gen *ABCC4*) es un miembro de la subfamilia C de los transportadores ABC (del inglés, *ATP-binding cassette*). Presenta una estructura de 1325 aminoácidos, con dos dominios de anclaje a la membrana, conteniendo cada uno de ellos 6 hélices transmembrana con 2 dominios de unión de ATP (Russel *et al.*, 2008).

La principal característica de este transportador es su amplio abanico de sustratos, tanto compuestos endógenos (hormonas, urato, eicosanoides, ADP, cAMP...) como xenobióticos (fármacos antivirales, cefalosporinas, diuréticos, compuestos citotóxicos...) (Russel *et al.*, 2008). En cuanto a los ácidos biliares, es capaz de transportar todo tipo de compuestos libres y conjugados con taurina o glicina. Además, transporta ácidos biliares sulfatados con mayor afinidad (Halilbasic *et al.*, 2013). Generalmente, cotransporta glutatión reducido junto con los ácidos biliares (Rius *et al.*, 2003).

Se expresa en la membrana sinusoidal de los hepatocitos, donde es capaz de expulsar estas moléculas desde el citoplasma hacia la sangre utilizando la hidrólisis de ATP como fuente energética. Por tanto, como el resto de proteínas de este grupo, tiene una relevancia especial en situaciones patológicas de acumulación de moléculas citotóxicas, de manera que se induce la expresión en dichas situaciones (Gradhand *et al.*, 2008)

2.3.2.2. MRP3

MRP3 es un transportador de 1527 aminoácidos codificado, en humanos, por el gen

ABCC3. También es un miembro de la subfamilia C de los transportadores ABC con 18 dominios transmembrana, que en los hepatocitos está anclado en la membrana sinusoidal. Su nivel basal de expresión en estas células es muy bajo, aunque es algo mayor en los hepatocitos periportales. Se expresa, en mayor medida, en la membrana basolateral de los colangiocitos (Borst *et al.*, 2007).

Sus sustratos preferentes son compuestos conjugados con el ácido glucurónico, como es el caso del diglucurónido de bilirrubina. Sin embargo, también actúa transportando ácidos biliares sulfatados y conjugados con aminoácidos. Se ha descrito la inducción de la expresión de esta proteína cuando hay un bloqueo en la ruta canalicular de secreción de aniones orgánicos (Borst *et al.*, 2007). Al igual que MRP4, la actividad de MRP3 es dependiente de ATP, pero no se detecta cotransporte de glutatión reducido (Zelcer *et al.*, 2001)

2.3.2.3. *OSTα/OSTβ*

OSTα y *OSTβ* (del inglés, *Organic solute transporter*) son dos proteínas codificadas por los genes *SLC51A* y *SLC51B*, respectivamente. Ambos genes están situados en cromosomas diferentes y no presentan homología de secuencia entre ellos (Ballatori *et al.*, 2009). Sin embargo, se precisa la heterodimerización de ambos componentes para dar lugar al complejo transportador funcional (Li *et al.*, 2007).

Aunque se expresan en casi todos los tejidos, son más abundantes en aquellos relacionados con la homeostasis de ácidos biliares y esteroides (Ballatori *et al.*, 2009). Generalmente, los niveles de expresión de *OSTα* correlacionan con los de *OSTβ*. Se han encontrado niveles altos de los correspondientes mRNA en el intestino delgado, el hígado, riñón, testículos, ovarios, próstata, glándula

mamaria, tiroides y cerebro, lo cual concuerda con su papel relacionado con el transporte de esteroides (Seward *et al.*, 2003). En cuanto a los tipos celulares relevantes en la circulación enterohepática, este transportador se sitúa en la membrana basolateral de los hepatocitos, los colangiocitos y los enterocitos (Ballatori *et al.*, 2005).

En este sentido, *OSTα/OSTβ* es el principal transportador que permite la salida de los ácidos biliares desde los enterocitos a la circulación portal, lo cual es un paso crítico en la circulación enterohepática. Además, por su papel en los colangiocitos, actúa en el ciclo colehepático (Sección 2.2.2).

A diferencia de las proteínas descritas en secciones anteriores, *OSTα/OSTβ* es un transportador pasivo, independiente de Na^+ y de ATP. Su mecanismo se basa en una difusión facilitada, de manera que los sustratos entran o salen de la célula en función de su gradiente electroquímico (Ballatori *et al.*, 2005). Por tanto, en los hepatocitos puede actuar en la expulsión alternativa de los ácidos biliares por la membrana basolateral, principalmente cuando hay una acumulación anormal de ácidos biliares, que son citotóxicos a altas concentraciones.

OSTα es una proteína de 340 aminoácidos y 7 dominios transmembrana mientras que *OSTβ* tiene tan solo 128 aminoácidos y un único dominio transmembrana. Sus sustratos incluyen el ácido taurocólico así como otros esteroides como la digoxina, la prostaglandina E_2 y la estrona-3-sulfato (Wang *et al.*, 2001)

Curiosamente, el hígado humano expresa una cantidad considerable a nivel de mRNA y proteína de *OSTα* y *OSTβ*, mientras que en el hígado murino ambas proteínas se expresan de manera muy escasa (Ballatori *et al.*, 2005). Sin

embargo, la función de las proteínas está muy conservada entre las dos especies. La coincidencia en la secuencia de aminoácidos de OST α y OST β con sus homólogas murinas es del 83% y del 62%, respectivamente. Además, se han generado diferentes híbridos con combinaciones de las proteínas humanas, de ratón y de *Leucoraja erinacea*, un pez, dando todas ellas un nivel de transporte muy similar (Seward *et al.*, 2003).

Por otra parte, en humanos, la expresión de OST β es más baja que la de OST α . Como en oocitos de *Xenopus laevis* se comprobó que 0,1 ng de cRNA de OST β , junto con 1ng de cRNA de OST α , era suficiente para rendir el máximo nivel de actividad (y no al revés), se hipotetizó un posible papel de OST β como chaperona, con funciones más amplias en otros tejidos (Wang *et al.*, 2001).

Posteriormente, se ha descrito que la estabilidad de OST β depende de la presencia de OST α . Por ejemplo, los ratones con el gen de OST α deletado no presentan niveles detectables de proteína OST β , a pesar de tener el mismo nivel del mRNA (Li *et al.*, 2007). Además, se han realizado varios experimentos que indican que es necesario la interacción de ambas proteínas para su paso al aparato de Golgi, glicosilación y exportación a la membrana plasmática (Li *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007; Dawson *et al.*, 2005).

Todo ello pone de manifiesto que, probablemente, la función de OST β está exclusivamente ligada a OST α con lo que no parece probable que actúe como chaperona en otros contextos moleculares. Otra posibilidad que explicaría el experimento en *Xenopus* sería una estequiometría del complejo diferente a 1:1 pero, por el momento, no se ha establecido esta característica (Li *et al.*, 2007).

2.3.3. Transportadores canaliculares

2.3.3.1. BSEP

La proteína BSEP (del inglés, *Bile salt export pump*) está codificada por el gen *ABCB11* y es el transportador de la membrana canalicular del hepatocito por excelencia, que lleva a cabo la mayor parte de la secreción de ácidos biliares hacia el canaliculo biliar. Pertenece a la superfamilia ABC y su estructura está formada por 1321 aminoácidos con dominios transmembrana y dominios requeridos para la unión y la hidrólisis del ATP, que necesita para la secreción en contra de gradiente (Byrne *et al.*, 2002). Su correcto funcionamiento requiere unas características fisicoquímicas concretas en la membrana, y eso depende en parte de la función de la flipasa denominada FIC1 (del inglés, *Familial intrahepatic cholestasis type 1*, gen *ATP8B1*) (Marin *et al.*, 2016).

Su sustrato preferente son los ácidos biliares conjugados con aminoácidos (monovalentes), pero también se ha descrito la interacción con fármacos como el taxol (Halilbasic *et al.*, 2013). Por su parte, la proteína tiene baja afinidad por los ácidos biliares libres (Carlton *et al.*, 2003).

2.3.3.2. ABCG5/ABCG8

ABCG5 forma un heterodímero junto con ABCG8 que se localiza en la membrana canalicular de los hepatocitos, también conocido como esterolina. Los respectivos genes se sitúan partiendo de la misma localización en el genoma, en sentidos opuestos con tan solo 160 bases de región intergénica. La estructura de ABCG5/ABCG8 está formada por 673 y 651 aminoácidos, respectivamente. Ambos productos génicos están estrechamente relacionados y se creen que derivan del mismo gen (Hazard and Patel, 2007)

Su función fisiológica en el hepatocito se basa en la exportación del colesterol, y ciertos

esteroles vegetales, hacia la circulación biliar, utilizando la hidrólisis del ATP como fuente de energía. También se expresa en otros tejidos que requieren el transporte de esta molécula, como el intestino delgado, los riñones y los adipocitos.

2.3.3.3 MDR3

La proteína MDR3 (del inglés, *Multiple Drug Resistance 3*) está codificada por el gen *ABCB4*. Es una flipasa de 1286 aminoácidos, ubicada en la membrana canalicular de los hepatocitos, que permite la exportación de la fosfatidilcolina, un componente de la bilis, al canalículo biliar (Trauner and Boyer, 2003). Su homóloga en ratones se denomina *Mdr2*.

A pesar de su denominación, no se ha descrito que MDR3 confiera resistencia a fármacos, y no transporta otros sustratos a niveles apreciables. Sin embargo, su desregulación producida por fármacos es un mecanismo importante en la colestasis y otras patologías relacionadas debido a la relevancia de los fosfolípidos en la bilis (Dietrich and Geier, 2014).

2.3.3.4 BCRP

El transportador BCRP (del inglés, *Breast cancer resistance protein*), también conocido como BCRP1, está codificado por el gen *ABCG2*. Teniendo en cuenta su condición como miembro de la clase G de la superfamilia ABC, para realizar su función forma un homodímero u homotetrámero que requiere ATP para su funcionamiento (Kage *et al.*, 2002) Se expresa en la barrera hematoencefálica, el colon, intestino delgado y en la membrana canalicular de los hepatocitos.

Su principal función es el transporte de xenobióticos, incluyendo compuestos hidrofóbicos, aniones orgánicos y moléculas conjugadas. Esto incluye, por ejemplo, varios

fármacos quimioterápicos (Robey *et al.*, 2009). Por otra parte, se cree que también es capaz de exportar ácidos biliares conjugados hacia el canalículo biliar. Sin embargo, al ser la expresión de *ABCG2* en el hepatocito 2 órdenes de magnitud menor que *ABCB11* (BSEP), no parece probable que en condiciones fisiológicas pueda tener un papel destacado en esta función, aunque no se descarta que sea más relevante en otros tejidos (Blazquez *et al.*, 2012; Serrano *et al.*, 2007).

2.3.3.5 MDR1

Al igual que el transportador anterior, MDR1 (del inglés, *Multidrug resistance protein 1*), también conocida como P-glicoproteína, tiene una especial relevancia en la expulsión de xenobióticos. Su especificidad es amplia e incluye una gran variedad de compuestos catiónicos hidrofóbicos, complementando el espectro de acción de BCRP. Es una proteína de 1280 aminoácidos, codificada por el gen *ABCB1*, cuya función depende de la hidrólisis de ATP (Aller *et al.*, 2009)

Se expresa en órganos y tejidos tales como la barrera hematoencefálica, el intestino, los riñones y el hígado. Concretamente, en los hepatocitos se sitúa en la membrana canalicular, donde media la excreción al canalículo biliar de multitud de xenobióticos (Halilbasic *et al.*, 2013).

Se ha descrito que esta proteína también es capaz de transportar ácidos biliares polihidroxilados en modelos murinos (Lam *et al.*, 2005). Aunque no se descarta que este hecho pueda ser relevante en ciertos tejidos humanos, en el contexto del hepatocito no parece que tenga un papel de importancia a este respecto, en condiciones fisiológicas.

2.3.3.6 MRP2

MRP2 es un transportador cuyo gen se de-

nomina *ABCC2*, capaz de transportar sustratos a través de membranas mediante la hidrólisis de ATP. Está formado por 1545 aminoácidos y tiene afinidad por aniones orgánicos, fármacos y productos de detoxificación de dichos fármacos como moléculas sulfatadas o glucurónidos, incluyendo ciertos ácidos biliares y bilirrubina conjugada (Nies *and* Keppler, 2006)

Se localiza en células intestinales, renales y la membrana canalicular de los hepatocitos, donde realiza una función de secreción de los sustratos hacia el canalículo biliar. En algunos sustratos requiere el cotransporte de glutatión reducido (Jedlitschky *et al.*, 2006).

2.4. Regulación de los transportadores hepato-biliares: factores de transcripción implicados

Como hemos visto en el apartado anterior, la secreción biliar y la circulación enterohepática dependen de una compleja red de transportadores, con funciones interrelacionadas, que deben responder eficazmente a los estímulos para mantener la homeostasis. En el hepatocito esta regulación es especialmente compleja, tanto transcripcional como postranscripcionalmente, y está mediada por una gran cantidad de factores de transcripción y rutas de transducción de señales, aunque aún quedan numerosos aspectos sin resolver. Dentro de los factores de transcripción implicados destacan los receptores nucleares sensores de ácidos biliares, por su papel directamente implicado en la regulación de la biosíntesis y el transporte de los ácidos biliares, y el resto de componentes de la bilis.

FXR (del inglés, *Farnesoid X receptor*, gen *NR1H4*) pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y tiene un papel central y ampliamente estudiado en la regulación de la síntesis y del transporte de los ácidos biliares,

tal y como se descubrió en modelos murinos *knock-out* (Kok *et al.*, 2003). Es un sensor capaz de detectar ácidos biliares conjugados y libres (CDCA es el ligando de mayor afinidad) y dirigir la activación, o represión, de genes relevantes en estos procesos. Es un receptor nuclear de tipo II, con lo que se sitúa en el núcleo unido al DNA en aquellos loci que regula, junto con proteínas correpressoras y RXR (del inglés, *Retinoid X receptor*), otro receptor nuclear que actúa en forma de heterodímero junto con multitud de receptores nucleares de tipo II (Modica *et al.*, 2010). En la activación mediada por FXR, la unión del ligando produce un cambio conformacional que permite a los receptores nucleares reclutar proteínas coactivadoras como PGC1 α (del inglés, *Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α*) (Zhang *et al.*, 2004).

Un ejemplo paradigmático es la regulación de CYP7A1, la enzima limitante en la biosíntesis de ácidos biliares. Su gen está activado por la acción del receptor nuclear LRH-1 (del inglés. *Liver Receptor Homolog 1*, gen *NR5A2*). Los ácidos biliares son capaces de regular su propia síntesis gracias a un circuito de retroalimentación negativa en el que participa FXR. Es capaz de reprimir a CYP7A1 fundamentalmente por dos vías: 1) a través de la inducción de SHP (del inglés, *Small heterodimer partner*, gen *NR0B2*), un correpressor que bloquea la acción de LRH-1 (Goodwin *et al.*, 2000) y 2) a través de la ruta FGF19/FGFR4, en la cual FXR induce la expresión de una hormona en el intestino, FGF19, que viaja hasta el hígado donde, en los hepatocitos, interactúa con su receptor FGFR4 que reprime CYP7A1 mediante una ruta dependiente de JNK (quinasas c-Jun N-terminal) (Song *et al.*, 2009; Inagaki *et al.*, 2005).

Además, también activa varios transporta-

dores de ácidos biliares entre los que destacan BSEP, MRP2, MDR3 y OST α /OST β , y reprime NTCP (Figura 6). Como resultado de su acción, se evita la acumulación de ácidos biliares en el citoplasma del hepatocito, activando su secreción hacia el canalículo biliar o el sinusoides hepático, e inhibiendo su principal vía de entrada.

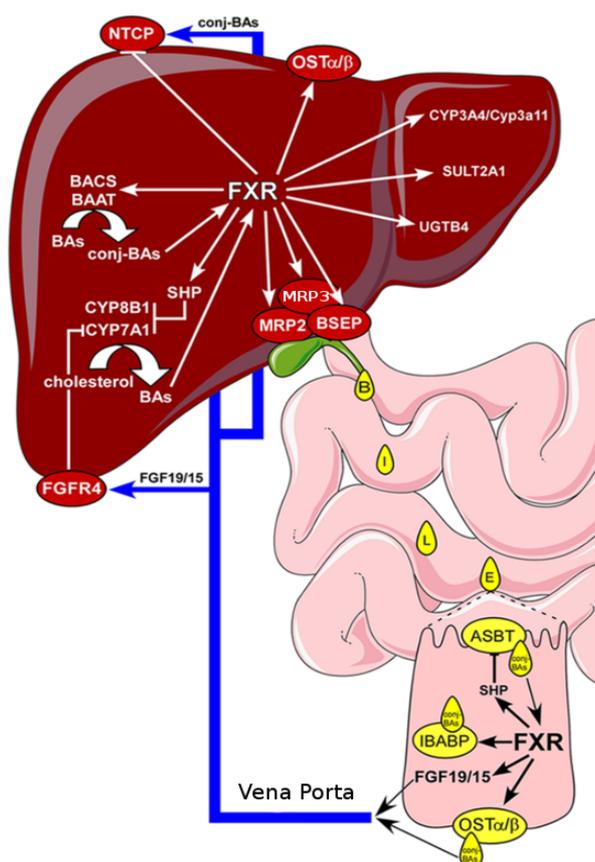


Figura 6: Funciones reguladoras de FXR. Se puede observar algunos de los genes diana del receptor nuclear FXR. Tiene un papel fundamental en el control de la síntesis y transporte de ácidos biliares. Imagen adaptada de Modica *et al.*, 2010.

PXR (del inglés, *Pregnane X receptor*, gen *NR1I2*) y VDR (del inglés, *Vitamin D Receptor*, gen *NR1I1*) son los otros dos principales receptores nucleares capaces de actuar como sensores de ácidos biliares (Makishima *et al.*, 2002, Xie *et al.*, 2001). El sustrato de mayor afinidad por ambos factores de transcripción es el LCA y 3-ceto-LCA (ácidos biliares secundarios) lo cual tiene sentido teniendo en cuenta la rele-

vancia de los mismos en rutas de detoxificación y eliminación de ácidos biliares, fármacos y compuestos tóxicos, mediante la modulación tanto del citocromo P450, como de enzimas de conjugación y transportadores hepatobiliares (Uppal *et al.*, 2005; Sonoda *et al.*, 2002). CAR (del inglés *Constitutive androstane receptor*) juega un papel similar al de PXR, pero en este caso se trata de un receptor nuclear constitutivamente activo en el hígado (Guo *et al.*, 2003).

Por otra parte, LXR α (del inglés, *Liver X Receptor α*) es un receptor nuclear que se une a los oxisteroles, moléculas derivadas del metabolismo del colesterol. Por tanto, juega un papel de relevancia en la regulación de la homeostasis de ese lípido. Forma heterodímeros, de manera obligada, con RXR α y modula la expresión de genes relacionados con el colesterol y los ácidos biliares como el transportador ABCG5/ABCG8 (Sun *et al.*, 2013). En ratones está descrito que induce CYP7A1, de manera que la acumulación de colesterol en el hepatocito inicia la ruta de síntesis de ácidos biliares, pero en humanos no ocurre este mecanismo (Chiang, 2013).

Los receptores nucleares de la familia PPAR (del inglés, *peroxisome proliferator-activated receptors*), en especial las isoformas PPAR α y PPAR γ , participan de manera destacada en la regulación del metabolismo energético, promoviendo la lipólisis y la oxidación de los ácidos grasos. Como los anteriores, forma un heterodímero junto con RXR para unirse a los elementos de respuesta en el genoma y modular la transcripción. Algunos de sus ligandos son los ácidos grasos y los fibratos. Aunque su papel en la regulación de los transportadores hepatobiliares es menor, se ha descrito su importancia en varias rutas de activación (Li and Chang, 2009)

Por último, existe un grupo heterogéneo de receptores nucleares constitutivos como, HNF4 α (del inglés, *Hepatocyte nuclear factor 4 α*), que a su vez controla la expresión de HNF1 α , así como los factores de transcripción FOXA1, FOXA2 (del inglés, *Forkhead box protein A1/A2*) y los de la familia C/EBP (del inglés, *CCAAT enhancer binding proteins*) que tienen una expresión particularmente alta en el tejido hepático. Por ello, se denominan genéricamente LETF (del inglés, *Liver-enriched transcription factors*). Dado que muchos transportadores hepatobiliares tienen una expresión mayoritariamente hepática, su regulación por los LETF podría ser muy significativa. Sin embargo, apenas existen estudios previos que exploren esta posibilidad.

La activación (o represión) de los transportadores hepatobiliares podría ser un proceso colaborativo en el que participan receptores nucleares, coactivadores, corepresores y también los LETF (Schrem *et al.*, 2002).

2.5. Patologías del transporte hepatobiliar: colestasis

Teniendo en cuenta, por un lado, las funciones fisiológicas tan amplias de los ácidos biliares, no sólo en la digestión, sino también en la señalización celular, así como su citotoxicidad, la coordinación de este entramado regulatorio tan complejo es fundamental en la fisiología de los humanos, siendo su estudio de gran interés desde un punto de vista biomédico.

En este sentido, la desregulación del metabolismo y transporte de ácidos biliares se ha asociado con enfermedades multifactoriales como la diabetes tipo II, la dislipemia, hígado graso, y patologías cardiovasculares (Chiang *et al.*, 2013). Por su papel más directo y estudiado, vamos a describir la implicación de los trans-

portadores hepatobiliares en la colestasis. Se define como la reducción o el bloqueo del flujo biliar normal como consecuencia de una alteración del transporte y/o excreción de la bilis impidiendo, total o parcialmente, su llegada al duodeno.

Es un síndrome clínico y bioquímico caracterizado por niveles elevados de ácidos biliares y bilirrubina conjugada en sangre, ictericia, prurito y elevación sérica de enzimas hepáticas, en particular la fosfatasa alcalina. Si el origen de la colestasis radica en el hepatocito o en el árbol biliar del interior del parénquima hepático, la colestasis recibe el nombre de intrahepática; por el contrario, si la causa se encuentra en las vías biliares externas del hígado recibe el nombre de extrahepática. Por su aparición y mantenimiento en el tiempo, la colestasis también se clasifica en aguda o crónica. La ictericia constituye el signo clínico más evidente de las colestasis obstructivas, consecuencia de la acumulación de bilirrubina en el organismo que confiere a la piel y a las mucosas una coloración amarillenta característica (Dietrich *and* Geier, 2014).

Las causas de la colestasis pueden ser obstrucciones físicas de las vías biliares por tumores o piedras, mutaciones genéticas de los genes de los transportadores hepatobiliares así como la desregulación adquirida de los mismos por fármacos, embarazo o condiciones patofisiológicas.

En cuanto a las enfermedades genéticas, las PFIC (del inglés, *Progressive familial intrahepatic cholestasis*) son un grupo de patologías raras caracterizadas por presentar colestasis intrahepática, manifestándose en una edad temprana del paciente. Su incidencia es de 1 por cada 50.000-100.000 nacimientos. Son de herencia autosómica recesiva y existen varios grupos

con defectos en genes diferentes, que codifican para transportadores hepatobiliares como BSEP, MDR3 y FIC1. Por su parte, las BRIC (del inglés, *Benign recurrent intrahepatic cholestasis*) son una forma más leve, que generalmente no progresa a daño hepático crónico. Se han descrito también mutaciones en receptores nucleares, como FXR, causantes de esta clase de patologías, lo que pone de manifiesto la importancia de su regulación (Gomez-Ospina *et al.*, 2016).

Asimismo, el hígado es un órgano vulnerable a los fármacos debido a su ubicación anatómica, a la elevada expresión de transportadores y a su capacidad de biotransformación. En este sentido, el daño hepático inducido por fármacos (del inglés, *Drug Induced Liver Injury*, DILI) es un reto clínico cada vez más relevante asociado al mayor consumo de medicamentos y la polimedicación. En el sistema nacional de salud español, representa un 14% de los ingresos hospitalarios por afección hepática, y tiene una tasa de mortalidad de hasta un 5% (Tejada-Cifuentes, 2010). El DILI es considerada la causa principal de fallo hepático agudo en los países occidentales, requiriendo con frecuencia un trasplante hepático (Lee *et al.*, 2003). Esta afección se puede clasificar en formas colestásicas, mixtas o hepatocelulares. Las colestásicas y mixtas suponen aproximadamente un 45% de los casos totales (Sgro *et al.*, 2002).

La respuesta hepática adaptativa frente a la colestasis conlleva la represión de los transportadores sinusoidales de entrada, mientras que los sinusoidales de salida se inducen como vía de escape alternativa, que protege a los hepatocitos de los efectos citotóxicos de la acumulación de ácidos biliares (Geier *et al.*, 2007).

La colestasis producida por medicamentos presenta características de una respuesta idiosincrásica ya que afecta de manera muy dispar a los pacientes, prácticamente impredecible y con mecanismos en gran medida desconocidos. La diferente respuesta entre los pacientes puede deberse al efecto sumatorio de polimorfismos genéticos, diferencias epigenéticas y a la variabilidad interindividual en la expresión de los mismos, y los factores de transcripción que los regulan, que se ha descrito que es muy alta (Meier *et al.*, 2006).

Por tanto, trazar nuevas relaciones entre los receptores nucleares, los LETF y los transportadores permitiría entender mejor la intrincada red regulatoria hepatobiliar, lo cual serviría no sólo para discernir los mecanismos moleculares patológicos de la colestasis sino también como requisito previo imprescindible para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

3. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la abundante expresión hepática de multitud de factores de transcripción y la elevada variabilidad poblacional en la expresión de los transportadores hepatobiliares, hipotetizamos que existen muchos circuitos reguladores que todavía no han sido descritos, y que podrían ser útiles para mejorar nuestro conocimiento de las bases moleculares de las patologías relacionadas. Aunque la acción de FXR está ampliamente estudiada, deben existir otros factores de transcripción con implicación en la regulación de los transportadores. Por tanto, los objetivos del presente trabajo de fin de máster han sido los siguientes:

- 1) Estudiar la respuesta de la expresión génica de los transportadores hepatobiliares sinusoidales (NTCP, OATP1B1, OATP1B3, OATP1A2, MRP4, MRP3 y OST α /OST β) y ca-

naliculares (BSEP, ABCG5/ABCG8, MDR3, BCRP, MDR1 y MRP2) frente a la sobreexpresión de factores de transcripción de relevancia hepática (C/EBP α , C/EBP β , CAR, FOXA1, HNF4 α , LXR α , PGC1 α , PPAR α , PXR, RXR α y VDR), para ahondar en el conocimiento de su regulación, a nivel transcripcional.

2) Encontrar sinergismos de diferentes factores de transcripción que produzcan una mayor inducción de los transportadores hepatobiliares. Aunque la línea celular HepG2 es un modelo hepático económico y de manipulación relativamente sencilla, no expresa a niveles apreciables algunos transportadores cruciales. Por tanto, este objetivo es útil tanto para generar modelos experimentales más fidedignos, basados en la línea celular HepG2, como para predecir posibles circuitos reguladores con varios factores implicados.

