



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESE DE DOUTORAMENTO

PAPEL DE P53 EN EL METABOLISMO HEPÁTICO

Begoña Porteiro Couto

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN ENDOCRINOLOXÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANO 2018





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Papel de p53 en el metabolismo hepático

D./Begoña Porteiro Couto

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, Febrero de 2018





AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

Papel de p53 en el metabolismo hepático

D. Rubén Nogueiras Pozo
D. Carlos Diéguez González

INFORMA/N:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna. **Begoña Porteiro Couto**, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

En Santiago de Compostela, Febrero de 2018

Asdo. Rubén
Nogueiras Pozo

Asdo. Carlos Diéguez



Resumo

p53 xoga un papel importante en diferentes funcións biolóxicas como a proliferación celular, a lonxevidade, o estrés, e desordes asociados á obesidade como a esteatose e a esteatohepatite non alcohólica. O obxectivo desta tese é estudar o papel de p53 no metabolismo lipídico hepático e dos posibles mecanismos que conducen ás alteracións metabólicas. Atopamos que a ausencia de p53 provoca unha diminución de peso corporal e masa graxa de forma independente da inxesta debido á activación da termoxénese no tecido adiposo pardo. Ademais, vimos que p53 é fundamental para acción adipoxénica da ghrelina no tecido adiposo branco e no fígado. A diminución dos niveis de p53 de forma total ou específica no fígado, provocan un incremento da graxa hepática de forma independente da inxesta. Descubrimos que esta acción está mediada por TAp63 α xa que a súa diminución hepática reduce a esteatose en ratos obesos e deficientes en p53. A sobreexpresión no fígado de TAp63 α produce esteatose a través da activación de IKK β e o estrés do retículo endoplasmático. Por último, atopamos niveis elevados de TAp63 α , IKK β e XBP1 en fígado de doentes con esteatose e esteatohepatite. **Plabras chave:** esteatose, esteatohepatite, ghrelina, p53, p63, metabolismo lipídico.

Resumen

p53 juega un papel importante en diferentes funciones biológicas como la proliferación celular, la longevidad, el estrés y desórdenes asociados a la obesidad como la esteatosis y la esteatohepatitis no alcohólica. El objetivo de esta tesis es el estudio del papel de p53 en el metabolismo lipídico hepático y de los posibles mecanismos que conducen a las alteraciones metabólicas. Encontramos que la ausencia de p53 provoca una disminución de peso corporal y de masa grasa debido a la activación de la termogénesis en el tejido adiposo marrón. Además, observamos que p53 es fundamental para la acción adipogénica de la ghrelina en el tejido adiposo blanco y en el hígado. La disminución total o específica de los niveles de p53 en el hígado, provocan un incremento de la grasa hepática de forma independiente de la ingesta. Descubrimos que esta acción está mediada por TAp63 α ya que su disminución hepática reduce la esteatosis en ratones obesos y deficientes en p53. La sobreexpresión de TAp63 α produce esteatosis a través de la activación de IKK IKK β y el estrés del retículo endoplasmático. Por último, encontramos niveles elevados de TAp63 α , IKK β y XBP1 en el hígado de pacientes con esteatosis y esteatohepatitis. **Palabras clave:** esteatosis, esteatohepatitis, ghrelina, p53, p63, metabolismo lipídico.

Abstract

p53 plays an important role in different biological functions such as cell proliferation, longevity, stress and disorders associated with obesity such as steatosis and non-alcoholic steatohepatitis. The aim of this thesis is the study of the role of p53 in hepatic lipid metabolism and the possible mechanisms that lead to metabolic alterations. We found that the lack of p53 causes a decrease in body weight and fat mass due to the activation of thermogenesis in brown adipose tissue. In addition, we observed that p53 is crucial for the adipogenic action of ghrelin in white adipose tissue and in the liver. The total or specific decrease of p53 levels in the liver, cause an increase in liver fat independently of intake. We discovered that this action is mediated by TAp63 α since its hepatic reduction attenuates steatosis in obese and p53-deficient mice. The overexpression of TAp63 α induces steatosis through the activation of IKK IKK β and the stress of the endoplasmic reticulum. Finally, the expression of TAp63 α , IKK β and XBP1 is increased in the liver of patients with steatosis and steatohepatitis. **Key words:** steatosis, steatohepatitis, ghrelin, p53, p63, lipid metabolism.