3) OST β es, junto con OST α , un transportador relevante a nivel fisiológico en la circulación enterohepática y el ciclo colehepático. Además, también se le presupone importancia en condiciones patológicas. En este sentido, planteamos como tercer objetivo el estudio detallado del promotor de su gen, *SLC51B*, para localizar los elementos de respuesta en el genoma, a los que se unen los factores de transcripción inductores.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivos celulares

Para la realización de los experimentos de sobreexpresión de factores de transcripción y los ensayos reporteros se utilizó la línea celular HepG2 (ATCC, *American Type Culture Collection*, HB-8065) cultivada con el Medio A. Por su parte, para el proceso de generación de los adenovirus se utilizó la línea celular HEK293T (ATCC, CRL-3216) cultivada con el medio B.

Medio A: Ham's F12 / Leibovitz L-15 (1:1 v/v) (Thermo Fisher Scientific, #11320033/#11415064) suplementado con suero bovino fetal al 7% (Hyclone, #SV30160), L-glutamina (Sigma-Aldrich, G3126) 2mM, glucosa (Sigma-Aldrich, M4125) 5mM, BSA (Sigma-Aldrich, A2058) 2mg/mL, bicarbonato (Grifols) 12mM, penicilina (Sigma-Aldrich, P3032) 100U/mL y estreptomycin (Sigma-Aldrich, S9137) 100 μ g/mL.

Medio B: Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (Thermo Fisher Scientific, #11965084) suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2mM, penicilina 100U/mL y estreptomycin 100 μ g/mL.

4.2. Generación de los adenovirus

Los adenovirus recombinantes que codifican los cDNA de los factores de transcripción se desarrollaron en el grupo en Hepatología Experimental (IIS La Fe) como se describe en las siguientes referencias: Ad-C/EBP α (Rodríguez-Antona *et al.*, 2003), Ad-C/EBP β -(LAP) (Martínez-Jiménez *et al.*, 2005), Ad-CAR (Pascual *et al.*, 2008), Ad-LXR α (Guzmán *et al.*, 2013), Ad-PGC1 α (Martínez-Jiménez *et al.*, 2006), Ad-PXR (Moya *et al.*, 2012), Ad-RXR α (Guzmán *et al.*, 2013), Ad-PPAR α (Guzmán *et al.*, 2013), Ad-HNF4 α (Martínez-Jiménez *et al.*, 2006) y Ad-FOXA1 (Moya *et al.*, 2012). Del mismo modo, se dispone de un adenovirus control que no contiene ningún inserto (Guzman *et al.*, 2013).

Por su parte, el Ad-VDR se generó utilizando el *kit* Adeno-X Adenoviral System 3 (Clontech, #632269). El cDNA de VDR se obtuvo utilizando los *primers* 5'-CACCCCTGGGCTCCACTTACC-3' (*forward*) y 5'-CCGCCACAGGCTGTCTAGTC-3' (*reverse*) a partir de cDNA de células HeLa. Se siguieron las instrucciones del *kit* para la obtención del vector adenoviral.

Tras su obtención en HEK293T y comprobar su funcionalidad, se purificó utilizando el *kit* Vivapure AdenoPACK 20 (Sartorius, VS-AV-PQ022). Posteriormente, los virus se cuantificaron mediante la técnica del *plaque-forming assay* y se comprobó su capacidad de sobreexpresión de los factores e inducción de genes diana (Benet *et al.*, 2010).

4.3. Infección de HepG2 con los adenovirus

Las células HepG2 se infectaron con los adenovirus, y combinaciones de los mismos, para sobreexpresar los diferentes factores de transcripción (Tabla S4). Para ello, se sembraron las células en placas de 24 pocillos a razón de 115.000 células por pocillo (contadas utilizando el *Automated Cell Counter TC20* de Bio-Rad, #1450102), de manera que al día siguiente la confluencia fuera de un ~60% para proceder a la infección con las adenovirus purificados.

A las 24h se cambia el medio por medio fresco, al que previamente se le ha añadido la cantidad adecuada de los adenovirus purificados, para que los MOI (del inglés, *multiplicity of infection*) sean los deseados, con un volumen final de 0,5mL por pocillo.

A las 48 o 72h tras la siembra, se cambió de nuevo el medio por medio con el ligando correspondiente, en caso de haberlo (Tabla S1). Después, tras 24h las células se procesan, extrayendo su RNA y realizando los experimentos posteriores, como se explica en las próximas secciones.

Este procedimiento se realizó en 4 experimentos independientes, con, en cada caso, diferentes combinaciones de los adenovirus con unos MOI concretos: 10-75 pfu (*plaque forming units*) / célula (Tabla S1).

4.4. Extracción de RNA y retrotranscripción

El RNA de las HepG2 de los diferentes experimentos se extrajo haciendo uso del Rneasy Mini Kit (Qiagen, #74106), utilizándose 2 pocillos de placas de 24 para cada condición. Se siguió el protocolo facilitado por el fabricante, y el robot QIAcube (Qiagen, #9001885).

Tras la cuantificación (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific), se utilizó 1µg de cada condición para la retrotranscripción. Se usó la retrotranscriptasa M-MLV (Thermo Fisher Scientific, #28025013), en un volumen final de 20µL por reacción con los siguientes componentes: enzima M-MLV (Thermo Fisher Scientific, #28025013) 200U, Buffer M-MLV 1X, DTT 10mM, oligo dT 14-mer (Thermo Fisher Scientific, AB1247) 3µM y RNAasa RNaseOUT (Thermo Fisher Scientific, #10777019) 10U. Tras una incubación a 42°C durante 60 minutos, se inactivaron las enzimas a 70°C, 15 minutos. Para su utilización posterior en las PCR en tiempo real, se realizó diluciones 1/20 en agua Milli-Q (Millipore Corporation). En cada experimento se procesó una muestra control negativo, con todos los componentes menos las enzimas, incluyendo 1µg de RNA.

4.5. PCR en tiempo real: procedimiento y estadística

Para la PCR en tiempo real se utilizó el termociclador LightCycler 480 (Roche, #05015278001) y placas de 96 pocillos (Roche, #04729692001). Cada cDNA procedente del proceso de retrotranscripción se procesa por duplicado. Cada reacción de cada pocillo se realiza en 10µL totales (2µL del cDNA, 5µL de DNA Master SYBR Green de Roche, y los dos *primers* del amplicón a medir a una concentración final de 0,3 µM cada uno, completando con agua ultrapura del mismo *kit*.

Las muestras se agruparon siguiendo la regla de medir todas las del mismo experimento en la misma placa, o el máximo número posible. Si sobra espacio, se agrupan también amplicones diferentes, siempre y cuando la temperatura de hibridación sea compatible. El programa usado en todos los casos fue: 95°C – 8min, 40x (95°C – 15s, T_h°C – 10s, 72 °C – t_{ext}), seguido de una *melting curve*, siendo T_h la temperatura de hibridación de los *primers* y t_{ext} el tiempo de extensión requerido (Tabla S2)

Con el fin de minimizar las diferencias provocadas por la variabilidad inter-placa, y como control positivo, se utiliza una muestra calibradora (cDNA hepático) que aporta un valor constante a lo largo de todos los experimentos. Los resultados son analizados con el programa LightCycler 480 1.5.0 (Roche) siguiendo el método *Abs Quant / Fit Points* para calcular y extraer los datos de Cp de cada muestra.

Además de los genes de interés, en cada muestra se mide también los genes *GAPDH* y *HMBS* que actúan como normalizadores (*housekeeping*) para corregir la variabilidad.

Los datos de Cp se introducen en el programa LibreOffice Calc (*The Document Foundation*) para calcular las concentraciones relativas, con respecto a las células tratadas con un adenovirus control. El cálculo se realiza siguiendo el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Para el cálculo de las eficiencias que requiere dicho método se utilizó el *software* LinRegPCR (*Heart Failure Research Center*), de manera independiente para cada placa y amplicón (Ramakers *et al.*, 2003). Se realiza la media geométrica de los datos de los dos normalizadores para finalmente aplicar la fórmula de Pfaffl (1):

$$Fold\ Change = \frac{(E_{gen})^{\Delta CP_{gen}(control - muestra)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control - muestra)}} \quad (1)$$

Todos los datos se transforman con logaritmo de base 2 para obtener una distribución normal, que es más sencilla de tratar estadísticamente. Los datos con 2 o más réplicas de diferentes experimentos se someten a ANOVA de un factor seguida de un test de contraste *post-hoc* (test de Dunnett, alfa=0,05) para comparar cada muestra con el control.

4.6. Clonación de los fragmentos del promotor de *SLC51B*

Para estudiar con más detalle la regulación del gen *SLC51B* se procedió, en primer lugar, a clonar su promotor. Mediante análisis bioinformáticos y el estudio de la bibliografía se determinó las regiones génicas que podrían ser de interés para su regulación. Siendo +1 el sitio de inicio de la transcripción del gen *SLC51B*, se decidió clonar el fragmento *upstream* [-1221, +202] y la región intrónica [+1120,+4539].

Para ello, se utilizó como molde DNA genómico humano aportado por la Unidad de Genómica del IIS La Fe y los *primers* que constan en la Tabla S3. Se realizaron 2 reacciones de 50µL por cada amplicón usando la DNA polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific, F530S) y el *buffer* correspondiente (DNA molde 100ng, *primers* 0,5µM cada uno, dNTPs 2mM). El programa utilizado, en todos

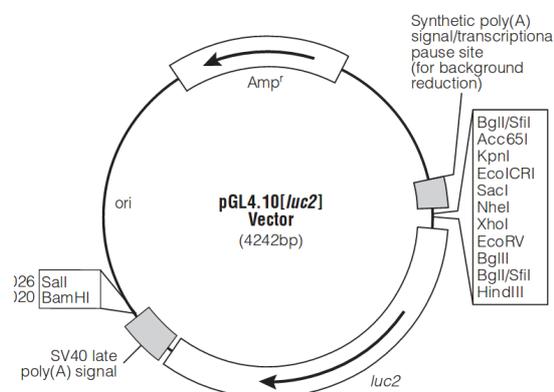


Figura 7: Esquema del vector pGL4.10. Este vector contiene el gen de la luciferasa sin promotor alguno.

los casos, fue el siguiente: [98°C – 30s, 5x(98°C – 10s, 63°C – 30s, 72°C – 110s), 30x (98°C – 10s, 72 °C – 110s)].

Posteriormente, se procedió a digerir ambos productos de PCR y el vector pGL4.10 (Promega, #E6651, Figura 7) con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* (FastDigest, Thermo Fisher Scientific, FD0524/FD0694) en las condiciones especificadas por el fabricante.

El vector digerido fue tratado con fosfatasa alcalina (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Fisher Scientific, EF0654). Tanto el vector como los productos de PCR se purificaron en columna antes de proceder a la ligación (Wizard SV Gel and PCR Clean Up, Promega, TB308).

Para la ligación se utilizó 50ng del vector digerido por reacción y un ratio molar vector/inserto de 1:3 así como 1U de la enzima DNA T4 Ligase (Thermo Fisher Scientific, EL0014) y su tampón correspondiente a 1X, en un volumen total de 20µL. La reacción se llevó a cabo durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se inactivó la ligasa durante 5 min a 70°C.

Para transformar las bacterias quimiocompetentes (Library DH5α Competent Cells, Thermo Fisher Scientific, #18263012) se utilizan 50µL de las mismas por reacción y 3µL de cada una de las mezclas de ligación. Tras 30min en hielo se les sometió a un choque térmico (45s, 42°C) y se recuperaron con 900µL de medio SOC. Tras 60min a 37°C en agitación, se plaquean en placas de LB Agar + ampicilina (Sigma-Aldrich, A9518, 100µg/mL) y se dejan crecer a 37°C toda la noche.

Al día siguiente, se realizó una PCR de colonia con los *primers* del vector RVP3_F y pGL4_R (Tabla S3) a 0,5µM, dNTPs 0,2 mM y el

siguiente programa: [95°C – 5min, 35x (95°C – 30s, 52°C – 30s, 72°C – 4min), 72°C – 10min]. Se hizo una electroforesis en agarosa (0,8%) y se eligió una colonia positiva por amplicón.

Se inocularon 7mL de medio LB + ampicilina (100µg/mL) para cada colonia positiva, y se mantuvieron a 37°C en agitación durante 18h. Con los medios ricos en bacterias, se hicieron minipreps siguiendo las especificaciones del QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, #27104). Se reservó 850µL de cada preparación para su almacenamiento a -80°C (15% glicerol).

Para comprobar fehacientemente la secuencia de los diferentes amplicones, se utilizó la secuenciación Sanger por electroforesis capilar de la Unidad de Genómica del IIS La Fe (ABI Prism 3100), con los *primers* de la Tabla S3.

Siguiendo este mismo procedimiento, se generaron fragmentos cada vez más pequeños partiendo del vector clonado con la secuencia del promotor de *SLC51B* [-1221, +202]. En concreto, los fragmentos fueron los siguientes: [-776, +202], [-350, +202], [-74, +202] y [0, +202]. Se utilizó para ello los *primers* de la Tabla S3.

4.7. Preparación del DNA para la transfección en líneas celulares

Con el fin de obtener los vectores con la suficiente cantidad y pureza para los experimentos con líneas celulares, se utilizó el *kit* NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel, #740414). Partiendo de colonias frescas con los diferentes vectores se hicieron precultivos en 4mL de LB + ampicilina (100µg/mL) durante 15h a 37°C en agitación, para inocular después 200mL de LB + ampicilina (100µg/mL) con 300µL, por cada precultivo. Estos medios inoculados se dejaron crecer a 37°C en agitación, aproximadamente 18h, hasta alcanzar una absorbancia a 600nm de 6.

Tras la purificación del DNA plasmídico, siguiendo el manual del *kit*, se volvió a precipitar el DNA para mejorar su pureza, con etanol absoluto y acetato de sodio. Se añadió 1/10 de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol a las disoluciones con los vectores, se incubó 10min a -20°C, se centrifugó a 16.000g durante 20min, se eliminó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 1mL de etanol absoluto. Tras eliminar el sobrenadante y desecar el *pellet* se resuspendió en tampón TE pH 8.

4.8. Ensayos reporteros

Se realizaron un total de 5 experimentos independientes, 2 de ellos utilizando los vectores con los insertos [-1221, +202] y [+1120,+4539], y los otros 3 también con los fragmentos [-776, +202], [-350, +202], [-74, +202] y [0, +202].

Se utilizaron células HepG2 a pase 15-20. Se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 115.000 células por pocillo (contadas utilizando el *Automated Cell Counter TC20* de Bio-Rad, #1450102) (día 1). Al día siguiente se infectaron con los adenovirus que expresan los factores de transcripción a estudiar junto con el adenovirus control: C/EBP α , C/EBP β , VDR, RXR α , LXR α , PXR, CAR y PGC1 α , a una concentración de 10 a 75 pfu/célula (Tabla S1) (día 2). Tras incubar 24h con los adenovirus se realizó un cambio de medio (475 μ L por pocillo).

Para la transfección se utilizaron los vectores con los fragmentos de *SLC51B* citados anteriormente, el vector pGL4.10 vacío y el vector pGL4.10-Rluc, el cual presenta el gen de la luciferasa de *Renilla reniformis* en lugar de la luciferasa de luciérnaga *Photinus pyralis* (Promega). Este último vector se utiliza como normalizador. En total se añade 0,08 pmol del vector de interés (pGL4.10 vacío o con algunos de los insertos ya descritos) junto con 0,088

pmol del vector pGL4.10-Rluc, 0,75 μ L de XtremeGene HP (Roche, #06366236001) y OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, #31985062) hasta un volumen final de 25 μ L, por pocillo.

Las transfecciones de cada vector, para cada adenovirus, se realizaron en 2 pocillos diferentes, por duplicado. Para su preparación y aplicación en las células se siguieron las instrucciones del protocolo del reactivo XtremeGene HP (día 3). En este punto, los pocillos tienen aproximadamente un 70-80% de confluencia.

Tras 24h se realizó otro cambio de medio, añadiendo, esta vez, nuevo medio con el ligando de cada uno de los factores de transcripción, en el caso de tenerlo, a la concentración indicada (Tabla 1) (día 4). Las disoluciones de dichos ligandos fueron preparadas en agua o en DMSO según su solubilidad y son los siguientes: rifampicina (Sigma-Aldrich, R3501), CITCO (Sigma-Aldrich, C6240), Ácido 9-cis-retinoico (Sigma-Aldrich, R4643), T0-901317 (Sigma-Aldrich, T2320) y calcitriol (Sigma-Aldrich, D1530).

Tabla 1: Relación de ligandos con sus respectivos factores de transcripción.

Factor de Transcripción	Ligando	Concentración Final
Ad-CEBP α	N/D	N/D
Ad-CEBP β	N/D	N/D
Ad-PXR	Rifampicina	50 μ M
Ad-CAR	CITCO	0,5 μ M
Ad-RXR α	Ácido 9-cis-retinoico	1 μ M
Ad-LXR α	T0-901317	1 μ M
Ad-VDR	Calcitriol	0,01 μ M
Ad-PGC1 α	N/D	N/D

Al día siguiente se prepararon las muestras para la lectura de la actividad luciferasa, haciendo uso del kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Tras lavar los pocillos con PBS 1X frío se incorporaron 100 μ L de tampón PLB (*Passive Lysis Buffer*) por pocillo y

se incubaron 15min. 10 μ L de cada pocillo se traspasaron a una placa blanca opaca para luminómetro de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific). La lectura se realiza en el luminómetro Berthold LB 9505C, de 5 en 5 pocillos, añadiendo 30 μ L del reactivo LARII y después 30 μ L del Stop & Glo (10s de tiempo de medida).

Para el procesamiento de los datos se dividieron los valores de RLU (*Relative light units*) de la luciferasa de luciérnaga por los de la luciferasa de Renilla, con el fin de normalizarlos, y se les sustrajo su dato respectivo del vector pGL4.10 vacío. Estos ratios se promedian entre las 2 réplicas de cada condición experimental. Posteriormente, cada ratio promedio normalizado y con el *background* sustraído se divide por el dato control (células tratadas con el adenovirus control y con el vector respectivo). Como resultado, se obtuvieron datos de *Fold Change* que representaban las veces que aumenta la señal luminiscente con respecto al control. Los datos equivalentes de los diferentes experimentos son entonces transformados con logaritmo de base 2, para obtener una distribución normal, con la cual se realiza toda la estadística posterior.

Utilizando el *software* Graphpad Prism 6, los datos de los diferentes experimentos se analizaron con un ANOVA de un factor, seguido de un test de contraste *post-hoc* (test de Tukey, alfa=0,05), para comparar todos los grupos entre sí, y finalmente se representaron.

Para la búsqueda *in silico* de elementos de respuesta se ha utilizado las aplicaciones JASPAR y Genomatix MathInspector.

4.9. Diseño de primers

Todos los *primers* utilizados en los experimentos anteriores fueron diseñados utilizando las herramientas bioinformáticas Primer-

BLAST (National Institute of Health, USA) y Oligo 6 (Molecular Biology Insights Inc.). Su síntesis fue realizada por Thermo Fisher Scientific. En el caso de los *primers* para PCR en tiempo real, se abarca la unión entre exones para minimizar problemas con la contaminación de DNA genómico. Estos primers son validados mediante electroforesis en gel de agarosa.

5. RESULTADOS

5.1. Comparación de la expresión de los transportadores hepatobiliares y factores de transcripción entre hígado humano y HepG2

La línea celular HepG2 es útil como sistema modelo para el estudio de los mecanismos fisiológicos y las patologías hepáticas. Sin embargo, han perdido parte de las características que tienen los hepatocitos. Por tanto, quisimos comprobar en qué medida conservan la expresión de los transportadores hepatobiliares y los factores de transcripción.

Para ello se hicieron PCR en tiempo real cuantitativas (qRT-PCR) a partir de cDNA de un *pool* de 10 hígados humanos y un *pool* de HepG2 control, de 3 experimentos diferentes. Con los *primers* de la Tabla S1 obtuvimos los niveles relativos de los mRNA, correspondientes a los genes de interés.

En la Figura 8 se puede observar el nivel de expresión de los diferentes transportadores hepatobiliares, clasificados en sinusoidales de entrada, sinusoidales de salida y canaliculares. En este gráfico, el punto 0 representa la expresión media de los transportadores en el hígado, de manera que valores más elevados suponen una expresión mayor que la media, y valores más bajos una expresión menor que la media hepática.

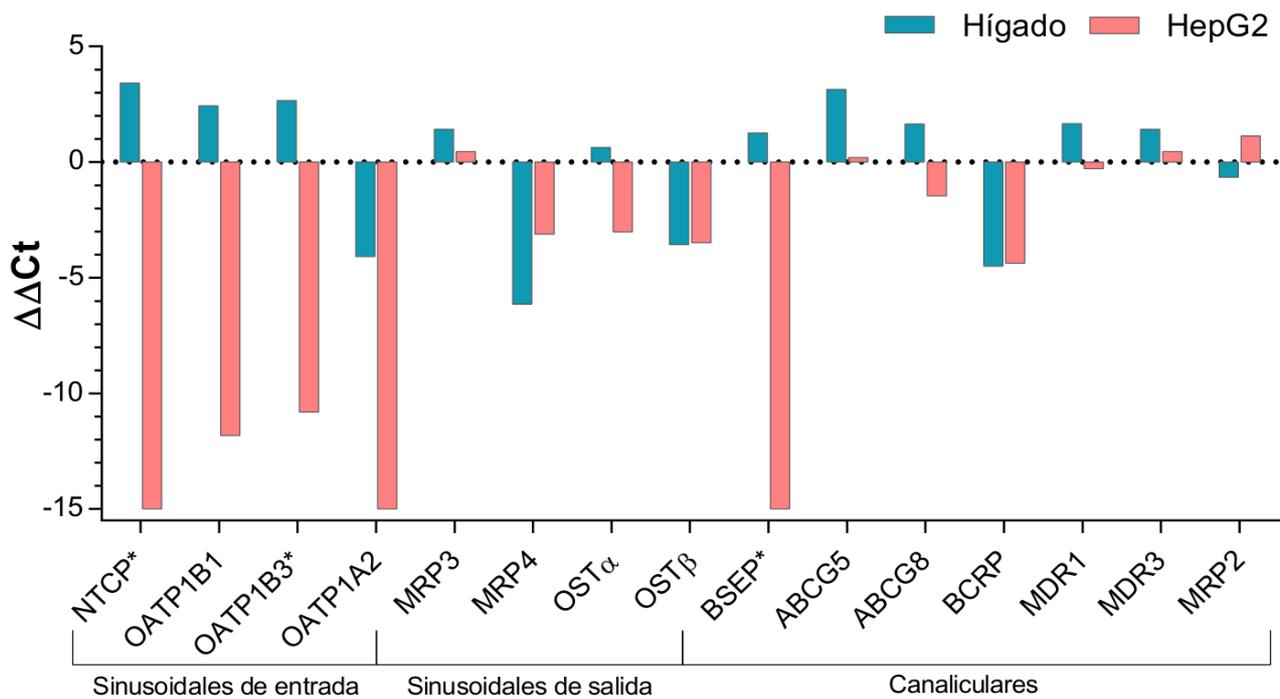


Figura 8: Comparación del nivel basal de expresión de los transportadores hepatobiliares en HepG2 frente a hígado humano. En la gráfica se pueden observar los valores relativos de expresión de los diferentes transportadores con respecto al promedio hepático de los mismos. Se representan los valores de $\Delta\Delta Ct$ (base Log_2), de manera que 0 significa ninguna diferencia con la media. Los datos están normalizados frente a GAPDH y HMBS.

Puesto que $\Delta\Delta Ct$ es un valor logarítmico en base 2, cada unidad por encima supone un nivel del mRNA de aproximadamente el doble, y cada unidad por debajo de aproximadamente la mitad.

Podemos ver que los transportadores sinusoidales de entrada (NTCP y los OATP) están muy mal conservados en HepG2. Ninguno de los 4 se pudieron detectar de manera fiable y consistente. En cuanto al nivel hepático, se observa que OATP1A2 tiene una expresión menor, comparado con OATP1B1 y OATP1B3, lo cual concuerda con los datos previos de la bibliografía (Halilbasic *et al.*, 2013).

Los transportadores sinusoidales de salida están bien conservados en HepG2 e incluso alguno, como MRP4, está sobreexpresado, lo cual concuerda con su papel en el bombeo de fármacos, teniendo en cuenta el carácter tumoral de las células HepG2.

Se aprecia también el menor nivel de expresión hepática de OST β con respecto a OST α (~16 veces menos). Por su parte, en HepG2, la expresión a nivel transcripcional de OST β es muy similar a la hepática.

Además, BSEP no es detectable en HepG2. El resto de transportadores canaliculares están bien conservados en esta línea celular. Tienen, en líneas generales, un nivel de expresión menor, pero siguen siendo perfectamente detectables.

Se realizó el mismo procedimiento para analizar los niveles de expresión relativos de los diferentes factores de transcripción y coactivadores hepáticos de interés para el presente trabajo (Figura 9). Se excluye FXR de estos resultados porque no se va a utilizar en apartados posteriores, ya que los circuitos reguladores en los que participa están ampliamente descritos.

Todos los factores de transcripción citados se detectan sin problemas en hígado y en HepG2 (*Crossing point (Cp)* máximo de ~32). Sin embargo, en estas células, el nivel de mRNA de CAR y PXR es 27 y 22 veces menor, respectivamente.

Los LETF C/EBP α y C/EBP β , especialmente el segundo, tienen una expresión muy fuerte tanto en hígado como en HepG2, lo cual parece indicar una importancia clave en la regulación transcripcional hepática que no ha sido apenas estudiada hasta la fecha.

El bajo nivel de expresión hepática de VDR concuerda con lo descrito en la bibliografía. Por este motivo, se le ha supuesto poca importancia en la regulación de la transcripción en el hígado y, por tanto, escasa relevancia patológica. Sin embargo, en un estudio reciente del Grupo en Hepatología Experimental se ha puesto de manifiesto que puede promover la hepatoesteatosis, de manera que podría tener más relevancia de la esperada en el control

transcripcional hepático (Bozic *et al.*, 2016).

Aunque esta comparación nos aporta un punto de partida útil para ver las diferencias entre la expresión hepática y de las HepG2, cabe destacar que existe mucha variabilidad entre la expresión hepática de los transportadores en diferentes individuos.

En experimentos del grupo de Hepatología Experimental se han visto diferencias de 100 a 10 veces en la expresión de los transportadores, una cohorte de 37 muestras hepáticas (datos no mostrados).

En este sentido, los pacientes con niveles inusualmente bajos o altos de alguno de los transportadores podrían tener una mayor o menor predisposición a sufrir colestasis inducida por fármacos, u otras patologías hepáticas. En el caso particular de OST α y OST β , en la Figura 10 se puede observar su variabilidad. Hay una diferencia entre el nivel mínimo y el máximo de 29 y 41 veces, respectivamente.

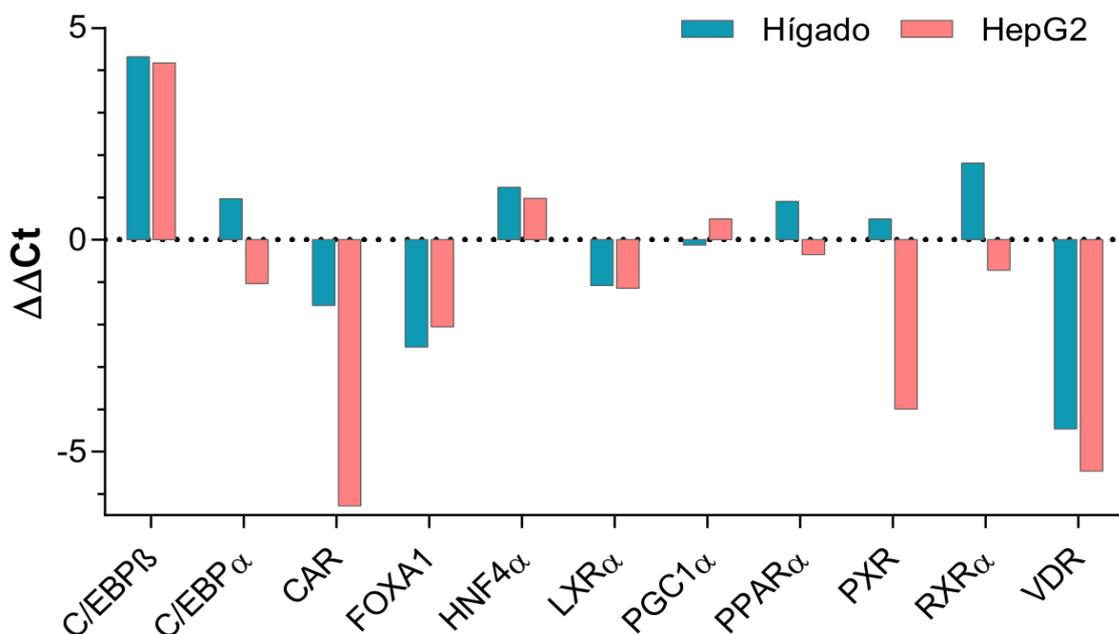


Figura 9: Comparación del nivel basal de expresión de factores de transcripción de relevancia hepática en HepG2 frente a hígado humano. En la gráfica se pueden observar los valores relativos de expresión de los diferentes factores de transcripción y coactivadores, con respecto al promedio hepático de los mismos. Se representan los valores de $\Delta\Delta C_t$ (base Log_2), de manera que el valor 0 significa que no hay ninguna diferencia con la media. Los datos están normalizados frente a GAPDH y HMBS.

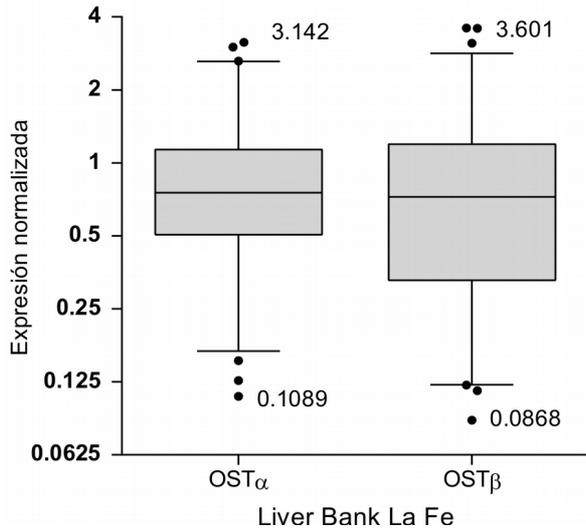


Figura 10: Variabilidad en la expresión del transportador OST α /OST β en el hígado de individuos sanos. En esta representación “box and whiskers” se observa la mediana, los percentiles 5 y 95 (barras) y los outliers (puntos) de 37 biopsias hepáticas de pacientes independientes.

5.2. Inducciones y represiones de los transportadores hepatobiliares mediadas por los factores de transcripción

Con el fin de encontrar nuevos circuitos reguladores de relevancia en la expresión de los transportadores hepatobiliares, y confirmar los descritos en otros sistemas modelo, se sobreexpresó un grupo amplio de receptores nucleares (CAR, LXR α , PPAR α , PXR, RXR α y VDR), *Liver-enriched transcription factors* (C/EBP α , C/EBP β , FOXA1 y HNF4 α), y el coactivador PGC1 α en HepG2, mediante vectores adenovirales, para comprobar después con qRT-PCR si el nivel de mRNA de los transportadores se modifica significativamente, en hasta 3 experimentos independientes. Del mismo modo, también se estudió la sobreexpresión de una serie de 39 combinaciones de 2, 3 o 4 de estos factores, para encontrar posibles sinergismos.

5.2.1. Transportadores sinusoidales de entrada

Los transportadores sinusoidales de entrada,

tal y como indicamos en el apartado anterior, no se detectan en HepG2 control. Por tanto, para poder analizar los datos, fueron referenciados con respecto al cDNA hepático.

En la Figura 11 se observa que NTCP pasa a ser detectable al inducir RXR α , HNF4 α , PGC1 α , C/EBP α o C/EBP β . La combinación de HNF4 α y RXR α produce un Cp de ~29. La expresión sigue siendo 580 veces más baja que en hígado humano pero se consigue una detección estable. Por tanto, los factores de transcripción indicados parecen tener papel en la inducción de este transportador.

En cuanto a OATP1B3, tampoco ha sido detectado en HepG2 control. Sin embargo, al sobreexpresar PPAR α , C/EBP α , C/EBP β , LXR α , RXR α o FOXA1 el nivel de mRNA pasa a ser detectable (Figura 12).

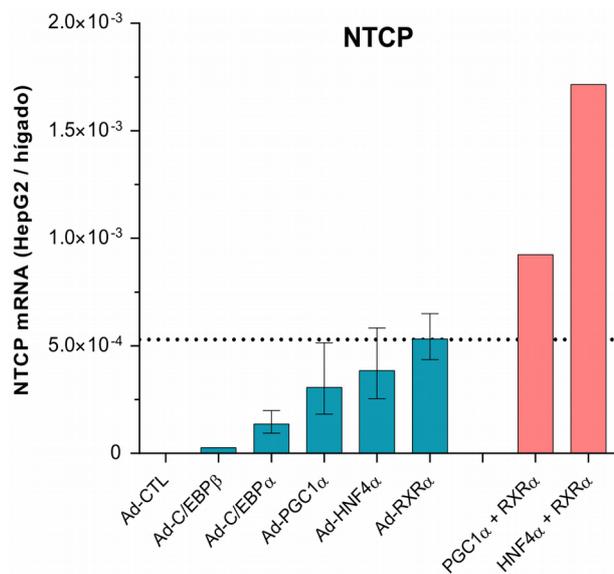


Figura 11: Inducción de NTCP por la sobreexpresión de factores de transcripción. Se representa el ratio de la expresión con respecto al cDNA de una mezcla de 10 hígados \pm error estándar de la media (SEM), medido por qRT-PCR. Todos los datos están normalizados frente a la expresión de GAPDH y HMBS. En el gráfico se observan los factores de transcripción y coactivadores (PGC1 α) que intervienen en la inducción de NTCP y en rojo las combinaciones de varios. Se han omitido los datos de PPAR α , CAR, LXR α , PXR, FOXA1 y VDR ya que no se detectó NTCP.

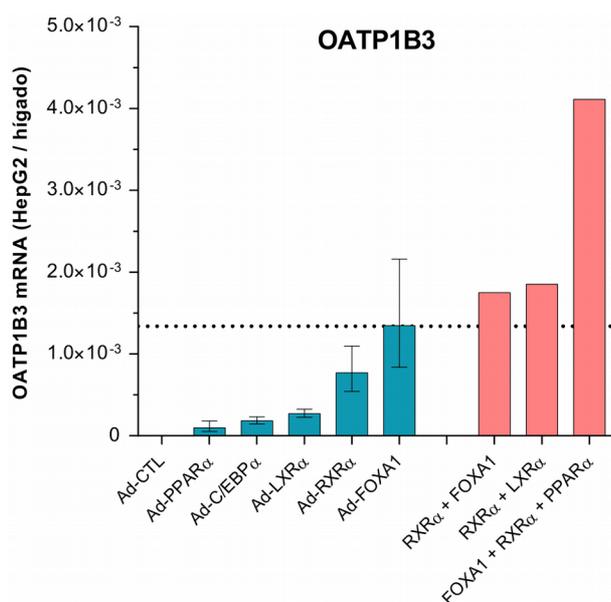


Figura 12: Inducción de OATP1B3 por la sobreexpresión de factores de transcripción. Se representa el ratio de la expresión con respecto a una mezcla de cDNA de 10 hígados \pm error estándar de la media (SEM), medido por qRT-PCR. Todos los datos están normalizados frente a la expresión de GAPDH y HMBS. En el gráfico se observan los factores de transcripción que intervienen en la inducción del gen y en rojo las combinaciones de varios. Se han omitido los datos de los adenovirus CAR, PXR, PGC1 α , HNF4 α , C/EBP β y VDR, ya que no se detectó OATP1B3.

La combinación de FOXA1, RXR α y PPAR α produjo el nivel más alto de OATP1B3, y es de suponer que añadiendo LXR α a esa mezcla podría aumentar aún más. Sin embargo, el nivel del mRNA sigue siendo 240 veces más bajo que en hígado humano.

OATP1B1 y OATP1A2 no fueron detectables ni en HepG2 control ni sobreexpresando ningún factor de transcripción, lo cual indica que su nivel basal en estas células es demasiado pequeño, o que están bajo el control de otros factores.

5.2.2. Transportadores sinusoidales de salida

Siempre que es posible, todos los resultados mostrados se referencian a las HepG2 control tratadas con un adenovirus control. Es decir, se

indica el nivel de expresión con respecto a dicho control. Esos valores se denominan *fold-change*.

En el caso de MRP3 se ha comprobado que FOXA1 produce una represión en la expresión del mRNA estadísticamente significativa (p-valor < 0,05) (Figura 13). Mediante la sobreexpresión de combinaciones de factores de transcripción se ha comprobado este hecho, además de apreciar el sinergismo entre FOXA1, CAR y PGC1 α , con la cual se alcanza una reducción de 4 veces en la expresión de MRP3. También existe el mismo efecto entre FOXA1 y LXR α .

Esto tiene sentido ya que, a pesar de no haber obtenido resultados estadísticamente significativos, PGC1 α , CAR y LXR α son los otros 3 vectores adenovirales que más reprimen MRP3 por separado.

Por otro lado, no hemos encontrado ninguna interacción significativa entre los factores de transcripción y la expresión de MRP4 a pesar de que, como veremos en la discusión de resultados, existen algunos circuitos reguladores previamente descritos en la bibliografía.

Por último, las proteínas OST α y OST β forman parte de un mismo transportador heterodimérico que permite la difusión facilitada de los ácidos biliares. Es previsible, por tanto, que la expresión de ambas subunidades esté coordinada, ya que no se ha descrito hasta la fecha una función independiente de ninguna de las dos.

En este sentido, en la Figura 14A se observa la regulación de OST β por los distintos factores de transcripción. Hay una inducción muy potente mediada por RXR α (~18 veces) y C/EBP α (~15 veces), así como un papel menor pero relevante de C/EBP β , LXR, PXR, VDR y CAR, en

orden decreciente. Aunque individualmente no produce un efecto significativo, el coactivador PGC1 α tiene efectos sinérgicos con un amplio espectro de factores de transcripción, especialmente junto con LXR α y RXR α (*fold-change* ~32) (Figura 14A, derecha). Añadir HNF4 α a esta combinación no produce ninguna diferencia. Esta regulación tan amplia por tantos receptores nucleares y LETF diferentes pone de manifiesto la importancia del transportador, ya que existen múltiples circuitos regulando su expresión.

Por su lado, OST α presenta inducciones más escasas en líneas generales, siendo significativas las que produce LXR α , RXR α , PGC1 α y HNF4 α , en orden decreciente (Figura 14B). Curiosamente, a diferencia de OST β , en este caso HNF4 α tiene un efecto inductor y los C/EBP tienen un efecto más escaso que no se considera significativo con los parámetros estadísticos

utilizados (*fold-change* ~2).

En las combinaciones de diferentes adenovirus se aprecia un efecto cooperativo sinérgico entre LXR α , RXR α y PGC1 α , siendo la combinación de los 3 la que da un mayor nivel de expresión (~18 veces superior al control). Al igual que ocurría con OST β , HNF4 α no tiene ninguna aportación sinérgica a este conjunto.

Existen también otros factores como FOXA1 VDR, CAR o PXR que podrían ser activadores pero existe demasiada variabilidad en nuestras condiciones experimentales como para poder apreciarlo.

Aunque presentan un perfil similar, existen discrepancias entre la regulación de OST α y OST β , siendo destacable el papel inductor de HNF4 α en la expresión del mRNA del primero y no del segundo.

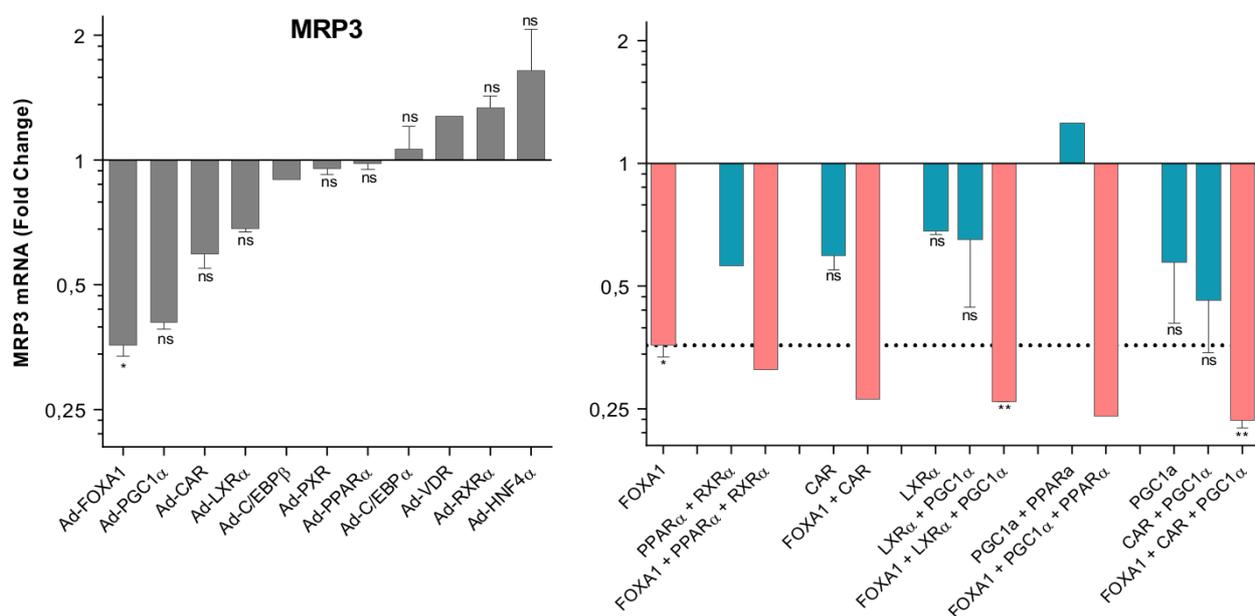


Figura 13: Represión de MRP3 mediada por FOXA1 y combinaciones con otros factores de transcripción. Se representa el *fold-change* de la expresión normalizada frente a GAPDH y HMBS (qRT-PCR) con respecto a HepG2 tratadas con un adenovirus control \pm SEM. A la izquierda se observan las muestras tratadas con los adenovirus de los diferentes factores de transcripción de manera independiente, y a la derecha muestras tratadas con combinaciones, mostrando en rojo aquellas mezclas que contienen FOXA1. Las muestras que presentan un indicador tienen un $n=3$ mientras que las que provienen de un experimento único no lo tienen. (ANOVA y test de Dunnett frente a HepG2 tratadas con adenovirus control: ns $p_v > 0,05$, * $p_v < 0,05$, ** $p_v < 0,01$)

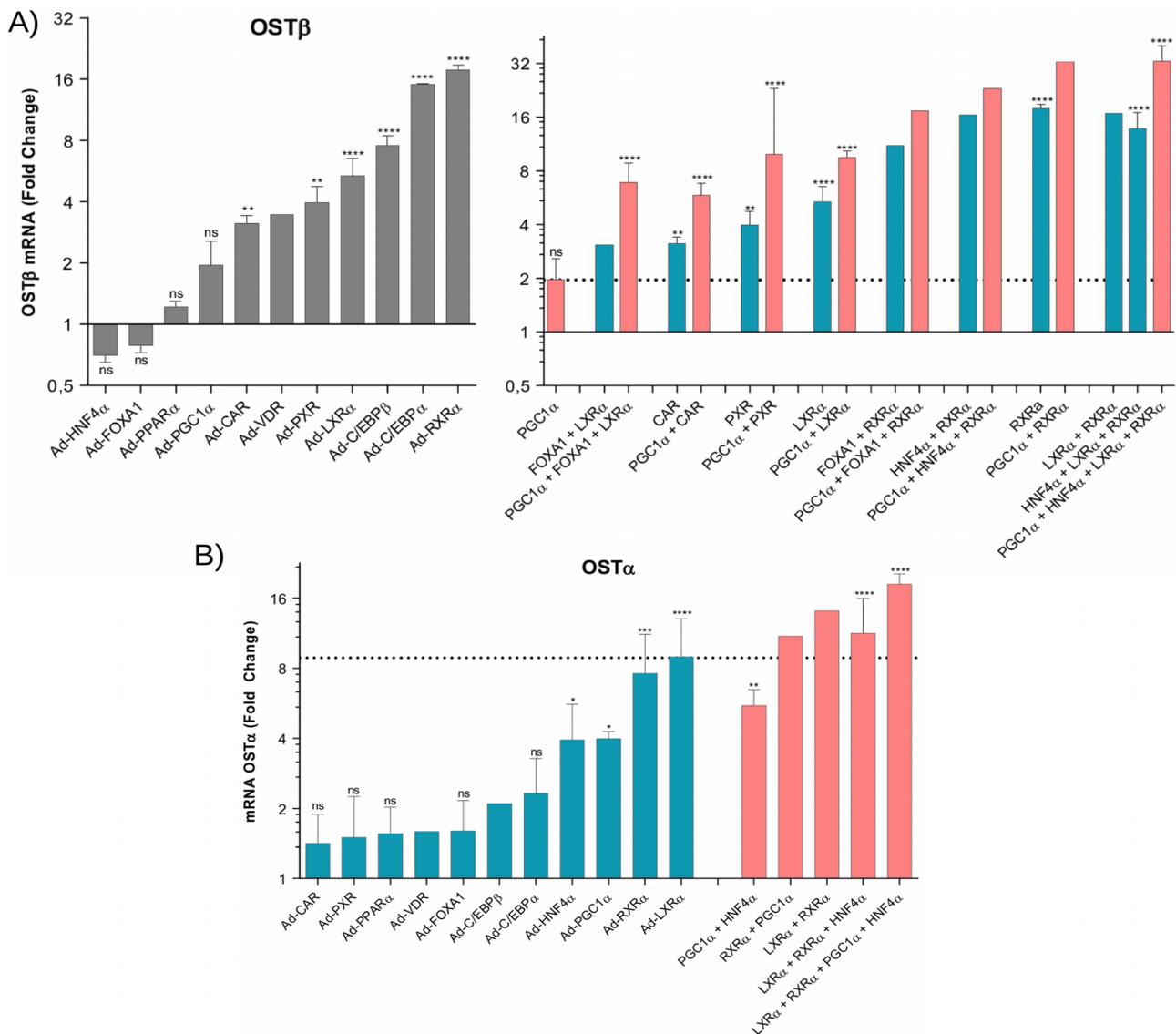


Figura 14: Inducción de OSTβ y OSTα por la sobreexpresión de factores de transcripción y combinación de los mismos. Se representa el fold-change de la expresión normalizada frente a GAPDH y HMBS (qRT-PCR) con respecto a HepG2 tratadas con un adenovirus control ± SEM. A) Se muestra a la izquierda el efecto en la expresión del mRNA de OSTβ por los diferentes factores de transcripción y a la derecha las combinaciones sinérgicas en las que participa PGC1α. B) Se observan en la misma imagen el aumento en la expresión del mRNA de OSTα producido por los factores de transcripción independientes (azul) y las sinergismos más destacados (rojo). Las muestras que presentan un indicador tienen un n=3 mientras que las que provienen de un experimento único no lo tienen. (ANOVA y test de Dunnett frente a HepG2 tratadas con adenovirus control: ns $p_v > 0,05$, * $p_v < 0,05$, ** $p_v < 0,01$, *** $p_v < 0,001$, **** $p_v < 0,0001$).

5.2.3. Transportadores canaliculares

Los transportadores canaliculares, en especial BSEP, tienen una importancia crucial en el correcto funcionamiento de la circulación enterohepática de los ácidos biliares. Tal y como se observa en la Figura 8, BSEP no se expresa en HepG2 a niveles detectables por qRT-PCR. Sin embargo, al sobreexpresar C/EBPα pasa a ser detectable (Figura 15). Esto se verifi-

có en todas las muestras de combinaciones de diferentes adenovirus que contienen C/EBPα. Además, junto con CAR, PGC1α, PPARα o PXR se produce una sinergia que aumenta la expresión más de 2 veces. Al igual que con OATP1B3, el nivel de expresión máximo sigue siendo 240 veces inferior al de un pool de 10 hígados humanos.

Para formar la bilis, como ya hemos dicho, no se necesitan solo ácidos biliares. El principal transportador de colesterol en la membrana canalicular del hepatocito es el formado por las subunidades ABCG5 y ABCG8, que actúan conjuntamente como un heterodímero.

De los respectivos datos de sobreexpresión de factores de transcripción (Figura 16) se deduce que: 1) HNF4 α es capaz de inducir la expresión de ABCG5 y ABCG8. 2) LXR α y RXR α presentan una inducción menor de ambas subunidades, que no ha sido estadísticamente significativa. Sin embargo, la combinación de ambas produce un aumento en el nivel de los mRNA que se aproxima al producido por HNF4 α . Además, ambos son capaces de contrarrestar el efecto represor de C/EBP α . 3) La represión producida por C/EBP α tiene un efecto dominante sobre la activación de HNF4 α . 4) La respuesta de los dos genes es similar, lo que sugiere mecanismos reguladores comunes.

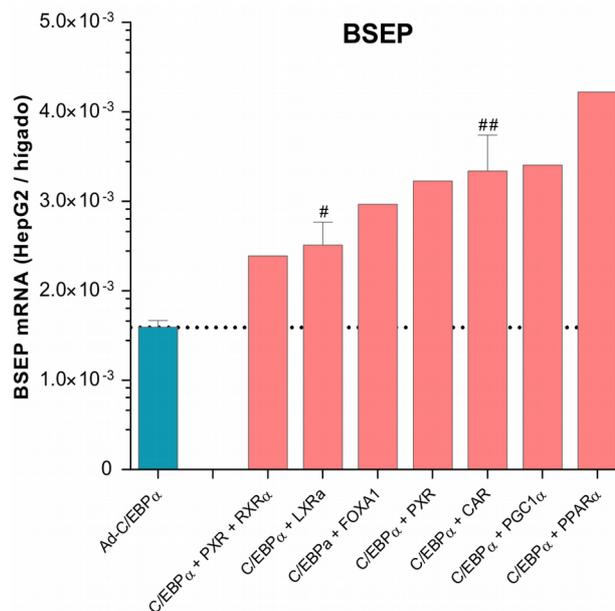
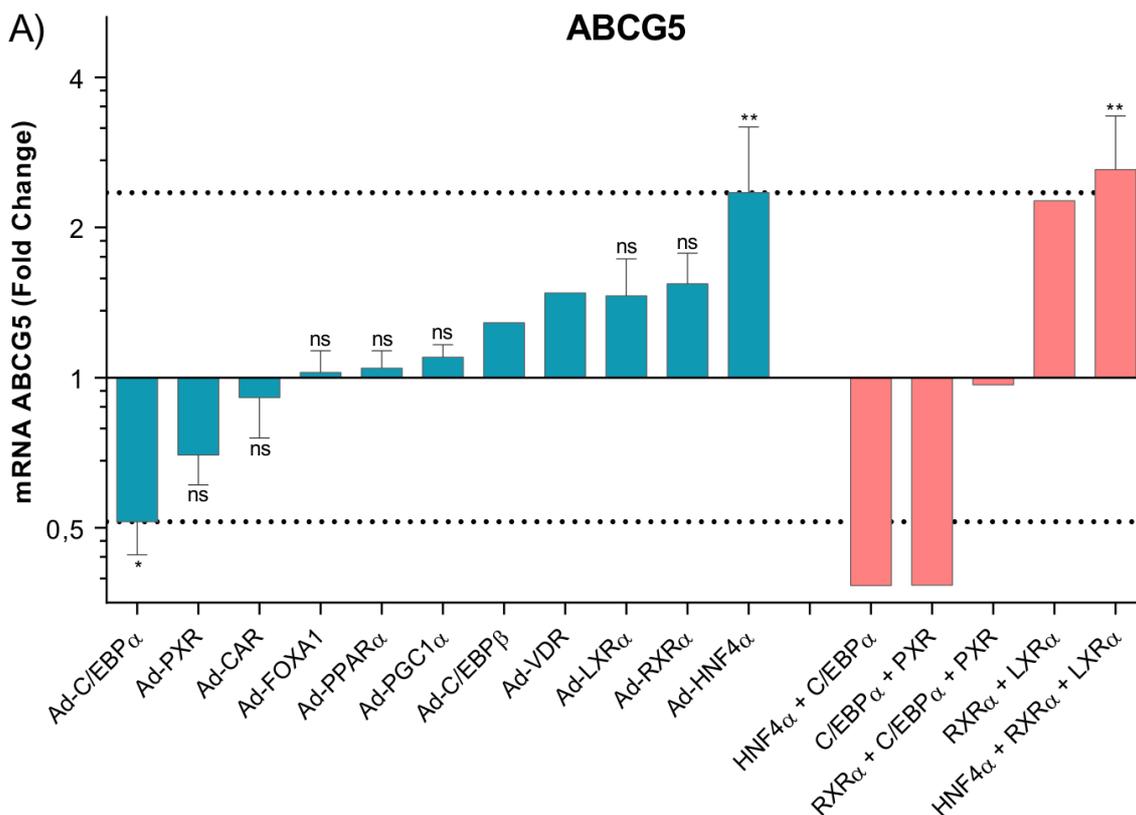


Figura 15: Inducción de BSEP por el factor de transcripción C/EBP α . Se representa el ratio de la expresión con respecto a una mezcla de cDNA de 10 hígados \pm error estándar de la media (SEM), medido por qRT-PCR. Todos los datos están normalizados frente a la expresión de GAPDH y HMBS. Se puede observar en azul el efecto de C/EBP α por separado y en rojo las combinaciones con otros factores de transcripción. (ANOVA y test de Dunnett frente a HepG2 tratadas con Ad-C/EBP α : # $p_v < 0,05$, ## $p_v < 0,01$).