ÍNDICE





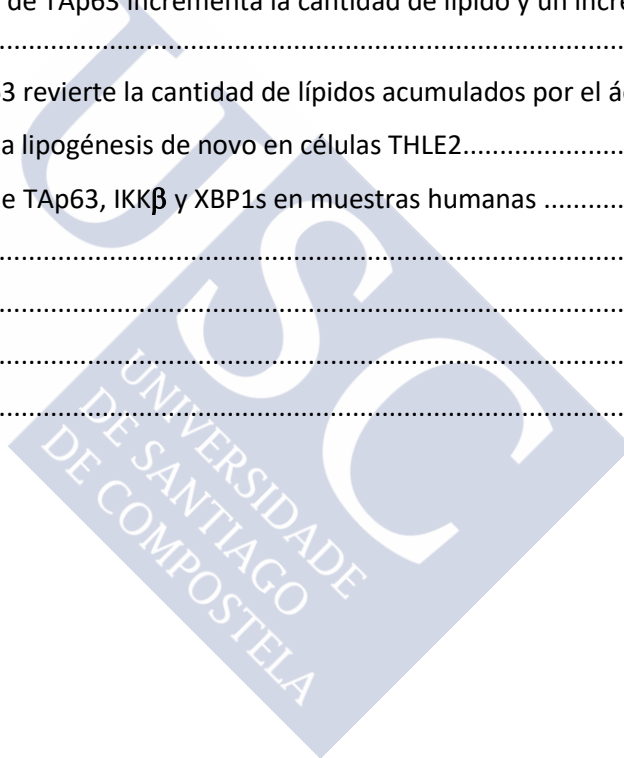
ÍNDICE.....	9
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	17
INTRODUCCIÓN	25
1 OBESIDAD Y SÍNDROME METABÓLICO	27
1.1 Definición y prevalencia	27
1.2 Balance Energético.....	28
1.3 Regulación y control de la ingesta de alimentos.....	30
1.3.1 Sistemas de control a corto plazo.	31
2 METABOLISMO HEPÁTICO	35
2.1 Metabolismo lipídico hepático.....	35
2.1.1 Grasa procedente de la dieta	36
2.1.2 Metabolismo lipídico extrahepático	36
2.1.3 Lipogénesis	37
2.1.4 Captación.....	37
2.1.5 Oxidación.....	37
2.1.6 Secreción de lípidos.....	38
2.1.7 Macroautofagia	39
2.2 Metabolismo hepático de la glucosa	39
2.2.1 Captación, síntesis de glucógeno y gluconeogénesis.....	39
2.2.2 Glucólisis.....	40
3 ENFERMEDADES HEPÁTICAS ASOCIADAS AL SÍNDROME METABÓLICO.....	41
3.1 Prevalencia de NAFLD y NASH.....	42
3.2 Histopatología y clasificación de las enfermedades hepáticas NAFLD y NASH	42
3.3 Patología de NAFLD y NASH	43
4 MECANISMOS CELULARES QUE CONDUCEN AL DAÑO HEPÁTICO	44
4.1 Resistencia a insulina	44
4.1.1 Resistencia a insulina periférica base de la esteatosis hepática asociada a obesidad..	45
4.1.2 Resistencia a insulina hepática.....	46
4.2 Mediadores moleculares de la lipogénesis y su papel en la esteatosis	47
4.3 Lipotoxicidad	50
4.4 Estrés oxidativo	50
4.5 Inflamación.....	51
4.5.1 Principales vías de señalización inflamatorias	52