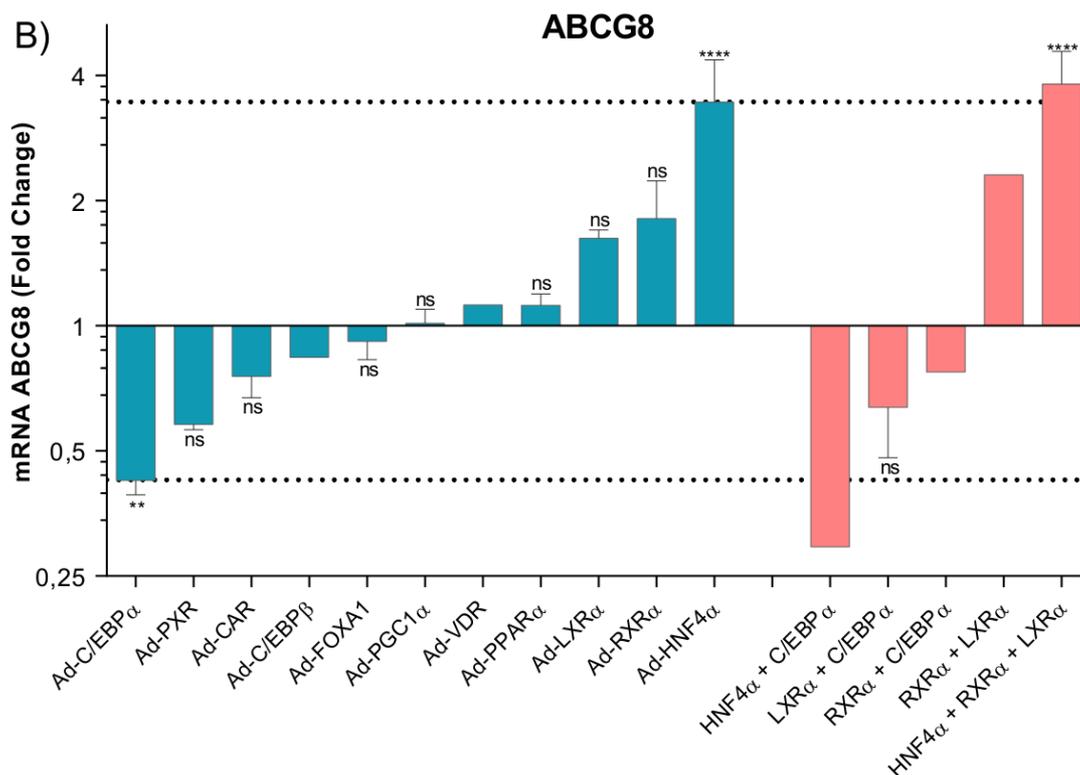


Figura 16: ABCG5 y ABCG8 son reprimidos por C/EBP α ; e inducidos por HNF4 α , LXR α y RXR α . Se representa el fold-change de la expresión normalizada frente a GAPDH y HMBS (qRT-PCR) con respecto a HepG2 tratadas con un adenovirus control \pm SEM. A) Se muestra en la página anterior el efecto en la expresión del mRNA de ABCG5 por los diferentes factores de transcripción (azul) así como el efecto sinérgico de RXR junto con LXR y la dominancia de la represión de C/EBP α que se ve con las combinaciones (rojo). B) En la imagen superior se observa el efecto en la expresión del mRNA de ABCG8 por los diferentes factores de transcripción, tanto individualmente (azul) como con ciertas combinaciones entre ellos (rojo). Las muestras que presentan un indicador tienen un n=3 mientras que las que provienen de un experimento único no lo tienen. (ANOVA y test de Dunnett frente a HepG2 tratadas con adenovirus control: ns $p_v > 0,05$, * $p_v < 0,05$, ** $p_v < 0,01$, *** $p_v < 0,001$, **** $p_v < 0,0001$).

Asimismo, MDR3 también es una proteína relevante en la formación de la bilis y en el correcto funcionamiento de la circulación enterohepática.

Permite el transporte de, principalmente, la fosfatidilcolina, que reduce la toxicidad de los ácidos biliares (Barrios *et al.*, 2000). En la Figura 17 se observa la regulación de MDR3 por la sobreexpresión de diferentes factores de transcripción, estudiada por qRT-PCR. Tan solo encontramos una inducción significativa (*fold-change* 2,6) por parte de RXR α , que actúa principalmente en heterodímeros con otros receptores nucleares.

Por otra parte, HNF4 α induce escasamente

la expresión de MDR3 (no significativo), pero su combinación con RXR α pone de manifiesto que podría ser un potencial activador de dicho transportador (Figura 17).

En cuanto a los posibles factores de transcripción represores parece claro que existe una tendencia de FOXA1 y PXR en la represión de MDR3. Se aprecia que ambos son capaces de reducir la inducción de RXR α . Además, al combinar FOXA1 o PXR con otros factores de transcripción se comprobó que la adición de los mismos producía una reducción en la expresión de MDR3 en todos los casos (10 y 6 combinaciones, respectivamente) (datos no mostrados).

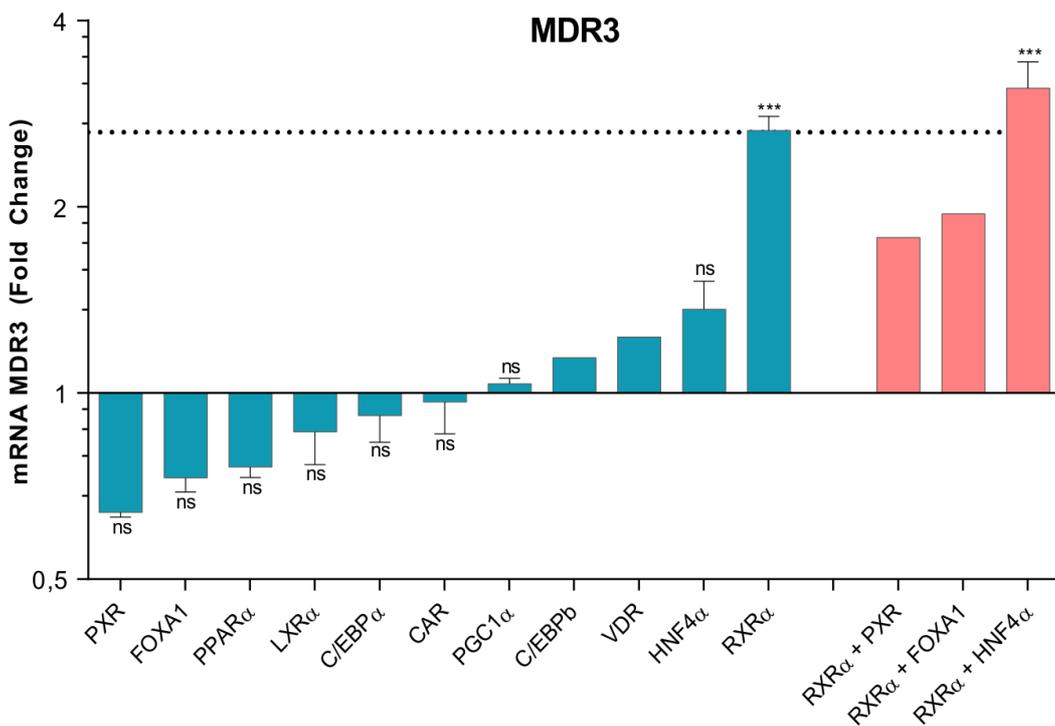


Figura 17: Inducciones y represiones de MDR3 producidas por diferentes factores de transcripción: Se representa el fold-change de la expresión normalizada frente a GAPDH y HMBS (qRT-PCR) con respecto a HepG2 tratadas con un adenovirus control \pm SEM. A) Se observa el efecto de sobreexpresión de los diferentes factores de transcripción individualmente (en azul), así como algunas combinaciones relevantes (en rojo). RXR α aumenta el nivel de mRNA de MDR3 significativamente, HNF4 α tiene un pequeño efecto inductor y PXR y FOXA1 son potenciales represores. (ANOVA y test de Dunnett frente a HepG2 tratadas con adenovirus control: ns $p_v > 0,05$, * $p_v < 0,05$, ** $p_v < 0,01$, *** $p_v < 0,001$, **** $p_v < 0,0001$).

MRP2 es un transportador que destaca por la secreción de bilirrubina conjugada hacia el canalículo biliar, de manera que resulta fundamental en la eliminación de dicho residuo.

En la Figura 18 se pueden apreciar los efectos de la sobreexpresión de los factores de transcripción en el nivel del mRNA de MRP2. Destaca la fuerte represión de C/EBP α , y C/EBP β , los cuales reducen su expresión 5 y 4 veces, respectivamente, con respecto al control.

Además, en el gráfico de la derecha se observa los siguientes hechos: 1) PGC1 α actúa como posible represor sinérgico junto con C/EBP α y HNF4 α (en rojo). Este papel represor se apoya también en que hay un total de 8 combinaciones de factores de transcripción, además de las mostradas en el gráfico, en las

que PGC1 α juega un papel represor. 2) Existen algunos factores de transcripción, en particular PPAR α y FOXA1, que potencian la represión de MRP2 junto con C/EBP α (7 y 9 veces menor que el control, respectivamente, en amarillo). 3) Aunque PXR no induce MRP2 de manera significativa en nuestro experimento, las combinaciones con otros factores de transcripción indican una tendencia del mismo a aumentar el nivel de mRNA de MRP2 en todos los casos (en verde)

Por último, en el canalículo biliar existen 2 proteínas que transportan fundamentalmente fármacos: BCRP y MDR1 hacia la circulación biliar. Sin embargo, podrían tener también un papel menor el transporte de ácidos biliares, tal y como hemos explicado en la Sección 2.3.3.

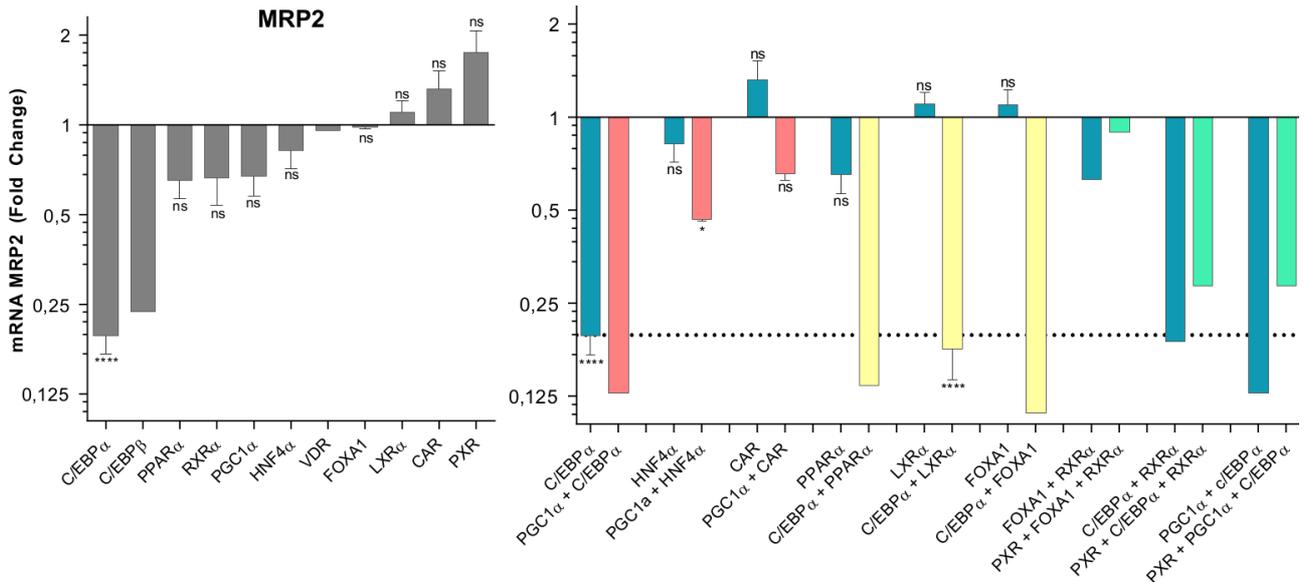


Figura 18: Inducciones y represiones de MRP2 producidas por diferentes factores de transcripción. Se representa el fold-change de la expresión normalizada frente a GAPDH y HMBS (qRT-PCR) con respecto a HepG2 tratadas con un adenovirus control \pm SEM. A la izquierda se observan las muestras tratadas con los adenovirus de los diferentes factores de transcripción de manera independiente, donde destaca la represión de C/EBP α y C/EBP β . A la derecha se muestran algunas combinaciones de relevancia de PGC1 α (en rojo), C/EBP α (en amarillo) y PXR (en verde). Las muestras que presentan un indicador tienen un n=3 mientras que las que provienen de un experimento único no lo tienen. (ANOVA y test de Dunnett frente a HepG2 tratadas con adenovirus control: ns $p_v > 0,05$, * $p_v < 0,05$, ** $p_v < 0,01$, *** $p_v < 0,001$, **** $p_v < 0,0001$).

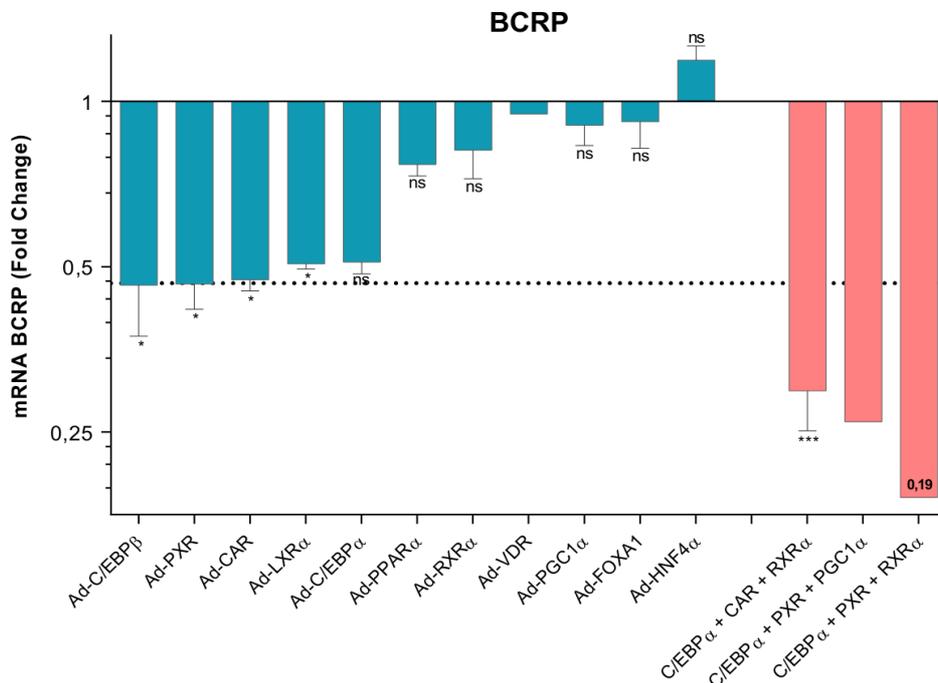


Figura 19: Represión de BCRP dirigida por C/EBP β , PXR, CAR, LXRA y C/EBP α . Se representa el fold-change de la expresión normalizada frente a GAPDH y HMBS (qRT-PCR) con respecto a HepG2 tratadas con un adenovirus control \pm SEM. Se observan las muestras tratadas con los adenovirus de los diferentes factores de transcripción de manera independiente (azul), así como combinaciones sinérgicas en las que se pone de manifiesto el papel represor de C/EBP α (rojo). Las muestras que presentan un indicador tienen un n=3 mientras que las que provienen de un experimento único no lo tienen. (ANOVA y test de Dunnett frente a HepG2 tratadas con adenovirus control: ns $p_v > 0,05$, * $p_v < 0,05$, ** $p_v < 0,01$, *** $p_v < 0,001$).

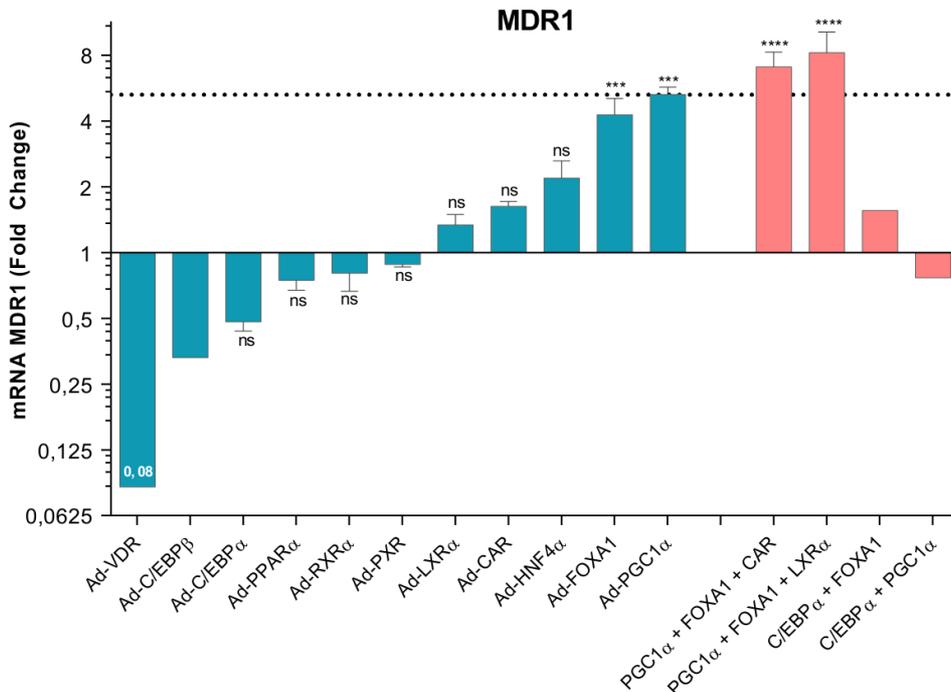


Figura 20: Inducciones y represiones de MDR1 producidas por diferentes factores de transcripción. Se representa el fold-change de la expresión normalizada frente a GAPDH y HMBS (qRT-PCR) con respecto a HepG2 tratadas con un adenovirus control \pm SEM. En azul se aprecian las muestras con diferentes factores de transcripción sobreexpresados. Mientras que VDR, C/EBP β y C/EBP α son los factores que más reducen el nivel de mRNA del transportador MDR1, PGC1 α y FOXA1 producen una inducción. En rojo se ve el efecto sinérgico activador entre FOXA1 y PGC1 α así como la capacidad de C/EBP α para contrarrestar la inducción de FOXA1 y PGC1 α . Las muestras que presentan un indicador tienen un n=3 mientras que las que provienen de un experimento único no lo tienen. (ANOVA y test de Dunnett frente a HepG2 tratadas con adenovirus control: ns $p_v > 0,05$, * $p_v < 0,05$, ** $p_v < 0,01$, *** $p_v < 0,001$).

Como se observa en la Figura 19, BCRP es reprimido por la sobreexpresión individual de C/EBP β , PXR, CAR y LXR α . Además, C/EBP α también parece tener un papel represor ya que está presente en las combinaciones sinérgicas junto con PXR y CAR. Se llega a alcanzar una reducción máxima en el nivel de mRNA de más de 5 veces con respecto al control.

En este sentido, la combinación de C/EBP α y PXR produce una disminución en el mRNA de BCRP de más del doble con respecto a cualquiera de los dos factores por separado. El mismo hecho se observa entre C/EBP α y CAR.

Hay que tener en cuenta que los resultados del presente experimento están constreñidos a las combinaciones entre diferentes factores de transcripción que se realizaron (Tabla S4). Por tanto, debido a la ausencia de combinaciones

entre C/EBP β y otros factores, no se han detectado otras posibles mezclas más represoras.

En cuanto a MDR1, destaca la gran represión (~12 veces con respecto al control) producida por VDR. Aunque el dato proviene de un único experimento, es una reducción muy potente en el nivel de mRNA. Por su parte, el factor de transcripción FOXA1 y el coactivador PGC1 α producen una inducción significativa en la expresión de MDR1, y las combinaciones entre ambos potencian aún más este efecto. C/EBP α y C/EBP β también tienen un posible efecto represor, a juzgar por la capacidad del primero de contrarrestar la activación producida tanto por FOXA1 como por PGC1 α (Figura 20).

En suma, la mayoría de transportadores hepato-biliares muestran una regulación muy

amplia, dirigida por multitud de factores de transcripción (Tabla 2). En general, no se observa un patrón de respuesta común entre diferentes transportadores: un mismo factor puede ser activador en un caso y represor en otro. Tampoco encontramos combinaciones que, en general, sean activadoras o represoras.

5.3. Análisis de los elementos de respuesta del promotor del gen *SLC51B*

Teniendo en cuenta las represiones e inducciones encontradas y su interés potencial, se decidió focalizar el proyecto en describir de manera más concreta las interacciones entre el promotor del gen *SLC51B* (OST β) y los diferentes factores de transcripción, tratando de encontrar también la localización precisa de dichas interacciones.

Para ello se realizaron ensayos reporteros en los que se estudió el promotor putativo de *SLC51B*, sobreexpresando individualmente diferentes factores de transcripción que han mostrado capacidad inductora en los experimentos de qRT-PCR. Los factores de transcripción elegidos fueron C/EBP α , C/EBP β , RXR α , LXR α , VDR, CAR y PXR, así como el coactivador PGC1 α .

Utilizando datos bibliográficos junto con información epigenética del proyecto ENCODE (del inglés, *Encyclopedia of DNA Elements*), se decidió clonar la región *upstream* al sitio de inicio de la transcripción del gen, [-1221, +202], y una región intrónica [+1120,+4539] (Lee *et al.* 2006; Landrier *et al.*, 2006). Se denomina +1 al sitio de inicio de la transcripción descrito en la base de datos Ensembl (ENST00000334287.2). Se realizaron construcciones junto con el vector pGL4.10, que contiene el gen de luciferasa sin promotor, con el fin de analizar la actividad transcripcional.

Sin embargo, tan solo la región [-1221, +202] mostró señal en los experimentos, mientras que el amplicón [+1120,+4539] no mostró capacidad promotora basal ni un aumento en la actividad luciferasa con ninguno de los factores de transcripción estudiados (datos no mostrados).

Por ello, se realizaron nuevas construcciones con fragmentos de la región [-1221, +202] (#0) para apreciar la distribución física de los elementos de respuesta: [-776, +202] (#1), [-350, +202] (#2), [-74, +202] (#3) y [0, +202] (#4) (Figura 21A).

En el esquema están indicados 2 elementos de respuesta ya descritos en el promotor de *SLC51B*. Uno de ellos es un IR1 (repetición invertida con separación de 1 base, del inglés *inverted repeat*), al cual está descrita la unión como activador transcripcional de FXR/RXR α (Landrier *et al.*, 2006). El otro es un DR5 (repetición directa con 5 bases de separación, del inglés *direct repeat*). al cual se le une CAR/RXR α y RAR α /RXR α (Xu *et al.*, 2014).

Existe un nivel de transcripción basal elevado en las HepG2 tratadas con el adenovirus control, especialmente en el fragmento denominado #0 ([-1221, +202]), que se manifiesta en la actividad luciferasa de luciérnaga con respecto a la luciferasa del vector de normalización (Renilla) (Figura 21B). Esto es lógico, teniendo en cuenta que, de hecho, *SLC51B* es un gen con una expresión apreciable en HepG2 (Figura 8).

En todos los casos, los datos de actividad luciferasa de las HepG2, tratadas con adenovirus para sobreexpresar los factores de transcripción, se dividieron con respecto a estos datos basales, para obtener el *fold-change* que representa el aumento en la actividad luciferasa con respecto a la basal.

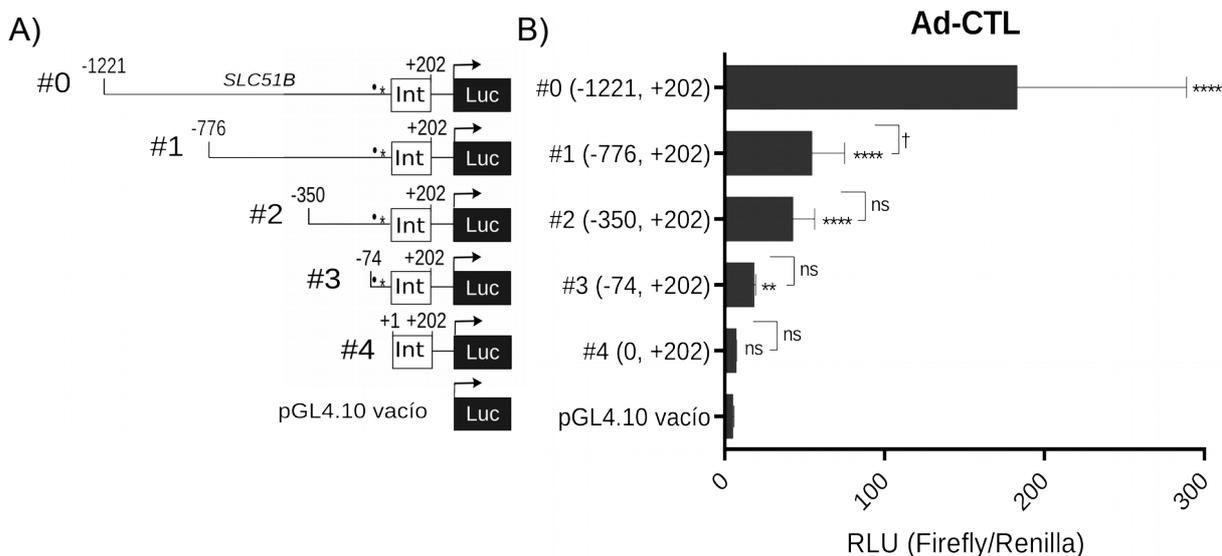


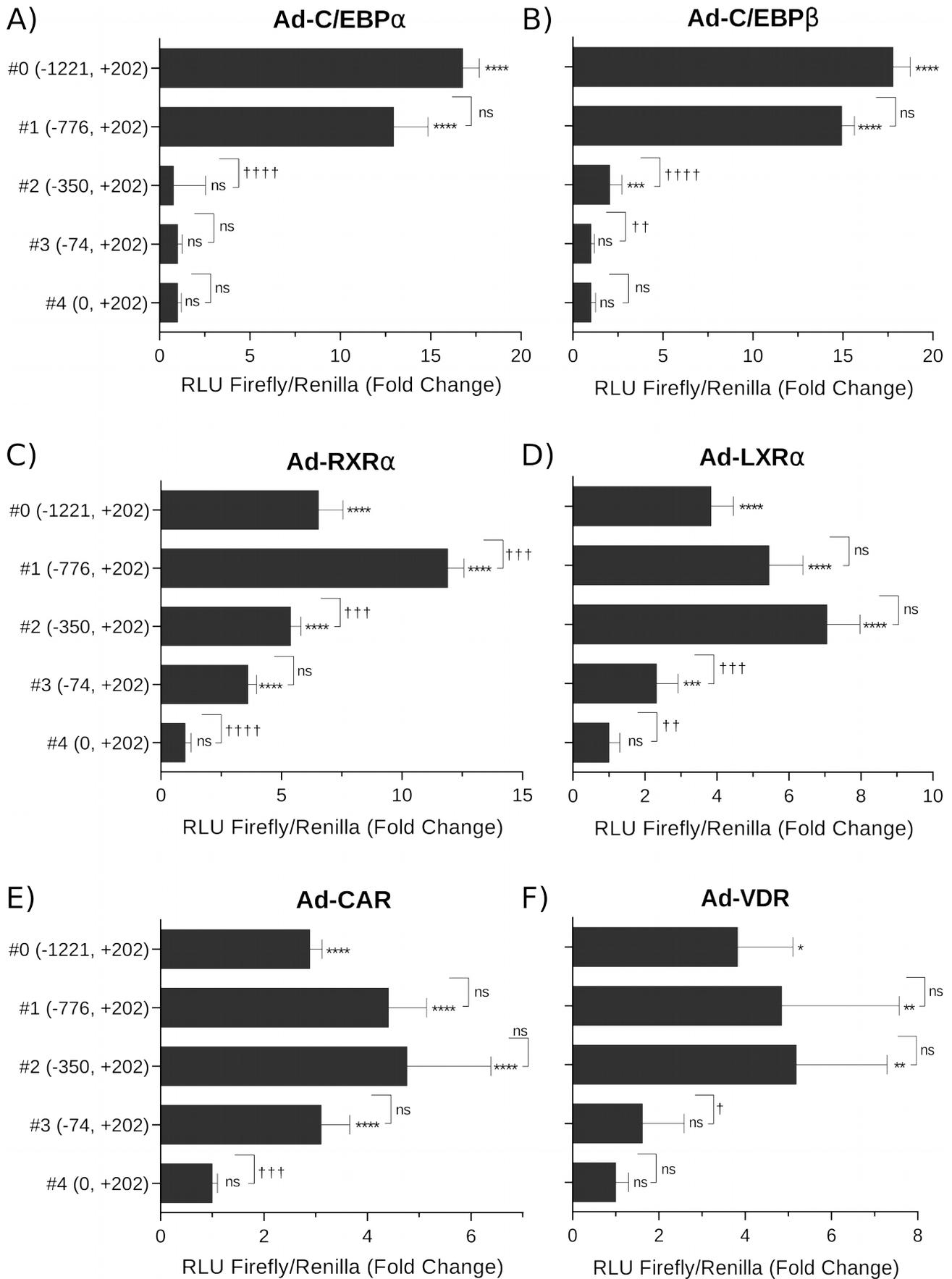
Figura 21: Esquema de los vectores utilizados en los ensayos reporteros y valores basales de actividad luciferasa. A) En este esquema se observa la composición de los vectores. Se han clonado fragmentos del promotor de SLC51B cada vez más pequeños (misma parte 3', diferente 5') en el vector pGL4.10 para localizar los elementos de respuesta a los diferentes factores de transcripción. Se indica con un * el sitio IR-1 (FXR/RXR α) y con un • el sitio DR5 (CAR/RXR α). B) Se representan los datos de RLU (Relative light units) de la luciferasa de luciérnaga / luciferasa Renilla \pm SD (desviación estándar), de las muestras tratadas con el adenovirus control. La transcripción basal no es igual en todos los vectores, la del fragmento #0 es la más alta. Se indica el p-valor de cada muestra comparada con el pGL4.10 vacío (*) y, sobre las llaves, la comparación de la muestra con la anterior(†). El n de las muestras es 3-6 experimentos independientes. Se ha realizado un ANOVA de un factor y test de Tukey. (ns $p_v > 0,05$, * o † $p_v < 0,05$, ** $p_v < 0,01$, *** $p_v < 0,001$, **** $p_v < 0,001$).

En el caso de C/EBP α , se constató que su sobreexpresión causa un aumento notable en la actividad luciferasa, de un máximo de 17 veces con respecto a la actividad basal del vector correspondiente (Figura 22A). La actividad del fragmento #0 fue equivalente a la del #1, pero en el #2 se perdió totalmente. Por tanto, la zona en el que se sitúan el o los elementos de respuesta a los que se está uniendo C/EBP α está comprendida entre -776 y -350.

Del mismo modo, en el caso de C/EBP β ocurrió algo muy similar. La diferencia fue que, en este caso, el fragmento #2 conservó actividad luciferasa, aunque significativamente más baja que la del fragmento #1 (Figura 22B). Esto indica que es posible que exista un elemento de respuesta para C/EBP β en la región entre -350 y -74. No obstante, los más relevantes, estarían, de la misma manera, entre -776 y -350.

RXR α es un receptor nuclear que actúa en forma de heterodímero con un amplio abanico de receptores nucleares, entre los que se incluye a FXR, LXR, CAR, PXR y PPAR, aunque también puede actuar independientemente, formando un homodímero (Evans and Mangelsdorf, 2014).

Como resultado de su sobreexpresión observamos que produce una actividad luciferasa significativamente diferente al control en todos los fragmentos, del #0 al #3, mientras que el fragmento #4 la pierde (Figura 22C). Sin embargo, hay una diferencia relevante entre el fragmento #0 y #1, y entre el #1 y #2, lo cual indica que podría estar actuando uniéndose a 3 o más elementos de respuesta diferentes a lo largo de la región comprendida entre -1221 y 0, que podrían ser de RXR α como homodímero, o de cualquiera de los factores con los que actúa en forma de heterodímero.



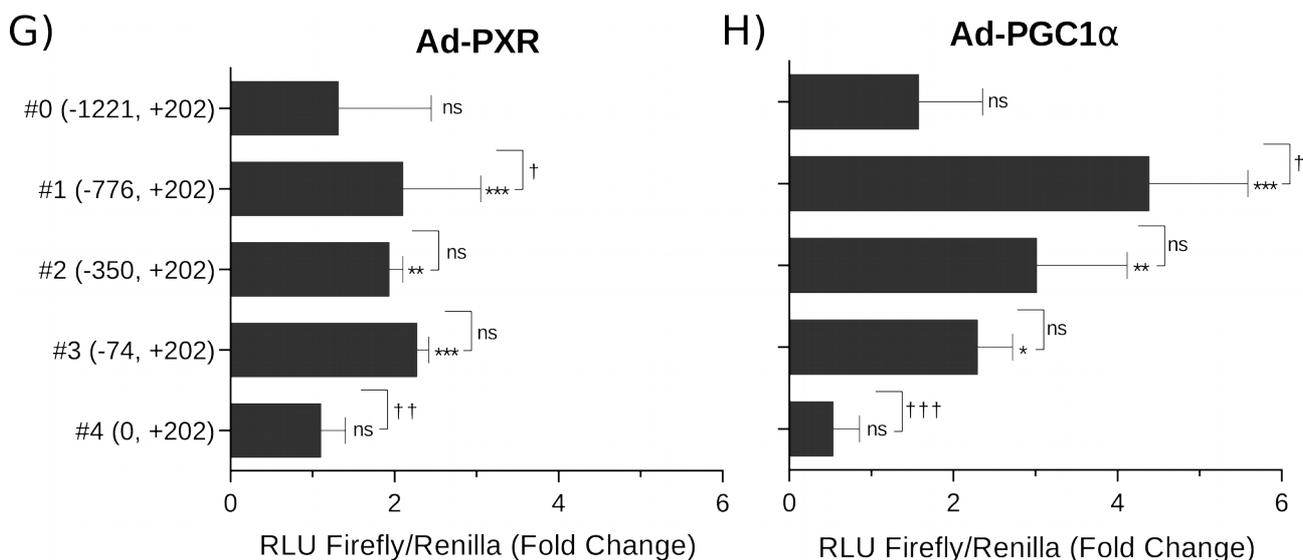


Figura 22: Aumento de la actividad luciferasa del promotor de SLC51B por la sobreexpresión de diferentes factores de transcripción. Se representa el fold-change de los RLU (Relative light units) de la luciferasa de luciérnaga (amplicones en vector pGL4.10) divididas entre las RLU de la luciferasa de Renilla (vector control Renilla-pGL4.10), con respecto a las muestras control tratadas con los vectores respectivos y el adenovirus control \pm SD (desviación estándar). El aumento en esta actividad indica una acción de los factores de transcripción en la secuencia promotora que incrementa la tasa de transcripción. Se indica el p-valor de cada muestra comparada con el pGL4.10 vacío (*), y sobre las llaves, la comparación de cada muestra con la anterior (†). El n de las muestras es 3-6 experimentos independientes. Se ha realizado un ANOVA de un factor y test de Tukey. (ns $p_v > 0,05$, * o † $p_v < 0,05$, ** o †† $p_v < 0,01$, *** o ††† $p_v < 0,001$, **** o †††† $p_v < 0,001$).

Por su parte, LXR α produjo una actividad luciferasa superior al control y equivalente en los amplicones #0, #1 y #2 (máximo de ~7 veces superior al control) (Figura 22D). En el amplicón #3 se observó una bajada significativa de la señal con respecto al #2, pero ésta sigue siendo superior al control. Por tanto, los resultados sugieren una interacción múltiple de LXR α , en más de un elemento de respuesta situados en amplicones diferentes. La zona más relevante estaría entre -350 y -74, pero habría también unión entre -74 y 0.

CAR produjo un aumento de la actividad luciferasa similar en los vectores correspondientes a los amplicones #0, #1, #2 y #3, mientras que el amplicón #4 tuvo una señal equivalente al control (Figura 22E). Esto sugiere que la unión de este receptor nuclear se produce entre el fragmento #3 y el #4, es decir, entre -74 y 0.

La sobreexpresión de VDR produjo un aumento en el ratio de actividad luciferasa de hasta 5 veces con respecto al control (Figura 22F). Los fragmentos #0, #1 y #2 no tuvieron diferencias sustanciales entre ellos, mientras que el #3 no presentó una actividad significativamente distinta al control, al igual que el #4. Por tanto, VDR actúa probablemente entre el fragmento #2 y #3, es decir, entre -350 y -74.

En cuanto a PXR, el amplicón #0 no tuvo una actividad significativamente diferente al control, mientras que, en los amplicones #1, #2 y #3, PXR produjo un efecto significativo, pero muy pequeño (~2 veces superior al control) (Figura 22G).

Por último, PGC1 α fue la única proteína sobreexpresada en los experimentos que no es un factor de transcripción. Presenta una función coactivadora de receptores nucleares como FXR, LXR α , PPAR α y HNF4 α . En los ensayos

reporteros mostró una situación similar a la de PXR: el amplicón #0 no aportó una actividad significativamente diferente al control, a diferencia del #1, #2 y #3. En este caso, la señal máxima recayó en el fragmento #1 (~4,4 veces superior al control) mientras que el #2 y el #3 mostraron una tendencia descendente que no resultó estadísticamente significativa (Figura 22H). Como era de esperar, el amplicón #4 no presentó una actividad superior al control. A juzgar por estos datos, la zona en la que PGC1 α parece tener una mayor actividad está comprendida entre -74 y 0, pero no se puede descartar que actúe junto con los factores de transcripción en otras secciones del promotor de *SLC51B*.

5.4. Regulación de la síntesis de ácidos biliares mediada por C/EBP α y C/EBP β

Como se ha expuesto en la introducción, CYP7A1 es la enzima limitante en la síntesis de ácidos biliares. En la bibliografía existen descritas múltiples interacciones entre los factores de transcripción y el promotor de *CYP7A1*. En este sentido, se conoce que FXR:RXR α (Nagano *et al.*, 2004), PPAR α (Marrapodi *et al.*, 2000) y PXR (Bhalla *et al.*, 2004) inhiben la expresión del mRNA, mientras que HNF4 α (Bhalla *et al.* 2004) la induce. Además, se ha descrito la represión del gen mediada por PPAR α :LXR α (Gbaguidi and Agellon, 2004), y existe controversia sobre si VDR tiene una acción inductora o inhibidora sobre el gen, en los hepatocitos humanos (Chow *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2010)

Sin embargo, hasta la fecha nunca se ha estudiado el papel de los C/EBP en la regulación de esta enzima. Por tanto, se decidió medir por qRT-PCR el nivel del mRNA de *CYP7A1* para intentar encontrar diferencias en la expresión producidas por estos factores de transcripción. Además, esto permitiría complementar los da-

tos relacionados con la regulación de los transportadores hepatobiliares.

En la Figura 23 se observa que tanto C/EBP α como de C/EBP β reprimen de manera muy potente (10,6 y 9,1 veces menor que el control, respectivamente) la expresión del mRNA de *CYP7A1*. Por tanto, si este efecto ocurriera también en el hígado humano, la inducción de C/EBP α o C/EBP β sería capaz de reducir la síntesis de ácidos biliares en los hepatocitos.

Con el fin de integrar la información mostrada hasta el momento relacionada con estos factores de transcripción, en la Figura 23 también se han representado los datos ya explicados en el apartado 5.2. C/EBP α y C/EBP β tienen, en resumen, la capacidad de activar transportadores sinusoidales de entrada (NTCP y OATP1B3) y el transportador sinusoidal de salida OST α /OST β así como de inhibir la mayoría de los canaliculares, con la excepción de BSEP, el cual activa.

Por su alta expresión en tejido hepático y sus genes diana, que incluyen transportadores hepatobiliares y la enzima clave en la biosíntesis de ácidos biliares, los factores de transcripción C/EBP podrían tener un rol destacado en la regulación transcripcional de la homeostasis de ácidos biliares.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los transportadores hepatobiliares presentan una regulación muy compleja, dirigida por múltiples factores de transcripción que pueden actuar de manera sinérgica o competir por los mismos elementos de respuesta.

En este estudio, hemos constatado numerosas relaciones potenciales entre los factores de transcripción y los transportadores hepatobiliares, que constituyen posibles genes diana,

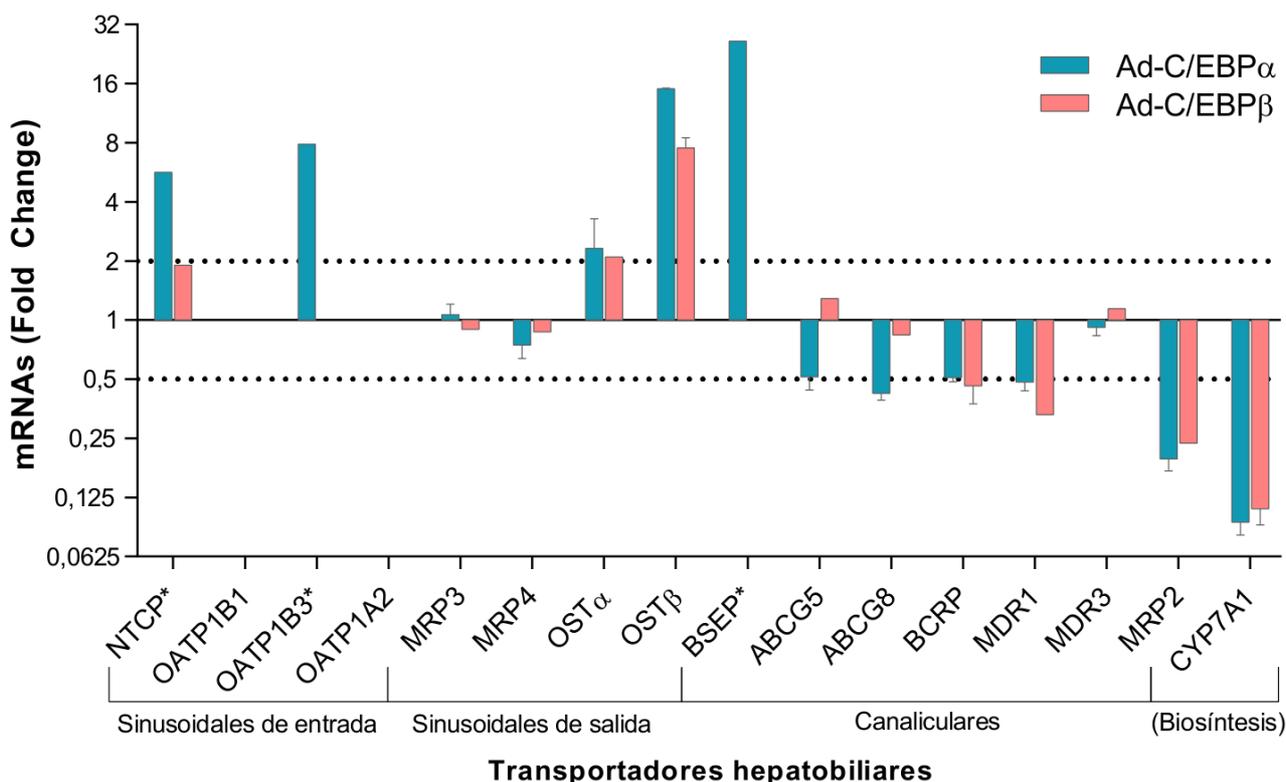


Figura 23: Efecto de C/EBP α y C/EBP β en la expresión de los transportadores hepato biliarios y CYP7A1. Se representa el fold-change de la expresión normalizada frente a GAPDH y HMBS (qRT-PCR) con respecto a HepG2 tratadas con un adenovirus control \pm SEM. En azul se observa la expresión en HepG2 tratadas con el adenovirus Ad-C/EBP α , y en rojo las tratadas con Ad-C/EBP β . Los datos de los transportadores con un asterisco (*) deben ser interpretados con cautela; ya que su expresión basal en HepG2 es nula, la activación por los C/EBP tiene un valor cualitativo más que cuantitativo. El fold-change en esos casos es tan solo una estimación utilizando un Cp elevado arbitrario (37). Por otra parte, OATP1B1 y OATP1A2 no se detectaron en nuestro sistema experimental con lo que no puede descartarse un efecto activador o represor. La significación estadística se puede observar en las figuras de cada uno de los transportadores (Figuras 11-20). También se representa la represión de CYP7A1 por C/EBP α y C/EBP β (ANOVA y test de Dunnet $p_v < 0,0001$).

haciendo uso de la línea celular HepG2 (Tabla 2). Aunque existen trabajos que describen la regulación de algunos transportadores, nunca se ha publicado un estudio global que abarque tantos factores de transcripción y transportadores diferentes.

En este sentido, nuestros resultados confirman algunos hallazgos ya descritos en otros modelos experimentales, además de aportar nuevos datos no existentes a día de hoy. A continuación vamos a realizar un análisis exhaustivo de los resultados de cada uno de los transportadores hepato biliarios, contrastándolos con los presentes en la bibliografía.

6.1. Regulación de los transportadores sinusoidales de entrada

Los transportadores sinusoidales de entrada apenas se expresan en HepG2 (Figura 8). Por tanto, dadas las limitaciones de nuestro planteamiento experimental, tan solo pudimos encontrar inducciones que hicieran detectables los mRNA por qRT-PCR, pero no represiones.

En cuanto a NTCP, la principal vía de entrada de ácidos biliarios a través de la membrana sinusoidal, hemos puesto de manifiesto un papel activador de RXR α , HNF4 α , PGC1 α , C/EBP α y C/EBP β , en nuestras condiciones experimentales (Figura 11). RXR α constituye un heterodímero junto con muchos otros recepto-

Tabla 2: Visión general de las relaciones regulatorias entre los factores de transcripción y los transportadores hepatobiliares descritas en nuestro estudio. Los símbolos +, ++, +++ y ++++ representan inducciones y los símbolos -, --, --- y ---- represiones (de intensidad creciente).

		Receptores nucleares						Liver-enriched transcription factors				Coact.
		CAR	LXR α	PPAR α	PXR	RXR α	VDR	C/EBP α	C/EBP β	FOXA1	HNF4 α	PGC1 α
Basolaterales (de entrada)	NTCP					+++		+	+		+++	++
	OATP1B1											
	OATP1B3		+	+		++		+		+++		
Basolaterales (de salida)	MRP3									--		-
	MRP4											
	OST α		++++			++++					++	++
	OST β	+++	+++		+++	++++	+++	++++	++++			+
Canaliculares	BSEP							+++				
	ABCG5		+			+		-			++	
	ABCG8		+			+		--			+++	
	MDR3				-	++				-	+	
	MRP2				+			---	---			-
	BCRP	--	--		--			-	--			
	MDR1						----	-	-	+++		+++

res nucleares (Evans *and* Mangelsdorf, 2014). Por ello, resulta complicado extraer conclusiones de una activación producida por su sobreexpresión, ya que podría estar actuando en forma de homodímero o como heterodímero con otros factores. Sin embargo, está descrito que el heterodímero RAR:RXR α transactiva el gen *Ntcp* de rata (Li *et al.*, 2002; Denson *et al.*, 2000). Por tanto, el aumento de NTCP por la sobreexpresión de RXR α podría deberse a este hecho y, quizás, también a la acción del homodímero RXR α :RXR α , o a otros heterodímeros.

Por otra parte, en esos mismos trabajos se constató, mediante ensayos reporteros, que el promotor de *Ntcp* de rata se activa por la acción de C/EBP β y C/EBP α (en forma de heterodímero y homodímeros), de manera coherente con nuestros resultados. Esto sugiere que esta regulación está conservada en células humanas.

Además, está descrito que el ayuno, en ratas, produce un aumento en la expresión proteica de *Ntcp* mediado por HNF4 α y PGC1 α y que la sobreexpresión de ambos en HepG2 aumenta el nivel de mRNA de NTCP, tal y

como sucedió en nuestro caso. El sinergismo observado entre HNF4 α y RXR α y entre PGC1 α y RXR α indica que ambas vías de regulación tienen un efecto cooperativo, superior a cualquiera de las dos por separado (Dietrich *et al.*, 2007; Geier *et al.*, 2008).

Por otra parte, en estudios previos se ha visto la capacidad del heterodímero FXR:RXR α de transactivar OATP1B3, lo cual concuerda con la activación producida por RXR α , según nuestros resultados (Figura 12) (Jung *et al.*, 2002). Además, aunque en la bibliografía existen datos de la inducción de OATP1B1 por parte de LXR α :RXR α (en hepatocitos primarios humanos), no se pudo constatar el mismo efecto en OATP1B3 por LXR α (Meyer Zu Schwabedissen *et al.*, 2010). Como contraste, en nuestro estudio hemos observado un aumento en el nivel de su mRNA mediante la sobreexpresión de LXR α y la adición de su ligando. Esta diferencia experimental puede deberse, precisamente, a que en dicho estudio tan solo añadieron el ligando a las células (T0901317), sin la sobreexpresión del factor de transcripción, que podría haber proporcionado un efecto de mayor relevancia, detectable. Además, los

hepatocitos primarios tienen un nivel basal de OATP1B3 más elevado que las HepG2, de manera que su inducción podría resultar más difícil.

Del mismo modo, HNF4 α también activa OATP1B1 a través de la inducción de HNF1 α , pero este efecto en OATP1B3 no se ha descrito hasta la fecha. Aunque OATP1B1 ha sido generalmente más estudiado, parece lógico que OATP1B3 tenga una regulación paralela, ya que ambos transportadores tienen funciones muy similares.

Curiosamente, en nuestro experimento se aprecia una inducción por parte de FOXA1 que además resulta sinérgica junto con RXR α (Figura 12). En un estudio se ha trazado una red de interrelaciones entre diferentes factores de transcripción de relevancia hepática, en la cual se observa una jerarquía regulatoria entre FOXA1, RXR α , HNF4 α y C/EBP α (Tomaru *et al.*, 2009) (Figura 24). De este modo, hipotetizamos que la sobreexpresión de FOXA1 y RXR α podría contribuir a la activación del mismo circuito regulatorio, en el que también participaría HNF4 α .

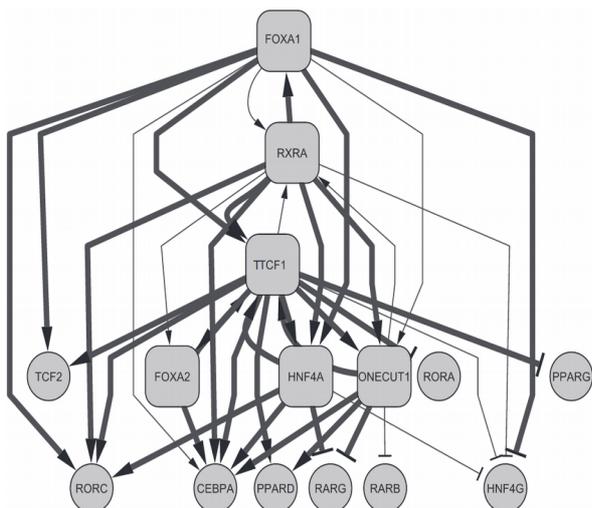


Figura 24: Hipotética red regulatoria transcripcional en HepG2. Se muestran las relaciones regulatorias positivas (punta de flecha) y negativas (punta en T). Imagen extraída de Tomaru *et al.*, 2009.

FOXA1 y RXR α se sitúan *upstream* en esta hipotética red regulatoria, ya que influyen a su vez sobre otros factores de transcripción como HNF4 α y C/EBP α . Esto resulta coherente con nuestros resultados, en los que FOXA1 y RXR α presentan el mayor efecto (al poder influir, pleiotrópicamente, sobre varios factores de transcripción) mientras que C/EBP α , LXR α y PPAR α por separado tienen un efecto menor.

Sin embargo, el hecho de que la sobreexpresión de HNF4 α no haya hecho detectable el mRNA de OATP1B3 iría en contra de esta hipótesis. Esto podría explicarse por la abundante expresión de HNF4 α en HepG2 (similar a la del hígado). Es posible que el HNF4 α endógeno esté produciendo una activación, y que la sobreexpresión con Ad-HNF4 α no aporte una activación adicional al gen.

6.2. Regulación de los transportadores sinusoidales de salida

Los transportadores sinusoidales de salida aportan, en el hepatocito, un mecanismo de escape alternativo para los ácidos biliares cuando éstos se acumulan anormalmente en la célula. Su sobreexpresión en los hepatocitos es una característica típica de la respuesta adaptativa frente a la colestasis, ya que evitan daños debidos a la citotoxicidad de los ácidos biliares. Las principales proteínas de este grupo son MRP4, MRP3 y el heterodímero OST α /OST β .

MRP4 transporta mayoritariamente ácidos biliares sulfatados hacia el exterior celular. Está descrito que su sobreexpresión durante la colestasis está coordinada con la de SULT2A1 a través del receptor nuclear CAR, al menos en ratones (Assem *et al.*, 2004).

Mediante ensayos reporteros en HepG2 se ha comprobado que FXR:RXR α inhibe la activación de MRP4 producida por CAR:RXR α

(Renga *et al.*, 2011). Además, en ratones se ha encontrado un aumento en la expresión de MRP4 por la acción de PPAR α , activado por su ligando clofibrato (Moffit *et al.*, 2006).

En nuestro experimento no encontramos ninguna represión o activación significativa de MRP4 por la sobreexpresión de ninguna de los factores de transcripción junto con sus ligandos. Esto hecho puede deberse, en parte, a unas condiciones experimentales diferentes. Por ejemplo, en Renga *et al.*, 2011 se utilizó como inductor de CAR una concentración 20 veces mayor (10 μ M) que la utilizada en nuestro experimento. Por otra parte, MRP4 también es un transportador de fármacos que se sobreexpresa en células tumorales como las HepG2. Por tanto, es posible que se haya perdido el control transcripcional existente en modelos animales y en hepatocitos humanos.

MRP3 es un transportador que, al igual que MRP4, se induce en los hepatocitos en condiciones colestásicas. Expulsa preferentemente bilirrubina y ácidos biliares conjugados hacia el exterior celular. Según la bibliografía, MRP3 se induce por la acción de un ligando de PXR, la rifampicina, en HepG2 (Teng *et al.*, 2003). Además, al igual que en el caso de MRP4, también se ha descrito un efecto activador sobre el gen *Mrp3* de ratón por parte de PPAR α y el clofibrato (Moffit *et al.*, 2006). Sin embargo, en otro artículo posterior encontraron un aumento en la tasa de transcripción del promotor de *Mrp3* por la acción de VDR:RXR α , pero no de PXR:RXR α ni de PPAR α :RXR α , lo cual contradice los resultados anteriores, o pone de manifiesto una regulación diferencial entre el gen murino y el humano (McCarthy *et al.*, 2005).

En nuestro caso, hemos encontrado una represión significativa de MRP3 por parte de

FOXA1 que no se ha reportado hasta la fecha (Figura 13). Sin embargo, está descrito que FOXA2 juega un papel en la activación de la transcripción de MRP3 y MRP4. Dada la similitud entre ambos factores de transcripción, esto sugiere que FOXA1 podría estar compitiendo con FOXA2 por los mismos elementos de respuesta en el promotor del gen, inhibiendo el mismo, al desplazarlo (Moschetta *et al.*, 2008; Le Lay and Kaestner, 2010). Además, las sinergias observadas entre FOXA1 y PGC1 α podrían indicar que PGC1 α , un coactivador, potencia la acción de FOXA1.

OST α y OST β son las dos últimas proteínas de este grupo. Está descrita una regulación positiva conjunta de los genes OST α y OST β humanos por parte de FXR:RXR α , y de OST β por CAR:RXR α y RAR α :RXR α , así como la localización de los respectivos elementos de respuesta en los promotores (Xu *et al.* 2014; Landrier *et al.*, 2006). También existen evidencias de la activación de Ost α /Ost β murinos por LXR α :RXR α , así como una activación exclusiva de Ost α por parte de HNF4 α (Okuwaki *et al.*, 2007).

Nuestros resultados son coincidentes con esta información bibliográfica (Figura 14). RXR α indujo ambos genes, como era de esperar por la formación de heterodímeros con el resto de receptores nucleares activadores. PGC1 α fue capaz de inducir tanto OST α como OST β , lo cual se explica por su acción potenciadora de los factores de transcripción. LXR α activó significativamente OST α y OST β , como ocurre en los genes murinos. CAR indujo OST β como ya estaba descrito (Xu *et al.* 2014). Por último, observamos una activación de OST β por parte de C/EBP α , C/EBP β , PXR y VDR que no ha sido descrita hasta la fecha. En OST α esta activación fue menor y no resultó significativa.

6.3. Regulación de los transportadores canaliculares

A través de su membrana canalicular, los hepatocitos secretan multitud de moléculas que componen la bilis, como los ácidos biliares, los fosfolípidos y el colesterol, así como moléculas de deshecho como la bilirrubina y fármacos.

6.3.1. Transporte de ácidos biliares

BSEP es la principal bomba de ácidos biliares en la membrana canalicular de los hepatocitos. Su implicación en patologías genéticas colestásicas y en la colestasis inducida por fármacos otorga un gran interés al estudio de su regulación. En este sentido, está descrito que el heterodímero FXR:RXR α es capaz de transactivar a BSEP (Plass *et al.*, 2002). Esto no es sorprendente, ya que FXR es un sensor intracelular de ácidos biliares. Al aumentar la concentración de ácidos biliares en la célula tiene sentido que se active este transportador, para que puedan ser secretados.

BSEP tiene una expresión indetectable en HepG2 (Figura 8), lo cual hace difícil el estudio de su inducción o represión mediante qRT-PCR. Sin embargo, hemos observado una activación muy evidente por parte de C/EBP α , ya que no solo produjo un nivel detectable del mRNA de BSEP en las 3 muestras de los 3 diferentes experimentos tratadas con Ad-C/EBP α , sino que además ocurrió lo mismo en todas las combinaciones con otros factores de transcripción. En este sentido, observamos un posible efecto sinérgico junto con receptores nucleares como PPAR α , CAR, PXR, RXR α , LXR α y FOXA1 así como el coactivador PGC1 α .

PXR es un sensor directo de ácidos biliares, y a CAR también se le atribuyen funciones en el control de su homeostasis (Lickteig *et al.*, 2016), de manera que sería lógico que partici-

pan en la inducción de BSEP.

El ligando sintético de LXR α , T0901317, también tiene cierta afinidad por FXR, aunque mucho menor (Houck *et al.*, 2004). Por tanto, es posible que la inducción de LXR α , que viene acompañada de la incubación con su ligando T0901317, esté colaborando en la inducción de BSEP mediante la activación de FXR. De hecho, está descrito que los oxisteroles, ligandos de LXR α , activan BSEP a través de FXR (Deng *et al.*, 2006)

En cualquier caso, al ser indetectable el mRNA de BSEP con la sobreexpresión de todos los factores de transcripción independientes, excepto C/EBP α , tan solo podemos concluir que este factor de transcripción podría jugar un papel en la expresión basal o la inducción de BSEP en ciertas condiciones, algo completamente desconocido hasta la fecha.

6.3.2. Transporte de colesterol

El hígado tiene un papel fundamental en el metabolismo del colesterol, tanto su síntesis como su utilización en vías biosintéticas, como la de los ácidos biliares. La secreción del colesterol, una molécula hidrofóbica, en la bilis supone la ruta principal de eliminación del mismo ya que junto con los ácidos biliares y la fosfatidilcolina se mantiene soluble.

La desregulación de este transporte, en especial una hipersecreción de colesterol, representa el principal defecto fisiopatológico en la formación de cálculos biliares; más del 80% de los cálculos biliares están formados por colesterol (Stinton *and* Shaffer, 2012).

El heterodímero formado por ABCG5/ABCG8 es el principal transportador de colesterol en la membrana canalicular. LXR α :RXR α es capaz, en HepG2 e hígado murino, de unirse al promotor, compartido entre ABCG5 y ABCG8,

estimulando la expresión de ambos (Sun Back *et al.*, 2013; Repa *et al.*, 2001). Al ser LXR α un sensor de oxisteroles (moléculas derivadas del metabolismo de colesterol), este receptor nuclear aporta una conexión entre la síntesis y la secreción del colesterol.

En nuestro experimento, Ad-LXR α y Ad-RXR α por separado muestran una inducción de ABCG5 y ABCG8 muy débil, que no resulta significativa (Figura 16). Sin embargo, teniendo en cuenta que las combinaciones con una mayor inducción contienen Ad-LXR α y Ad-RXR α , parece un efecto sólido, acorde con la bibliografía.

Ad-HNF4 α produjo una inducción significativa tanto de ABCG5 como de ABCG8 (~2 y ~4 veces con respecto al control) que se ve ligeramente potenciada en presencia de Ad-RXR α y Ad-LXR α . Existen evidencias previas del papel de HNF4 α en la activación transcripcional de ABCG5/ABCG8, de manera coherente con nuestros resultados (Sumi *et al.*, 2007).

En ratones también se ha constatado la activación transcripcional de ABCG5/ABCG8, en un ensayo reportero, por parte de FXR:RXR α , así como un aumento en el nivel de los mRNA respectivos en hepatocitos primarios humanos (Li *et al.*, 2011).

Sorprendentemente, también encontramos una represión significativa por parte de Ad-C/EBP α de ABCG5 y ABCG8 (reducción en el nivel de mRNA de ~2 veces con respecto al control) (Figura 16). Además, al combinar Ad-C/EBP α con Ad-HNF4 α se aprecia una anulación total de la inducción producida por este último, lo cual indica que, además, la represión de C/EBP α es dominante sobre la activación de HNF4 α .

Esto sugiere que ambos factores podrían te-

ner un elemento de respuesta común o muy próximo, de manera que al sobreexpresar C/EBP α junto con HNF4 α se produce un desplazamiento del segundo factor, y es incapaz de inducir la transcripción en esas condiciones.

Como se observa en el gráfico, no hemos encontrado un efecto equivalente con el Ad-C/EBP β . Si esto se debe a un efecto específico de la isoforma C/EBP α o a un artefacto experimental, debido al escaso tamaño muestral (n=1) en la sobreexpresión de C/EBP β , es algo que deberá ser aclarado en posteriores trabajos.

6.3.3. Transporte de fosfolípidos

Los fosfolípidos, en particular la lecitina (fosfatidilcolina) son un componente importante en la bilis ya que contribuyen, entre otras cosas, a la solubilización del colesterol y a reducir la toxicidad de las sales biliares (Dial *et al.*, 2007; Barrios *et al.*, 2000). Como hemos expuesto en la Sección 2.5, el principal transportador canalicular de fosfolípidos, MDR3, está afectado en ciertos tipos genéticos de colestasis. Además, se ha asociado una menor secreción biliar de fosfolípidos con mayor riesgo de formación de cálculos biliares y de colestasis (Erlinger, 2012; Rosmorduc *and* Poupon, 2007).

MDR3 es transactivado por el heterodímero FXR:RXR α , tal y como se comprobó mediante ensayos reporteros en HepG2 (Huang *et al.*, 2003). Esto se justifica teniendo en cuenta que la secreción biliar es un proceso coordinado, de manera que FXR activa BSEP para que se transporten los ácidos biliares y también MDR3 para aumentar la secreción de fosfatidilcolina, necesaria en la bilis.

En la Figura 17 podemos observar los resultados obtenidos en nuestro estudio. Ad-RXR α produjo el mayor aumento en el nivel de

mRNA de MDR3, siendo la diferencia significativa con respecto al control (2,6 veces mayor). Este resultado podría explicarse por la heterodimerización de RXR α con el FXR endógeno, tal y como hemos comentado en el párrafo anterior.

También está documentada la activación de MDR3 por parte de los ligandos de PPAR α (fibratos) mediante el heterodímero PPAR α :RXR α (Ghonem *et al.*, 2014). Sin embargo, en nuestro experimento no encontramos ningún efecto significativo con la sobreexpresión de PPAR α y la adición de su ligando (GW7647).

Además, se observa que Ad-PXR y Ad-FOXA1 son capaz de contrarrestar la activación producida por Ad-RXR α . Sin embargo, ninguno de los dos factores inhiben significativamente MDR3 por sí solos, lo cual indica que PXR y FOXA1 podrían tener un ligero efecto represor sobre MDR3 cuando está inducido. Es posible que este efecto a nivel fisiológico actúe tras la sobreexpresión previa de MDR3, como parte de los mecanismos que restauran el nivel basal de expresión de dicho transportador.

También se observa una pequeña sinergia de HNF4 α junto con RXR α , que indicaría un ligero efecto inductor del primero, tal y como sugieren los experimentos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) de la bibliografía (Niehof *and* Borlak, 2009)

6.3.4. Transporte de bilirrubina

La bilirrubina es un producto de deshecho que se genera por la degradación de la hemoglobina. La secreción de bilirrubina al canalículo biliar es un proceso clave en su eliminación que está dirigido por el transportador MRP2.

En ratas, se ha descrito que Mrp2 es induci-

do por los heterodímeros de PXR, CAR, FXR y LXR α con RXR α (Chisaki *et al.*, 2009; Kast *et al.*, 2002). En nuestro experimento tan solo pudimos constatar un pequeño efecto inductor producido por PXR. Aunque individualmente produce un aumento del mRNA no significativo, el hecho de que todas las combinaciones que contienen PXR tengan un nivel mayor del mRNA de MRP2 que las combinaciones equivalentes sin PXR, nos hace pensar que la inducción producida es real y no un artefacto experimental (Figura 18).

Por otra parte, no observamos ningún efecto significativo con la sobreexpresión de RXR α , LXR α o CAR. Puesto que RXR α es más abundante en HepG2 que PXR, CAR y LXR α , esto podría ser debido a que hay suficiente RXR α para heterodimerizar con el resto de receptores nucleares, de manera que sobreexpresarlo no produce ningún efecto (Figura 9). Además, la sobreexpresión de dicho factor viene acompañada de la incubación con su ligando, el ácido 9-cis-retinoico, pero no de los ligandos de LXR α , PXR o CAR, que son los que, a juzgar por la bibliografía, dirigen realmente la activación de MRP2.

El aumento que obtuvieron en la bibliografía con respecto al control mediante la incubación con T0901317 fue muy pequeño (<1,5 veces). En nuestro experimento, el tamaño muestral fue n=3, la mitad, y la variabilidad fue mayor, lo cual podría explicar que, siendo una inducción tan débil, haya sido detectado en dicho artículo y no en nuestro experimento.

También se ha estudiado previamente la influencia de los LETF. Aunque existen artículos que afirman un papel de C/EBP β en la activación de MRP2 (Tanaka *et al.*, 1999), otros posteriores lo desmienten y, de hecho, establecen un papel regulador negativo en el caso de

no solo C/EBP β , sino también C/EBP α y FOXA1 (Hisaeda *et al.*, 2004, Qadri *et al.*, 2009). Por el contrario, HNF4 α y HNF1a podrían tener un papel activador, según dichos artículos.

En este sentido, nuestros resultados son parcialmente coincidentes los de Qadri *et al.*, 2009, ya que el tratamiento de las células con Ad-C/EBP α o Ad-C/EBP β produjo una reducción muy acusada en el nivel de mRNA de MRP2 (5 y 4 veces menor que el control, respectivamente) (Figura 18). Por el contrario, Ad-FOXA1 no fue un represor de MRP2 en nuestras condiciones, si bien parece potenciar sinérgicamente el efecto producido por Ad-C/EBP α , obteniendo entre ambos una reducción de 9 veces en el mRNA de MRP2 con respecto al control. Tampoco pudimos encontrar ningún efecto activador de HNF4 α .

Por último, en nuestro experimento también hemos observado un efecto represor del coactivador PGC1 α . Mediante ChIP-seq se ha puesto de manifiesto que PGC1 α está presente en zonas genómicas que constituyen elementos de respuesta de los C/EBP, lo cual indica una posible cooperación entre ambos, que podría explicar el efecto sinérgico observado (Charos *et al.*, 2012)

6.3.5. Transporte de fármacos

BCRP y MDR1 son bombas dependientes de ATP situadas en la membrana canalicular, que transportan una amplia variedad de fármacos y otros xenobióticos. Sin embargo, es posible que también tengan un papel menor en el transporte de ácidos biliares (Sección 2.3.3).

Se ha encontrado un elemento de respuesta funcional para CAR:RXR α en el promotor de BCRP, que hace posible la transactivación del gen humano, en HepG2 (Benoki *et al.*, 2012). La rifampicina (ligando de PXR) también es capaz de aumentar el nivel del mRNA de BCRP. Sin

embargo, no se ha localizado su elemento de respuesta en el promotor, por lo que cabe la posibilidad de que PXR tenga un efecto indirecto, o que la rifampicina active la transcripción de manera independiente de PXR (Benoki *et al.*, 2012; Jigorel *et al.*, 2006).

En nuestros experimentos observamos un efecto contrario con la sobreexpresión de PXR o CAR: una reducción en el nivel de mRNA de BCRP (Figura 19).

Esto indica que CAR podría estar uniéndose al elemento de respuesta descrito en Benoki *et al.*, 2012, pero el efecto producido es justo el contrario. Del mismo modo, también observamos una represión producida por C/EBP β y LXR α . Teniendo en cuenta las combinaciones de adenovirus más represoras (en rojo), C/EBP α parece compartir el mismo papel represor de su isoforma C/EBP β .

Las combinaciones Ad-C/EBP α + Ad-PXR + Ad-RXR α y Ad-C/EBP α + Ad-CAR + Ad-RXR α producen una reducción de 5,3 y 3,4 veces, respectivamente, mientras que cualquiera de los factores represores por separado tiene una reducción de ~2 veces. Este hecho apoya, por un lado, el posible papel represor de CAR y PXR, contrario a la bibliografía establecida y, por otro, que existe un efecto sinérgico entre los diferentes factores represores.

Por otra parte, existen evidencias de la activación transcripcional de MDR1 por parte de VDR:RXR α , CAR:RXR α y PXR:RXR α , y sus respectivos ligandos, basadas en ensayos reporteros en líneas celulares humanas de carcinoma de colon (Saeki *et al.*, 2008; Burk *et al.*, 2005; Geick *et al.*, 2001). En los artículos en cuestión describen elementos de respuesta concretos que permiten la inducción de MDR1, al menos en dichas líneas celulares.

En nuestros experimentos obtuvimos una represión inesperada de MDR1, producida por la sobreexpresión de VDR y la incubación con su ligando. Esta aparente contradicción con la bibliografía podría explicarse por los siguientes motivos: 1) Nuestro experimento está muy limitado en cuanto a VDR, ya que el número de experimentos es 1, y no realizamos combinaciones con otros factores que pudieran aportarnos un mayor nivel de certeza. Por ello, podríamos estar ante un valor anómalo debido al reducido tamaño muestral. Sin embargo, la reducción en el nivel de mRNA con respecto al control es muy elevada (12,5 veces), lo cual aporta cierta credibilidad al dato, a pesar de no ser estadísticamente significativo. 2) Todos nuestros datos están obtenidos en una línea celular derivada de un hepatocarcinoma, que es diferente a las utilizadas en la bibliografía. No se puede descartar una regulación diferencial entre ambas líneas celulares, teniendo en cuenta además que MDR1 es un transportador de fármacos, los cuales suelen estar desregulados en las células cancerosas. VDR podría estar interfiriendo con el factor que induce MDR1 en HepG2 y, como resultado, observamos una represión. 3) Las condiciones experimentales no son equivalentes en cuanto a la concentración y tiempo de incubación de los ligandos, y eso puede condicionar la respuesta frente a VDR.

Además, tampoco apreciamos ningún efecto individual por parte de PXR y CAR, pero hemos descrito una regulación positiva de MDR1 por parte de FOXA1 y PGC1 α (4 y 3 aumentos en el mRNA de MDR1 con respecto al control, respectivamente) (Figura 20). Además, gracias a las combinaciones de adenovirus se observa una posible sinergia entre FOXA1 y PGC1 α , que supone una inducción mayor que cualquiera de los dos por separado (hasta 8 aumentos con respecto al control). Teniendo

en cuenta que PGC1 α es un coactivador, estos datos sugieren que FOXA1 podría intervenir en la activación de la transcripción de MDR1, que se ve potenciada por la interacción en trans con PGC1 α .

La inducción producida tanto por FOXA1 como por PGC1 α se suprime con la acción dominante de C/EBP α . Esto sugiere que C/EBP α se está uniendo a un elemento de respuesta en el promotor de MDR1 solapante o próximo al de FOXA1, de manera que compite con él y dificulta su acción.

Para aportar una visión general, en la Tabla 3 están resumidas la función principal de cada transportador y las regulaciones transcripcionales encontradas, en contraste con las preexistentes en la bibliografía. En líneas generales, hemos hallado 23 relaciones regulatorias coincidentes con datos bibliográficos (de células humanas o roedores), 20 nuevas relaciones desconocidas hasta la fecha, y 3 contradictorias con investigaciones anteriores.

Dado que los datos obtenidos en las combinaciones están constreñidos a las combinaciones experimentales elegidas, sería de interés realizar nuevas combinaciones dirigidas para hallar nuevas sinergias entre los factores de transcripción y confirmar la información del presente trabajo.

Teniendo en cuenta la cantidad y calidad de las nuevas relaciones encontradas ente OST β (*SLC51B*) y los factores de transcripción, decidimos profundizar en el conocimiento de su regulación.

6.4. Estudio del promotor de SLC51B: localización de los elementos de respuesta a factores de transcripción

Mediante la combinación de los datos expuestos en la Figura 22 y un análisis

Tabla 3: Transportadores hepatobiliares y su regulación. Se muestra en **negrita** las relaciones de la bibliografía validadas en nuestros experimentos, en **azul** aquellas que no han sido descritas hasta el momento y en **rojo** las contradictorias con la bibliografía. Los datos bibliográficos se refieren tanto a la regulación en humanos como en evidencias encontradas en ratones y ratas. En el texto figuran las referencias.

TRANSPORTADORES		Datos bibliográficos / experimentales			
BASOLATERALES DE ENTRADA	Gen ID	Tipo	Sustrato Principal	FT activadores	FT represores
NTCP	<i>SLC10A1</i>	Cotransportador Activo Secundario (Na ⁺)	AB conjugados > AB libres	RAR α , RXR α , C/EBP α , C/EBP β , HNF4 α , PGC1 α	FXR/SHP
OATP1B1	<i>SLCO1B1</i>	Cotransportador activo (posible antiportador)	AB conjugados > AB libres	FXR, RXR α , HNF4 α , LXR α	n/d
OATP1B3	<i>SLCO1B3</i>	Cotransportador activo (posible antiportador)	AB conjugados y libres, Bilirrubina	FXR, RXR α , LXR α , FOXA1, C/EBP α , PPAR α	n/d
OATP1A2	<i>SLCO1A2</i>	Cotransportador activo (posible antiportador)	AB conjugados y libres	n/d	n/d
BASOLATERALES DE SALIDA					
MRP4	<i>ABCC4</i>	Transportador activo primario (Bomba ATP-dependiente)	AB sulfatados, AB glucuronizados	PPAR α , CAR	FXR
MRP3	<i>ABCC3</i>	Transportador activo primario (Bomba ATP-dependiente)	AB sulfatados, AB glucuronizados	PPAR α , VDR, CAR	FOXA1, PGC1 α
OST α	<i>SLC51A</i>	Difusión pasiva facilitada	AB conjugados	FXR, RXR α , LXR α , HNF4 α , PGC1 α	n/d
OST β	<i>SLC51B</i>			RAR α , FXR, CAR, RXR α , LXR α , C/EBP α , C/EBP β , PXR, VDR, PGC1 α	n/d
CANALICULARES					
BSEP	<i>ABCB11</i>	Transportador activo primario (Bomba ATP-dependiente)	AB conjugados	FXR, RXR α , C/EBP α	n/d
ABCG5	<i>ABCG5</i>	Transportador activo primario (Bomba ATP-dependiente)	Colesterol	FXR, LXR α , RXR α , HNF4 α	C/EBP α
ABCG8	<i>ABCG8</i>	Transportador activo primario (Bomba ATP-dependiente)			
MDR3	<i>ABCB4</i>	Transportador activo primario (Bomba ATP-dependiente)	Fosfatidilcolina	FXR, PPAR α , RXR α , HNF4 α	FOXA1, PXR
MRP2	<i>ABCC2</i>	Transportador activo primario (Bomba ATP-dependiente)	Bilirrubina y AB sulfatados	FXR, CAR, LXR α , RXR α , PXR	FOXA1, C/EBP α , C/EBP β , PGC1 α
BCRP	<i>ABCG2</i>	Transportador activo primario (Bomba ATP-dependiente)	Fármacos	PXR, CAR, RXR α	C/EBP α , C/EBP β , PXR, CAR, LXR α
MDR1	<i>ABCB1</i>	Transportador activo primario (Bomba ATP-dependiente)	Fármacos	CAR, PXR, VDR, RXR α , FOXA1, PGC1 α	VDR, C/EBP β , C/EBP α

bioinformático de búsqueda de elementos de respuesta consenso, hemos predicho la localización de los elementos de respuesta a los que se unen los factores de transcripción considerados inductores (Figura 14A).

En la Figura 25A se observa el análisis bioinformático de predicción de elementos de respuesta. En verde están señalados los 2 sitios funcionales validados mediante ensayos reporteros: 1) Un elemento de respuesta FXR:RXR α (-35, -23) (Landrier *et al.*, 2006). 2) Un elemento de respuesta RAR α :RXR α , en el que también actúa CAR:RXR α (-60,-44) (Xu *et al.*, 2014).

Los fragmentos del promotor de SLC51B utilizado en los ensayos reporteros acotan 5 secciones diferentes: a (-1221, -776), b (-776, -350), c (-350, -74), d (-74, 0) y e (0, +202) (Figura 25A). Teniendo en cuenta la similitud en las

señales de los ensayos reporteros de C/EBP α y C/EBP β , parece probable que ambas isoformas están actuando mayoritariamente en los mismos elemento de respuesta, localizados en la sección b (Figura 22A, 22B). Por su similitud alta con las secuencias consenso (>90%) y el solapamiento con picos de ChIP-seq de C/EBP β (UCSC Encode, #EH001829), concluimos que los elementos de respuesta más relevante para ambos son dos adyacentes, separados solo por 7pb: (-579, -569) (-561,-551) (Figura 25B).

Además, dado que los *fold-change* en las qRT-PCR son similares a los ratios de aumento en los ensayos reporteros de C/EBP α y C/EBP β (unos 13-15 aumentos), parece poco probable que existan regiones relevantes más *upstream* de las estudiadas, aunque no se descarta que algún otro elemento de respuesta de la sección a pueda tener una contribución menor.

Como ya hemos dicho en el apartado anterior, está descrito el elemento de respuesta de LXR:RXR α (compartido con FXR:RXR α) en el promotor de Ost β murino. Sin embargo, nunca se había estudiado la secuencia humana a este respecto. El fragmento #3 produce una señal significativa que no tiene el #4, lo que indica que LXR α está interaccionando con la sección d del promotor (Figura 22D). Puesto que en esa sección se sitúa el sitio IR1 ya descrito de FXR:RXR α , parece plausible que LXR:RXR α sea capaz de unirse al mismo elemento de respuesta, al igual que ocurre con el gen murino. Sin embargo, dado que el fragmento #2 tuvo una mayor activación transcripcional que el #3, es posible que este heterodímero se una, además, a otro elemento de respuesta en la sección c, o que exista una activación indirecta del gen

producida por el propio factor o por su ligando. Proponemos un posible sitio DR5 de unión LXR α :RXR α en la sección c que podría contribuir, aunque su similitud con el consenso no es idónea (78%) (Figura 25B). Dado que los valores producidos por la sobreexpresión de LXR α en qRT-PCR y en el ensayo reportero son similares, parece probable que su actividad reguladora se centra en la región estudiada del promotor.

Por otra parte, la sobreexpresión de RXR α produce una señal luciferasa estadísticamente significativa en los fragmentos #0, #1, #2 y #3 (Figura 22C). Dado que la señal en el fragmento #0 es menor que en el fragmento #1, es posible que en la sección a exista algún elemento represor. De hecho, esta tendencia la observamos con todos los receptores nucleares.

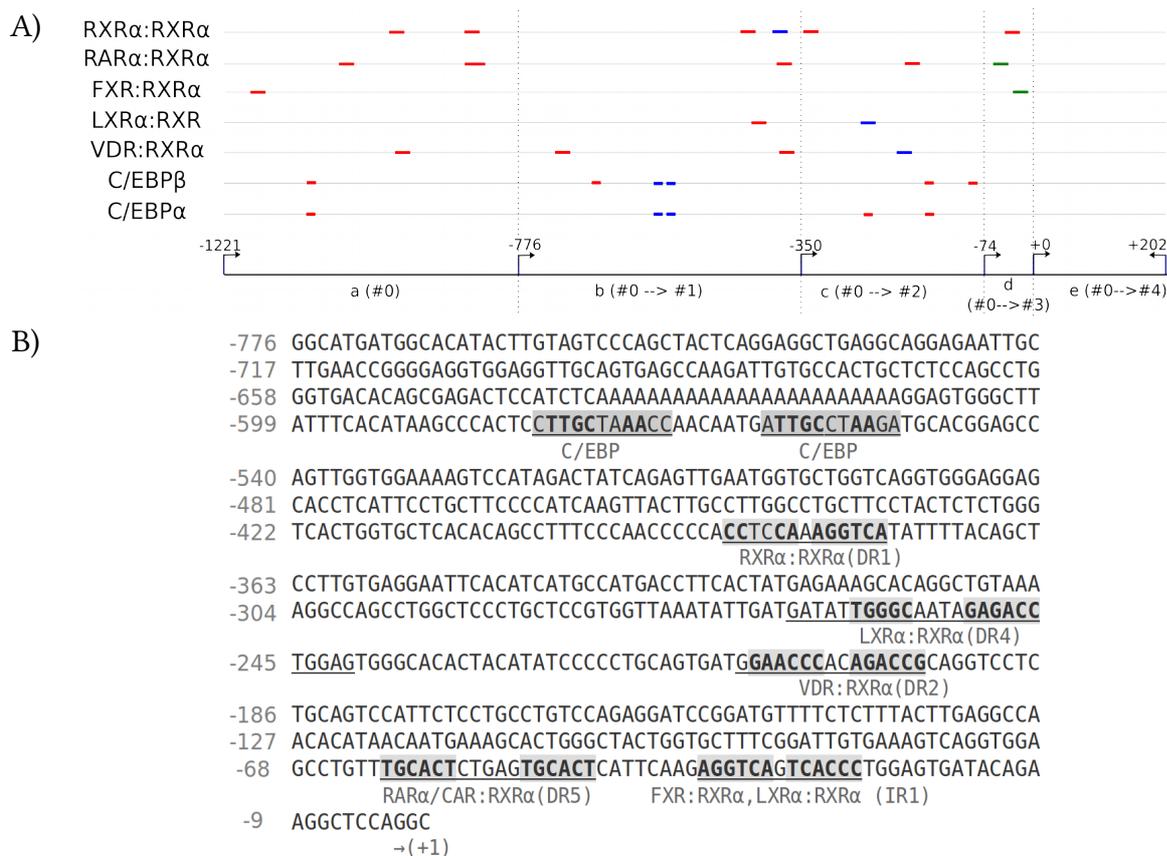


Figura 25: Predicción bioinformática y elementos de respuesta propuestos. A) Esquema de la zona del promotor estudiada y los elementos de respuesta encontrados según las matrices de similitud correspondientes mostradas en la Tabla S5 (Mathinspector y JASPAR). En verde los sitios ya descritos, en rojo todos los predichos (similitud receptores nucleares >75%, C/EBP > 89%) y en azul los elegidos para el modelo propuesto. B) Elementos de respuesta propuestos según los datos bioinformáticos y del ensayo reportero.

Además, el patrón en escalera de los fragmentos #1, #2 y #3 sugiere que existen múltiples interacciones a lo largo del promotor, sumatorias entre sí. Esto es lógico teniendo en cuenta que RXR α actúa como heterodímero con la mayoría de receptores nucleares estudiados, de manera que a mayor secuencia, más posibles interacciones. Además, una posibilidad, no explorada hasta la fecha, es la inducción de OST β por parte del homodímero RXR α :RXR α . En la Figura 25B proponemos un posible elemento de respuesta (90% similitud con consenso) situado en la sección b (-391, -367), que es la que tiene una mayor señal producida por la sobreexpresión de RXR α .

En cuanto a CAR, nuestros resultados concuerdan con los de la bibliografía, de manera que existe un elemento de respuesta, ya descrito anteriormente, en la sección d (Figura 22E). Dado que la activación es del mismo orden que la observada por qRT-PCR, es poco probable que existan otros sitios relevantes *upstream* (Figura 14A).

Con los resultados de la qRT-PCR hipotetizamos que VDR es un receptor nuclear capaz de inducir OST β (Figura 14A). Los datos del ensayo reportero son coherentes, siendo además el *fold-change* muy similar en ambos casos (Figura 22F). Deducimos que el principal elemento de respuesta de VDR está situado en la sección c del promotor: (-209,-195) (80% similitud con consenso).

Por su parte, el ensayo reportero de PXR presenta un patrón inesperado, siendo la señal del fragmento #0 no significativa y las de los fragmentos #1, #2 y #3 significativas pero pequeñas (Figura 22G). En el fragmento #0 podría existir algún elemento represor que enmascare el efecto de PXR, tal y como ocurría con RXR α . Los fragmentos #1, #2 y #3 se aproximan a un

fold-change de 2, mientras que en las qRT-PCR observamos un aumento de 4 veces en el mRNA de OST β con la sobreexpresión de PXR. Esto sugiere que podría existir un elemento de respuesta de PXR:RXR α alejado más de 1221pb del sitio de inicio de la transcripción, de manera que no lo habríamos podido encontrar en nuestros fragmentos. Además, también es probable que PXR:RXR α sea capaz de unirse al elemento de respuesta RAR:RXR α (-60,-44), ya que se ha descrito en otras ocasiones que PXR y CAR interaccionan con elementos de respuesta muy similares (Hernandez *et al.*, 2009)

Por último, PGC1 α presenta un patrón similar al de RXR α . Al igual que PXR, el fragmento #0 no muestra actividad significativa, lo cual es coherente con la existencia de ese posible elemento represor en la sección a (Figura 22H). Los fragmentos #1, #2 y #3 tienen una actividad equivalente, aunque ligeramente decreciente. Esto indica que PGC1 α colabora en la activación producida por FXR:RXR α en la sección d. A este efecto se le podría sumar la sinergia con C/EBP α , C/EBP β y LXR α , que explicaría también ese patrón decreciente.

En resumen, hemos puesto de manifiesto que la regulación de OST β (SLC51B) es mucho más compleja de lo que se creía. La participación de tantos receptores nucleares y LFTF en su regulación, y su inducción en la colestasis, presupone un papel de relevancia de OST β , junto con OST α , en la respuesta adaptativa frente a la colestasis en los hepatocitos. Sin embargo, los *knock-out* murinos sin este transportador heterodimérico no muestran una mayor predisposición a la colestasis, sino todo lo contrario (Soroka *et al.*, 2010). Esto se justifica teniendo en cuenta que dicho *knock-out* no es específico de tejido, de manera que, como explican los autores, se produce una menor

reabsorción intestinal y renal de ácidos biliares (donde OST α /OST β tiene una función crucial), y, por tanto, se reduce su acumulación. Además, el hecho de que este transportador apenas se expresa en los hepatocitos de rata y ratón pero sí en los hepatocitos humanos sugiere que su función no está totalmente conservada entre humanos y murinos.

Las nuevas regulaciones que hemos descrito apoyan la función protectora de OST α /OST β en la colestasis, como mecanismo de salida de emergencia de ácidos biliares en los hepatocitos. También hemos estudiado la variabilidad de OST α y OST β en una cohorte de biopsias hepáticas de población sana. Comparando con la variabilidad máxima (~100 veces, BSEP) y la mínima (~10 veces, MRP3) de otros transportadores hepatobiliares, medidos en la misma cohorte (datos no mostrados), OST α y OST β tienen una variabilidad bastante grande (~29 y ~41 veces).

Por tanto, esto abre la posibilidad de que individuos con un nivel especialmente bajo de OST α u OST β puedan tener un riesgo incrementado de colestasis inducida por fármacos, lo cual aportaría una explicación mecanística de la patogénesis, en esos casos.

6.5. Implicaciones del papel de los C/EBP en la regulación de la biosíntesis y el transporte hepatobiliar

Las proteínas C/EBP son una familia de factores de transcripción con cremallera de leucina que interaccionan con el DNA en forma de dímeros. Aunque existen más de 6 isoformas descritas, hemos estudiado las más relevantes en el hígado: C/EBP α y C/EBP β -LAP (*liver activating protein*). Estas proteínas pueden actuar en forma de homodímero o de heterodímeros entre distintas isoformas. Están implicadas en la diferenciación celular, la rege-

neración hepática, la respuesta de fase aguda, y el control del metabolismo energético, entre otras funciones (Schrem *et al.*, 2004)

Hemos observado que C/EBP α y C/EBP β son capaces de reprimir fuertemente a CYP7A1, la enzima clave en la biosíntesis de ácidos biliares (Figura 23).

Recientemente, se ha propuesto un modelo por el cual el colesterol induce el gen de C/EBP β a través de la activación de LXR α . Posteriormente, C/EBP β aumenta la expresión, en los hepatocitos, de un *long non-coding* RNA que tiene la capacidad de generar un complejo que se une a los mRNA de ciertos genes (Cyp7a1, Abca1), promoviendo su degradación (Lan *et al.*, 2016).

Como resultado, se reduce la principal ruta del hepatocito que permite la eliminación del colesterol y, por tanto, se agrava la acumulación intracelular del mismo. Aunque este mecanismo está descrito en ratas, es posible que esté conservado en humanos. De hecho, está descrito que LXR α activa C/EBP β , en células humanas (Feldmann *et al.*, 2013).

En este sentido, también hemos puesto de manifiesto que C/EBP α produce una represión del principal transportador canalicular de colesterol: ABCG5/ABCG8. Si a esto le añadimos la represión de la síntesis de ácidos biliares, que consume colesterol, parece probable que el resultado final sea una acumulación intracelular de colesterol (Figura 26). En consecuencia, las proteínas C/EBP podrían estar implicadas en un mecanismo patológico que favorecería la acumulación de colesterol en los hepatocitos, que está relacionada con el síndrome metabólico (Lan *et al.*, 2016).

Por otra parte, también hemos descrito un nuevo rol de las C/EBP en la regulación los

transportadores de ácidos biliares (Figura 23). Son capaces de inducir el transportador sinusoidal de salida OST α /OST β , los transportadores sinusoidales de entrada NTCP y OATP1B3 y el canalicular BSEP, mientras que inhiben la mayoría del resto de transportadores canaliculares. Además, es posible que OATP1B3 pueda actuar bidireccionalmente, de manera que contribuiría a la salida de ácidos biliares cuando hubiera acumulación intracelular (Jung *et al.*, 2002).

El resultado final esperado de la acción de C/EBP α y C/EBP β sería un aumento del flujo de ácidos biliares hacia el exterior del hepatocito, y una menor acumulación en su interior, de manera que es coherente con una respuesta adaptativa frente a la colestasis. Sin embargo, también se produce la activación de NTCP, aunque es cuantitativamente más pequeña que el resto. En condiciones colestásicas, NTCP

está reprimido por FXR, de manera que la acción de las C/EBP podría proporcionar una vía de entrada moderada de los ácidos biliares, que permitiera su posterior secreción al canalículo biliar (Figura 26).

En este sentido, la inhibición de CYP7A1, que hemos descrito anteriormente, también estaría en consonancia con una respuesta protectora frente a la acumulación de ácidos biliares.

Dado que las proteínas C/EBP están implicadas en la respuesta inflamatoria, ya que se activan por la acción de citocinas como IL-1 e IL-6 (interleucina 1 y 6), y que la colestasis puede producir una respuesta inflamatoria en el hígado por la acción de los ácidos biliares, hipotetizamos una conexión entre la inflamación producida por los ácidos biliares y el mecanismo de defensa frente a su acumulación intracelular, dirigida por los factores de trans-

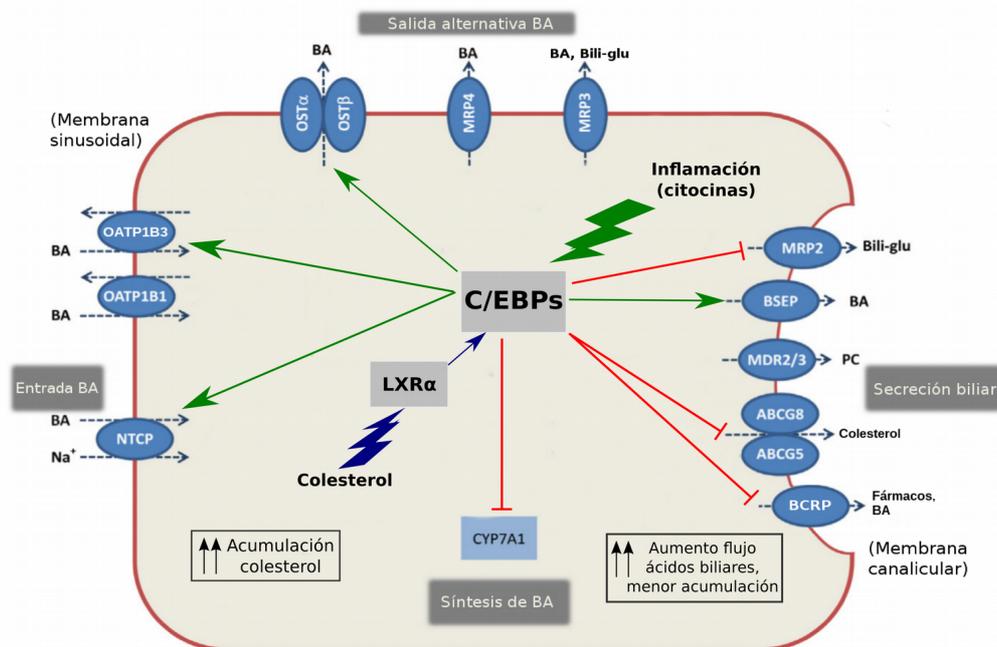


Figura 26: Modelo de la posible función de C/EBP α y C/EBP β en la homeostasis de ácidos biliares y colesterol. Se muestra con líneas en punta de flecha las inducciones y con rectas en T las represiones. La acción global de C/EBP en los hepatocitos produciría un aumento del flujo de ácidos biliares por vía canalicular y sinusoidal, y una reducción en su biosíntesis. Por ello, hipotetizamos un papel protector frente a la colestasis. Por otra parte, al reprimir CYP7A1 y ABCG5/G8, podrían contribuir a la acumulación de colesterol intracelular. Las evidencias existentes de una activación de C/EBP por parte de LXR α (sensor de colesterol) sugieren un posible mecanismo patológico de acumulación intrahepática (Lan *et al.*, 2016).

cripción C/EBP (Allen *et al.*, 2011; Schrem *et al.*, 2004; Ramji *and* Foka, 2002). Las implicaciones fisiológicas y patológicas de este posible mecanismo todavía no han sido exploradas.

Es necesario realizar más estudios que, por una parte, validen los elementos de respuesta concretos descritos en el promotor de OST β , mediante mutagénesis dirigida, y que confirmen su posible función en los mecanismos patológicos de la colestasis inducida por fármacos, por ejemplo a través de estudios de asociación entre los pacientes colestásicos y el nivel de expresión de OST α /OST β . Por otra parte, la implicación de las C/EBP en la acumulación de colesterol y en la homeostasis de ácidos biliares debe ser analizada con mayor detalle, en particular para confirmar si un aumento en la actividad de C/EBP α y C/EBP β es beneficioso o perjudicial en la progresión de la colestasis.

La profundización en los hallazgos descritos podrían suponer un aumento en el conocimiento de las bases moleculares de la colestasis y el síndrome metabólico, proporcionando nuevas vías de actuación en la prevención y tratamiento de dichas patologías.

7. CONCLUSIONES

1) Hemos investigado el impacto global de 11 reguladores transcripcionales en la expresión de 15 transportadores hepatobiliares, descubriendo 20 nuevas respuestas en la expresión de estos genes, no descritas hasta ahora.

2) Los factores que tuvieron un mayor impacto en la regulación de los transportadores fueron, en orden decreciente, C/EBP α , RXR α , LXR α y PGC1 α . Por contra, las respuestas frente a PXR, FOXA1, CAR y VDR fueron las menos frecuentes.

3) Los transportadores hepatobiliares más

sensibles a estos factores fueron NTCP y OATP1B3 (sinusoidales de entrada), OST β y OST α (sinusoidales de salida) y BCRP y MDR1 (canaliculares).

4) La regulación de los transportadores es heterogénea y muy amplia, de manera que no hay ninguna combinación de factores de transcripción que sea, en general, inductora o represora. Sin embargo, C/EBP α induce transportadores muy poco expresados en HepG2 (NTCP, OATP1B3 y BSEP), con lo que es útil, como herramienta, para estudiar las funciones de esos transportadores.

5) También hemos comprobado la capacidad de C/EBP α y C/EBP β de reprimir la expresión de CYP7A1, la enzima clave en la biosíntesis de ácidos biliares. Esto, junto con las abundantes respuestas de los transportadores hepatobiliares, implica un papel relevante de las C/EBP en la regulación de la homeostasis de ácidos biliares, desconocido hasta la fecha.

6) Hemos puesto de manifiesto una regulación muy compleja de la expresión de OST β , que se induce en nuestro estudio por la acción de C/EBP α , C/EBP β , VDR, RXR α , PXR, LXR α y CAR. Se ha descrito la localización de los elementos de respuesta en el promotor de OST β con los que interaccionan los factores de transcripción inductores. En total, postulamos 5 elementos de respuesta adicionales, que se suman a los 2 descritos anteriormente.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Misih, S. R. Z. & Bloomston, M. Liver anatomy. *Surg. Clin. North Am.* **90**, 643–53 (2010).

Adams, D. H. & Eksteen, B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 244–251 (2006).

Allen, K., Jaeschke, H. & Copple, B. L. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel

- mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *Am. J. Pathol.* **178**, 175–86 (2011).
- Aller, S. G. *et al.* Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science (80-.)*. **323**, 1718–1722 (2009).
- Alpini, G. *et al.* *Bile Acid Interactions with Cholangiocytes*. *Madame Curie Bioscience Database* (Landes Bioscience, 2013).
- Arias, I. M. *et al.* *The Liver: Biology and Pathobiology*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2009).
- Assem, M. *et al.* Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *J. Biol. Chem.* **279**, 22250–7 (2004).
- Axelson, M. *et al.* Bile acid synthesis in cultured human hepatocytes: support for an alternative biosynthetic pathway to cholic acid. *Hepatology* **31**, 1305–12 (2000).
- Back, S. S. *et al.* Cooperative transcriptional activation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 genes by nuclear receptors including Liver-X-Receptor. *BMB Rep.* **46**, 322–7 (2013).
- Ballatori, N. *et al.* OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* **42**, 1270–9 (2005).
- Barrios, J. M. & Lichtenberger, L. M. Role of biliary phosphatidylcholine in bile acid protection and NSAID injury of the ileal mucosa in rats. *Gastroenterology* **118**, 1179–86 (2000).
- Benet, M., Lahoz, A., Guzmán, C., Castell, J. V. & Jover, R. CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) synergistically cooperate with constitutive androstane receptor to transactivate the human cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) gene: application to the development. *J. Biol. Chem.* **285**, 28457–71 (2010).
- Benoki, S., Yoshinari, K., Chikada, T., Imai, J. & Yamazoe, Y. Transactivation of ABCG2 through a novel cis-element in the distal promoter by constitutive androstane receptor but not pregnane X receptor in human hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **517**, 123–30 (2012).
- Bhalla, S., Ozalp, C., Fang, S., Xiang, L. & Kemper, J. K. Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1alpha. Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* **279**, 45139–47 (2004).
- Blazquez, A. G. *et al.* Characterization of the role of ABCG2 as a bile acid transporter in liver and placenta. *Mol. Pharmacol.* **81**, 273–83 (2012).
- Bode, H.-P. *et al.* Expression and regulation of gap junctions in rat cholangiocytes. *Hepatology* **36**, 631–40 (2002).
- Bode, J. G., Albrecht, U., Häussinger, D., Heinrich, P. C. & Schaper, F. Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-κB-dependent signaling. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 496–505 (2012).
- Borst, P., de Wolf, C. & van de Wetering, K. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch.* **453**, 661–673 (2007).
- Boyer, J. L., Graf, J. & Meier, P. J. Hepatic transport systems regulating pHi, cell volume, and bile secretion. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 415–38 (1992).
- Bozic, M. *et al.* Hepatocyte vitamin D receptor regulates lipid metabolism and mediates experimental diet-induced steatosis. *J. Hepatol.* **65**, 748–57 (2016).
- Burk, O., Arnold, K. A., Geick, A., Tegude, H. & Eichelbaum, M. A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression. *Biol. Chem.* **386**, 503–13 (2005).
- Byrne, J. A. *et al.* The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* **123**, 1649–58 (2002).
- Carlton, V. E. H. *et al.* Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nat. Genet.* **34**, 91–96 (2003).
- Charos, A. E. *et al.* A highly integrated and complex PPARGC1A transcription factor binding network in HepG2 cells. *Genome Res.* **22**, 1668–79 (2012).
- Chiang, J. Y. L. Bile acids: regulation of synthesis. *J. Lipid Res.* **50**, 1955–66 (2009).
- Chisaki, I., Kobayashi, M., Itagaki, S., Hirano, T. & Iseki, K. Liver X receptor regulates expression of MRP2 but not that of MDR1 and BCRP in the liver. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 2396–403 (2009).
- Chow, E. C. Y. *et al.* Vitamin D receptor activation down-regulates the small heterodimer partner and increases CYP7A1 to lower cholesterol. *Gastroenterology* **146**, 1048–59 (2014).

- Dawson, P. A., Lan, T. & Rao, A. Bile acid transporters. *J. Lipid Res.* **50**, 2340–2357 (2009).
- Dawson, P. A. *et al.* The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J. Biol. Chem.* **280**, 6960–8 (2005).
- Deng, R., Yang, D., Yang, J. & Yan, B. Oxysterol 22(R)-hydroxycholesterol induces the expression of the bile salt export pump through nuclear receptor farnesoid X receptor but not liver X receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**, 317–25 (2006).
- Denson, L. A. *et al.* Interleukin-1beta suppresses retinoid transactivation of two hepatic transporter genes involved in bile formation. *J. Biol. Chem.* **275**, 8835–43 (2000).
- Dial, E. J., Rooijackers, S. H. M., Darling, R. L., Romero, J. J. & Lichtenberger, L. M. Role of phosphatidylcholine saturation in preventing bile salt toxicity to gastrointestinal epithelia and membranes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 430–6 (2008).
- Dietrich, C. G. & Geier, A. Effect of drug transporter pharmacogenetics on cholestasis. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **10**, 1533–51 (2014).
- Dietrich, C. G. *et al.* Fasting induces basolateral uptake transporters of the SLC family in the liver via HNF4alpha and PGC1alpha. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **293**, G585–90 (2007).
- Erlinger, S. Low phospholipid-associated cholestasis and cholelithiasis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **36 Suppl 1**, S36–40 (2012).
- Evans, R. M. & Mangelsdorf, D. J. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* **157**, 255–66 (2014).
- Tejada-Cifuentes, F. Hepatotoxicidad por Fármacos. *Rev. clínica Med. Fam.* **3**, 177–191 (2010).
- Feldmann, R. *et al.* Genome-wide analysis of LXR α activation reveals new transcriptional networks in human atherosclerotic foam cells. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3518–31 (2013).
- Gbaguidi, G. F. & Agellon, L. B. The inhibition of the human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) promoter by fibrates in cultured cells is mediated via the liver x receptor alpha and peroxisome proliferator-activated receptor alpha heterodimer. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1113–21 (2004).
- Geick, A., Eichelbaum, M. & Burk, O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J. Biol. Chem.* **276**, 14581–7 (2001).
- Geier, A. *et al.* Hepatocyte nuclear factor-4alpha is a central transactivator of the mouse Ntcp gene. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**, G226–33 (2008).
- Geier, A., Wagner, M., Dietrich, C. G. & Trauner, M. Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 283–308 (2007).
- Ghonem, N. S., Ananthanarayanan, M., Soroka, C. J. & Boyer, J. L. Peroxisome proliferator-activated receptor α activates human multidrug resistance transporter 3/ATP-binding cassette protein subfamily B4 transcription and increases rat biliary phosphatidylcholine secretion. *Hepatology* **59**, 1030–42 (2014).
- Glaeser, H. *et al.* Intestinal Drug Transporter Expression and the Impact of Grapefruit Juice in Humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* **81**, 362–370 (2007).
- Gomez-Ospina, N. *et al.* Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat. Commun.* **7**, 10713 (2016).
- Gonzalez, F. J. Nuclear Receptor Control of Enterohepatic Circulation. *Compr. Physiol.* **2**, 2811–2828 (2012).
- Goodwin, B. *et al.* A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell* **6**, 517–26 (2000).
- Gradhand, U. *et al.* Variability in human hepatic MRP4 expression: influence of cholestasis and genotype. *Pharmacogenomics J.* **8**, 42–52 (2008).
- Guo, G. L. *et al.* Complementary Roles of Farnesoid X Receptor, Pregnane X Receptor, and Constitutive Androstane Receptor in Protection against Bile Acid Toxicity. *J. Biol. Chem.* **278**, 45062–45071 (2003).
- Guzmán, C. *et al.* The human liver fatty acid binding protein (FABP1) gene is activated by FOXA1 and PPAR α ; and repressed by C/EBP α : Implications in FABP1 down-regulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 803–18 (2013).
- Halilbasic, E., Claudel, T. & Trauner, M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *J. Hepatol.* **58**, 155–68 (2013).
- Han, S., Li, T., Ellis, E., Strom, S. & Chiang, J. Y. L. A novel bile acid-activated vitamin D receptor signaling in

- human hepatocytes. *Mol. Endocrinol.* **24**, 1151–64 (2010).
- Hazard, S. E. & Patel, S. B. Sterolins ABCG5 and ABCG8: regulators of whole body dietary sterols. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* **453**, 745–752 (2007).
- Hernandez, J. P., Mota, L. C. & Baldwin, W. S. Activation of CAR and PXR by Dietary, Environmental and Occupational Chemicals Alters Drug Metabolism, Intermediary Metabolism, and Cell Proliferation. *Curr. Pharmacogenomics Person. Med.* **7**, 81–105 (2009).
- Hisaeda, K. *et al.* Interleukin-1beta represses MRP2 gene expression through inactivation of interferon regulatory factor 3 in HepG2 cells. *Hepatology* **39**, 1574–82 (2004).
- Hofmann, A. F. Detoxification of Lithocholic Acid, A Toxic Bile Acid: Relevance to Drug Hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* **36**, 703–722 (2004).
- Houck, K. A. *et al.* T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol. Genet. Metab.* **83**, 184–7 (2004).
- Huang, B. Q. *et al.* Isolation and characterization of cholangiocyte primary cilia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **291**, G500-9 (2006).
- Huang, L. *et al.* Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *J. Biol. Chem.* **278**, 51085–90 (2003).
- Inagaki, T. *et al.* Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* **2**, 217–225 (2005).
- Jedlitschky, G., Hoffmann, U. & Kroemer, H. K. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**, 351–66 (2006).
- Jenne, C. N. & Kubers, P. Immune surveillance by the liver. *Nat. Immunol.* **14**, 996–1006 (2013).
- Jigorel, E., Le Vee, M., Boursier-Neyret, C., Parmentier, Y. & Fardel, O. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 1756–63 (2006).
- Jones, H., Alpini, G. & Francis, H. Bile acid signaling and biliary functions. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 123–8 (2015).
- Jung, D., Hagenbuch, B., Fried, M., Meier, P. J. & Kullak-Ublick, G. A. Role of liver-enriched transcription factors and nuclear receptors in regulating the human, mouse, and rat NTCP gene. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **286**, G752-61 (2004).
- Jung, D. *et al.* Human organic anion transporting polypeptide 8 promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Gastroenterology* **122**, 1954–66 (2002).
- Kage, K. *et al.* Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int. J. cancer* **97**, 626–30 (2002).
- Kast, H. R. *et al.* Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 2908–15 (2002).
- Kok, T. *et al.* Enterohepatic circulation of bile salts in farnesoid X receptor-deficient mice: efficient intestinal bile salt absorption in the absence of ileal bile acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 41930–7 (2003).
- Lam, P., Wang, R. & Ling, V. Bile acid transport in sister of P-glycoprotein (ABCB11) knockout mice. *Biochemistry* **44**, 12598–605 (2005).
- Lan, X. *et al.* A novel long noncoding RNA Lnc-HC binds hnRNPA2B1 to regulate expressions of Cyp7a1 and Abca1 in hepatocytic cholesterol metabolism. *Hepatology* **64**, 58–72 (2016).
- Landrier, J. F., Eloranta, J. J., Vavricka, S. R. & Kullak-Ublick, G. a. The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G476-85 (2006).
- Le Lay, J. & Kaestner, K. H. The Fox genes in the liver: from organogenesis to functional integration. *Physiol. Rev.* **90**, 1–22 (2010).
- Lee, H. *et al.* FXR regulates organic solute transporters alpha and beta in the adrenal gland, kidney, and intestine. *J. Lipid Res.* **47**, 201–14 (2006).
- Lee, W. M. Drug-Induced Hepatotoxicity. *N. Engl. J. Med.* **349**, 474–485 (2003).
- Lemaigre, F. P. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology* **137**, 62–79 (2009).
- Li, D. *et al.* Interleukin-1 beta-mediated suppression of RXR:RAR transactivation of the Ntcp promoter is JNK-dependent. *J. Biol. Chem.* **277**, 31416–22 (2002).
- Li, N., Cui, Z., Fang, F., Lee, J. Y. & Ballatori, N. Heterodimerization, trafficking and membrane topology of the two proteins, Ost α and Ost β , that constitute the

- organic solute and steroid transporter. *Biochem. J.* **407**, 363–372 (2007).
- Li, T. & Chiang, J. Y. L. Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. *PPAR Res.* **2009**, 501739 (2009).
- Li, T. *et al.* Overexpression of cholesterol 7 α -hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis. *Hepatology* **53**, 996–1006 (2011).
- Li, T. & Chiang, J. Y. L. Nuclear receptors in bile acid metabolism. *Drug Metab. Rev.* **45**, 145–55 (2013).
- Lickteig, A. J., Csanaky, I. L., Pratt-Hyatt, M. & Klaassen, C. D. Activation of Constitutive Androstane Receptor (CAR) in Mice Results in Maintained Biliary Excretion of Bile Acids Despite a Marked Decrease of Bile Acids in Liver. *Toxicol. Sci.* **151**, 403–18 (2016).
- Makishima, M. *et al.* Vitamin D Receptor As an Intestinal Bile Acid Sensor. *Science (80-.)*. **296**, 1313–1316 (2002).
- Marin, J. J. G., Macias, R. I. R., Briz, O., Banales, J. M. & Monte, M. J. Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. *Curr. Drug Metab.* **17**, 4–29 (2015).
- Marrapodi, M. & Chiang, J. Y. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and agonist inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *J. Lipid Res.* **41**, 514–20 (2000).
- Martinez-Becerra, P. *et al.* Further Characterization of the Electrogenicity and pH Sensitivity of the Human Organic Anion-Transporting Polypeptides OATP1B1 and OATP1B3. *Mol. Pharmacol.* **79**, 596–607 (2011).
- Martinez-Jimenez, C. P., Gómez-Lechón, M. J., Castell, J. V. & Jover, R. Transcriptional Regulation of the Human Hepatic CYP3A4: Identification of a New Distal Enhancer Region Responsive to CCAAT/Enhancer-Binding Protein β Isoforms (Liver Activating Protein and Liver Inhibitory Protein). *Mol. Pharmacol.* **67**, 2088–2101 (2005).
- Martínez-Jiménez, C. P., Gómez-Lechón, M. J., Castell, J. V. & Jover, R. Underexpressed coactivators PGC1 α and SRC1 impair hepatocyte nuclear factor 4 α function and promote dedifferentiation in human hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 29840–9 (2006).
- McCarthy, T. C., Li, X. & Sinal, C. J. Vitamin D receptor-dependent regulation of colon multidrug resistance-associated protein 3 gene expression by bile acids. *J. Biol. Chem.* **280**, 23232–42 (2005).
- Meier, P. J., Eckhardt, U., Schroeder, A., Hagenbuch, B. & Stieger, B. Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* **26**, 1667–1677 (1997).
- Meier, Y. *et al.* Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-transporter expression in human liver. *Hepatology* **44**, 62–74 (2006).
- Meyer Zu Schwabedissen, H. E. *et al.* Liver X receptor α and farnesoid X receptor are major transcriptional regulators of OATP1B1. *Hepatology* **52**, 1797–807 (2010).
- Modica, S., Gadaleta, R. M. & Moschetta, A. Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nucl. Recept. Signal.* **8**, e005 (2010).
- Moffit, J. S. *et al.* Induction of hepatic transporters multidrug resistance-associated proteins (Mrp) 3 and 4 by clofibrate is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**, 537–45 (2006).
- Moschetta, A. Welcoming Foxa2 in the bile acid entourage. *Cell Metab.* **8**, 276–8 (2008).
- Moya, M. *et al.* Foxa1 reduces lipid accumulation in human hepatocytes and is down-regulated in nonalcoholic fatty liver. *PLoS One* **7**, e30014 (2012).
- Nagano, M. *et al.* Regulation of bile acid synthesis under reconstructed enterohepatic circulation in rats. *Steroids* **69**, 701–9 (2004).
- Niehof, M. & Borlak, J. Expression of HNF4 α in the human and rat choroid plexus: implications for drug transport across the blood-cerebrospinal-fluid (CSF) barrier. *BMC Mol. Biol.* **10**, 68 (2009).
- Nies, A. T. & Keppler, D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* **453**, 643–659 (2007).
- Okuwaki, M. *et al.* LXR α transactivates mouse organic solute transporter alpha and beta via IR-1 elements shared with FXR. *Pharm. Res.* **24**, 390–8 (2007).
- Pascual, M., Gomez-Lechon, M. J., Castell, J. V. & Jover, R. ATF5 Is a Highly Abundant Liver-Enriched Transcription Factor that Cooperates with Constitutive Androstane Receptor in the Transactivation of CYP2B6: Implications in Hepatic Stress Responses. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 1063–1072 (2008).
- Pellicoro, A. *et al.* Human and rat bile acid-CoA:amino acid N -acyltransferase are liver-specific peroxisomal enzymes: Implications for intracellular bile

salt transport. *Hepatology* **45**, 340–348 (2007).

Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).

Plass, J. R. M. *et al.* Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology* **35**, 589–96 (2002).

Qadri, I. *et al.* Interaction of hepatocyte nuclear factors in transcriptional regulation of tissue specific hormonal expression of human multidrug resistance-associated protein 2 (abcc2). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **234**, 281–92 (2009).

Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L. & Moorman, A. F. M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **339**, 62–6 (2003).

Ramji, D. P. & Foka, P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem. J.* **365**, 561–75 (2002).

Renga, B. *et al.* Farnesoid X receptor suppresses constitutive androstane receptor activity at the multidrug resistance protein-4 promoter. *Biochim. Biophys. Acta* **1809**, 157–65 (2011).

Repa, J. J. *et al.* Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* **277**, 18793–800 (2002).

Rius, M., Nies, A. T., Hummel-Eisenbeiss, J., Jedlitschky, G. & Keppler, D. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* **38**, 374–384 (2003).

Robey, R. W. *et al.* ABCG2: A perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 3–13 (2009).

Rodríguez-Antona, C. *et al.* Transcriptional regulation of human CYP3A4 basal expression by CCAAT enhancer-binding protein alpha and hepatocyte nuclear factor-3 gamma. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1180–9 (2003).

Rosmorduc, O. & Poupon, R. Low phospholipid associated cholelithiasis: association with mutation in the MDR3/ABCB4 gene. *Orphanet J. Rare Dis.* **2**, 29 (2007).

Russel, F. G. M., Koenderink, J. B. & Masereeuw, R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a

versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 200–207 (2008).

Saeki, M., Kurose, K., Tohkin, M. & Hasegawa, R. Identification of the functional vitamin D response elements in the human MDR1 gene. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 531–42 (2008).

Satlin, L. M., Amin, V. & Wolkoff, A. W. Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO₃⁻ exchange. *J. Biol. Chem.* **272**, 26340–5 (1997).

Schrem, H., Klempnauer, J. & Borlak, J. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol. Rev.* **54**, 129–58 (2002).

Schrem, H., Klempnauer, J. & Borlak, J. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation. *Pharmacol. Rev.* **56**, 291–330 (2004).

Serrano, M. A. *et al.* Expression in Human Trophoblast and Choriocarcinoma Cell Lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of Genes Involved in the Hepatobiliary-like Excretory Function of the Placenta. *Placenta* **28**, 107–117 (2007).

Seward, D. J., Koh, A. S., Boyer, J. L. & Ballatori, N. Functional complementation between a novel mammalian polygenic transport complex and an evolutionarily ancient organic solute transporter, OST α -OST β . *J. Biol. Chem.* **278**, 27473–27482 (2003).

Sgro, C. *et al.* Incidence of drug-induced hepatic injuries: A French population-based study. *Hepatology* **36**, 451–455 (2002).

Song, K.-H., Li, T., Owsley, E., Strom, S. & Chiang, J. Y. L. Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression. *Hepatology* **49**, 297–305 (2009).

Sonoda, J. *et al.* Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13801–6 (2002).

Soroka, C. J., Mennone, A., Hagey, L. R., Ballatori, N. & Boyer, J. L. Mouse organic solute transporter alpha deficiency enhances renal excretion of bile acids and attenuates cholestasis. *Hepatology* **51**, 181–90 (2010).

- Stieger, B., O'Neill, B. & Meier, P. J. ATP-dependent bile-salt transport in canalicular rat liver plasma-membrane vesicles. *Biochem. J.* **67**–74 (1992).
- Stieger, B. *et al.* In situ localization of the hepatocytic Na⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* **107**, 1781–7 (1994).
- Stieger, B. & Hagenbuch, B. Organic anion-transporting polypeptides. *Curr. Top. Membr.* **73**, 205–32 (2014).
- Stinton, L. M. & Shaffer, E. A. Epidemiology of gallbladder disease: cholelithiasis and cancer. *Gut Liver* **6**, 172–87 (2012).
- Sumi, K. *et al.* Cooperative interaction between hepatocyte nuclear factor 4 alpha and GATA transcription factors regulates ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4248–60 (2007).
- Sun, A. Q. *et al.* Protein-protein interactions and membrane localization of the human organic solute transporter. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **292**, G1586-93 (2007).
- Tabibian, J. H., Masyuk, A. I., Masyuk, T. V., O'Hara, S. P. & LaRusso, N. F. Physiology of cholangiocytes. *Compr. Physiol.* **3**, 541–65 (2013).
- Tanaka, T. *et al.* The human multidrug resistance protein 2 gene: functional characterization of the 5'-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology* **30**, 1507–12 (1999).
- Teng, S., Jekerle, V. & Piquette-Miller, M. Induction of ABCC3 (MRP3) by pregnane X receptor activators. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 1296–9 (2003).
- Tomaru, Y. *et al.* Identification of an inter-transcription factor regulatory network in human hepatoma cells by Matrix RNAi. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1049–60 (2009).
- Trauner, M. & Boyer, J. L. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol. Rev.* **83**, 633–71 (2003).
- Uppal, H. *et al.* Combined loss of orphan receptors PXR and CAR heightens sensitivity to toxic bile acids in mice. *Hepatology* **41**, 168–176 (2005).
- Van Dyke, R. W., Stephens, J. E. & Scharschmidt, B. F. Bile acid transport in cultured rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* **243**, G484-92 (1982).
- Vogel, S. M. *et al.* Lithocholic acid is an endogenous inhibitor of MDM4 and MDM2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 16906–10 (2012).
- Wang, W., Seward, D. J., Li, L., Boyer, J. L. & Ballatori, N. Expression cloning of two genes that together mediate organic solute and steroid transport in the liver of a marine vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9431–6 (2001).
- Weinman, S. A. Electrogenicity of Na(+)-coupled bile acid transporters. *Yale J. Biol. Med.* **70**, 331–40 (1997).
- Xie, W. *et al.* An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 3375–3380 (2001).
- Xu, S., Sun, A.-Q. & Suchy, F. J. A novel RAR α /CAR-mediated mechanism for regulation of human organic solute transporter- β gene expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **306**, G154-62 (2014).
- Zelcer, N., Saeki, T., Reid, G., Beijnen, J. H. & Borst, P. Characterization of Drug Transport by the Human Multidrug Resistance Protein 3 (ABCC3). *J. Biol. Chem.* **276**, 46400–46407 (2001).
- Zhang, Y., Castellani, L. W., Sinal, C. J., Gonzalez, F. J. & Edwards, P. A. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev.* **18**, 157–69 (2004).

9.ANEXOS

Tabla suplementaria 1: Los ligandos y MOI de los adenovirus utilizados. En las combinaciones ambos parámetros se mantienen constantes.

	MOI (pfu / célula)	Ligando	Concentración
Ad-CTL	50	N/D	N/D
Ad-CEBP α	20	N/D	N/D
Ad-CEBP β	30	N/D	N/D
Ad-PXR	10	Rifampicina	50 μ M
Ad-CAR	30	CITCO	0,5 μ M
Ad-RXR α	40	Ácido 9-cis-retinoico	1 μ M
Ad-LXR α	75	T0-901317	1 μ M
Ad-VDR	30	Calcitriol	0,01 μ M
Ad-PGC1 α	15	N/D	N/D
Ad-FOXA1	24	N/D	N/D
Ad-PPAR α	40	GW7647	1 μ M
Ad-HNF4a	50	N/D	N/D

Tabla suplementaria 2: Cebadores usados para las PCR en tiempo real cuantitativas.

Nombre Común	Nombre Sistemático	Forward (5' \rightarrow 3')	Reverse (5' \rightarrow 3')	T _h (°C) / t _{ext} (s)
Factor de transcripción				
C/EBP α	CEBPA	GTGGAGACGCAGCAGAAG	TTCCAAGGCACAAGGTATC	58/20
ratC/EBP α	Cebpa	GCCAAGAAGTCGGTGGATAA	CCTTGACCAAGGAGCTCTCA	55/15
C/EBP β	CEBPB	CTCGCAGGTCAAGAGCAAG	CTAGCAGTGGCCGGAGGAGCGAGC	60/15
CAR	NR1B3	TGCTGCCCTGGTCACACACTT	TCAATCTCATCTCTCTGGTAAC	60/20
HNF3 α	FOXA1	CTCTAGGCAGCGCCTCGGTGA	CAGCATGGCTATGCCAGACAAACCC	57/20
HNF4 α	HNF4A	GCCTACCTCAAAGCCATCAT	GACCCCTCCAGCAGCATCTC	60/20
LXR α	NR1H3	AAGCGGCAAGAGGAGGAACAG	GCTCAGTGAAGTGGGCAAAGC	60/20
PGC1 α	PPARGC1A	AATGTGTCTCCTTCTTGTCTT	GGTGTCTGTAGTGGCTTGA	55/15
PPAR α	PPARA	ATATCTCCCTTTTGTGGCTGCTA	TCCGACTCCGTCTTCTTGATGA	60/20
PXR	NR1I2	CAGAGGAGCAGCGGATGATGA	GTGGGGCAGCAGGGAGAAGAT	60/20
RXR α	RXRA	GAAGGTCTATGCGTCTTGG	AAGGAAGGTGTCAATGGGTG	60/15
VDR	VDR	GACTACAAGTACC GCGTCAGTG	GCGGCAGCGGATGTACGTCT	60/20
Transportadores				
ABCG5	ABCG5	ATGGAAGTGAAGCTGCCGACT	TTACATCTTGGGTCCGCTCA	57/12
ABCG8	ABCG8	GTGTCCTTCCTGCGGTGGT	GACGATGAGGTAGATGGCGTAG	57/12
BCRP	ABCG2	GGCATCATGGTGTATAGACGC	TGTGTTCCAAGATGACGCATTA	60/12
MDR1	ABCB1	CCATGGCCGTGGGCAAGTC	GGATGTCCGGTCCGGTGGGA	60/15
MDR2/3	ABCB4	GAAGAAAGGCCAGACACTAGC	CTGAGACACGATTCCGAGTT	60/12
MRP2	ABCC2	GCCGGTGGTCAGATTATCAT	GATCTTGGATTTCCGAAGCA	60/20
MRP3	ABCC3	GGCTGATGTTCCGTGTCTCC	ACCAGAGCCTTCCTGTAGATGAC	60/15
MRP4	ABCC4	ATTTATCGGAAGGCACTTCGT	CAAGGGCAGGAGAATGATTAGA	60/15
NTCP	SLC10A1	TGCCAAAATGTCCAACCTCT	GTGTGGCAGCTGTGTAGAT	60/15
OATP1A2	SLCO1A2	ACAAGCTGCCACATAGGAT	CCATGTTTATTCCTGTCCA	60/15
OATP1B1	SLCO1B1	TCACTTGCCTGGGTTTCCAC	AAGCCCAAGTAGACCCTTGAAAA	60/15
OATP1B3	SLCO1B3	GCACTTGCAATGGGTTTCCAG	TAAGCCCAAGTAGACCCTTCCAAA	60/15
OST α	SLC51A	TGGGCATCATTTCCCGTCAAG	GTAGGGCAGTCAGGATGAGGA	60/15
OST β	SLC51B	ATCCAGGCAAGCAGAAAAGA	CTGGTACATCCGGAAGGAAA	55/15
Otros				
GAPDH	GAPDH	ATGCTGGCGCTGAGTACGTC	GGGCAGAGATGATGACCCTT	55/15
PBGD	HMBS	CGGAAGAAAACAGCCCAAAGA	TGAAGCCAGGAGGAAGCACAGT	58/20
CYP7A1	CYP7A1	GCATGCTGTGTCTATGGCTT	AACTCAAGAGGATTGGCACCA	60/15

Tabla suplementaria 3: Cebadores utilizados para la clonación y secuenciación del promotor de SLC51B

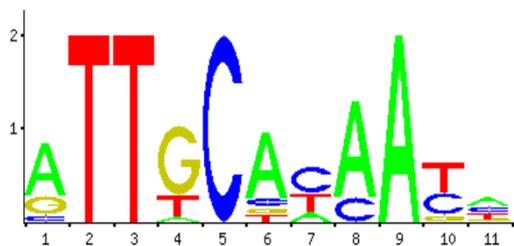
SLC51B	5'→3'
Clonación	
-1221F	AGTGGTACCTGTTGGCTATCTCCCCTGGA
-776F	AGTGGTACCGGCATGATGGCACATACTTG
-350F	AGTGGTACCTCACATCATGCCATGACCTT
-74F	AGTGGTACCGGTGGAGCCTGTTTGCACCTC
0F	AGTGGTACCGCCTGGGCGTGTGCTAA
+202R	AGTCTCGAGGTCCTGACGACTGCCTTGA
+1120F	AGTGGTACCTGTCGCTTGTCTGTGGCA
+4539R	ATTCTCGAGCGTGAAGACCCCTGGAAACA
Secuenciación	
-869F_seq	TGAGGTGGGCAGATCACGAG
+1865F_seq	GGCTGAGGCAAGAGAATTC
+4010R_seq	GCTCCTGATGCTGAGAGGGC
RVP3_F (pGL4.10)	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
pGL4_R (pGL4.10)	TCGGCGTAGGTAATGTCCAC

Tabla suplementaria 4: Lista de combinaciones analizadas en los experimentos de qRT-PCR.

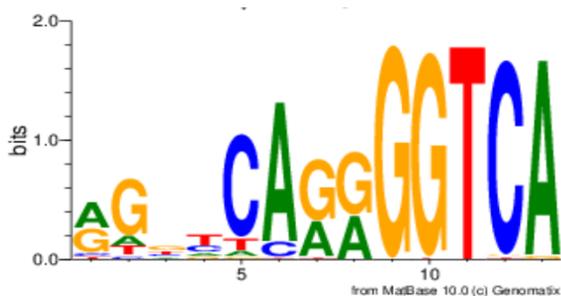
PPARα	LXR α + PGC1 α	C/EBP β + FOXA1
RXRα	PGC1 α + PPAR α	C/EBP α + FOXA1 + PGC1 α
CAR	HNF4 α + PGC1 α	HNF4 α + LXR α + RXR α
LXRα	PGC1 α + PXR	C/EBP α + CAR + RXR α
PXR	CAR + PGC1 α	CAR + FOXA1 + RXR α
PGC1α	C/EBP α + HNF4 α + RXR α	C/EBP α + PXR + RXR α
FOXA1	FOXA1 + RXR α	FOXA1 + PXR + RXR α
HNF4α	PPAR α + RXR α	HNF4 α + LXR α + PGC1 α + RXR α
C/EBPα	CAR + RXR α	FOXA1 + PPAR α + RXR α
C/EBPβ	PXR + RXR α	C/EBP α + RXR α
VDR	PGC1 α + RXR α	CAR + FOXA1
C/EBP α + FOXA1	HNF4 α + PGC1 α + RXR α	FOXA1 + PGC1 α + PPAR α
CAR + C/EBP α	C/EBP α + PGC1 α + PXR	C/EBP α + PPAR α
C/EBP α + PGC1 α	CAR + FOXA1 + PGC1 α	FOXA1 + LXR
C/EBP α + HNF4 α	FOXA1 + LXR α + PGC1 α	LXR α + RXR α
C/EBP α + PXR	FOXA1 + PGC1 α + RXR α	HNF4 α + RXR α
FOXA1 + PPAR α	C/EBP α + LXR α	

Tabla suplementaria 5: Relación de matrices de predicción de elementos de respuesta utilizadas y su codificación en la base de datos de origen.

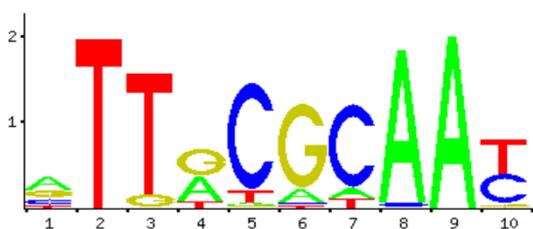
C/EBP α (JASPAR, MA0102.3)



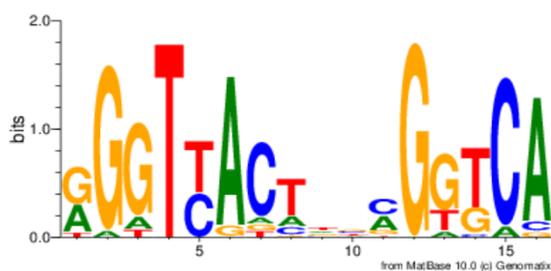
RXR α :RXR α (Genomatix, V\$RXRA.01)



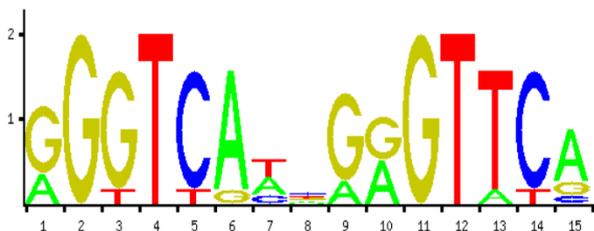
C/EBP β (JASPAR, MA0466.2)



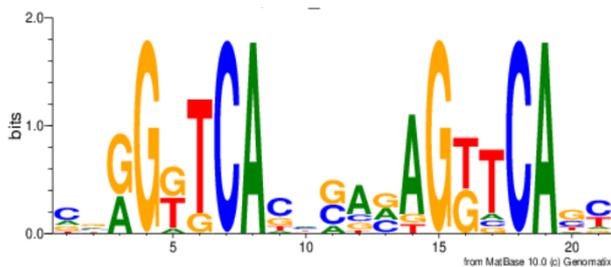
LXR α :RXR α (Genomatix, V\$LXRE.01)



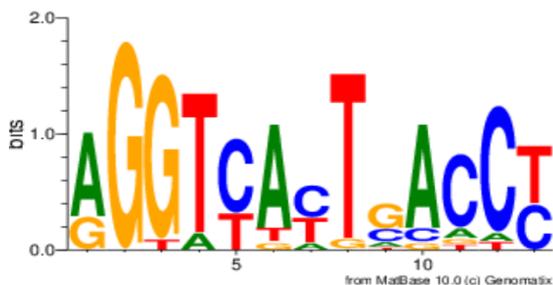
VDR:RXR α (JASPAR, MA0074.1)



RAR:RXR α (Genomatix, V\$RAR_RXR.03)



FXR:RXR α (Genomatix, V\$FXRE.01)



RAR:RXR α (Genomatix V\$RAR_RXR.02)