A.	Factor nuclear $\kappa\beta$ -I κ B quinasa.....	52
4.6	Muerte celular y necrosis	53
4.7	Estrés del retículo endoplasmático	54
4.7.1	UPR y desarrollo de la esteatosis hepática, NAFLD.....	55
4.7.2	LA UPR y la progresión de NAFLD a NASH	58
5	p53 Y SU PAPEL EN EL METABOLISMO	59
5.1	Funciones de p53.....	60
5.2	p53 y la ruta AMPK/mTOR.....	61
5.3	p53 y metabolismo de la glucosa	61
5.4	p53 y estrés oxidativo.....	62
5.5	p53 y metabolismo lipídico	62
5.6	Familia p53: p63 y su papel en el metabolismo hepático	64
5.7	p53 y p63 en el desarrollo de NAFLD	66
	OBJETIVOS	69
	MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
1	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	75
1.1	Modelos animales.....	75
1.2	Genotipado de los ratones transgénicos.....	77
1.2.1	Extracción de ADN a partir de un fragmento de cola.....	77
1.2.2	Amplificación mediante PCR convencional	77
1.2.3	Electroforesis de agarosa	79
2	PROCEDIMIENTOS EN ANIMALES.....	79
2.1	Estabulación y seguimiento de peso e ingesta.....	79
2.2	Fenotipado metabólico	80
2.2.1	Determinación de la composición corporal.....	80
2.2.2	Fotografía termogénica	80
2.2.3	Sistema de calorimetría indirecta.....	81
2.3	Test de tolerancia a glucosa e insulina	82
2.4	Inyección intraperitoneal (ip) y sustancias inyectadas.....	82
2.5	Inyección en la vena de la cola	83
2.6	Sacrificio, recogida de tejidos y muestras	84
3	CULTIVOS CELULARES.....	84
3.1	HepG2, Human caucasian hepatocyte carcinoma.....	84
3.2	THLE2, Transformed Human Liver Epithelial-2.....	84

3.3	Tratamientos celulares.....	85
3.3.1	Transfecciones transitorias	85
3.3.2	Tratamiento con ácido oleico:.....	86
3.3.3	Inmunofluorescencia con Bodipy:.....	86
3.3.4	Obtención de imágenes mediante microscopía confocal:.....	87
3.3.5	Estudio morfológico del del retículo endoplásmico:.....	87
3.4	Estudio del metabolismo lipídico en células THLE2	87
3.4.1	Estudio de la lipogénesis de novo:.....	87
3.4.2	Estudio del recambio y secreción de triglicéridos:.....	88
3.4.3	Estudio de la oxidación de los ácidos grasos:.....	88
4	MUESTRAS HUMANAS	88
5	TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	89
5.1	Análisis histológico del tejido hepático.....	89
5.2	Detección de metabolitos en tejido.....	90
5.2.1	Extracción de grasa hepática.....	90
5.2.2	Determinación de triglicéridos en muestras de grasa hepáticas	90
5.3	Actividad enzimática	90
5.4	Detección de metabolitos en suero	91
5.5	Análisis de la expresión mediante pcr a tiempo real	91
5.5.1	Extracción del ARN	92
5.5.2	Cuantificación del ARN.....	92
5.5.3	Retrotranscripción.....	92
5.5.4	PCR en tiempo real.....	93
5.6	Análisis de la expresión mediante western blot	96
5.6.1	Extracción de proteína a partir de tejido y células.....	96
5.6.2	Cuantificación de los extractos proteicos	96
5.6.3	Preparación de las muestras para la electroforesis SDS-PAGE	97
5.6.4	Electroforesis SDS-PAGE.....	97
5.6.5	Transferencia semi-húmeda.....	98
5.6.6	Inmunodetección	99
6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	101
7	DISEÑO EXPERIMENTAL	102
7.1	Administración crónica periférica de ghrelina	102
7.2	Efectos de la ghrelina sobre explantes de tejido adiposo.....	103

7.3	Fenotipado metabólico de ratones p53 KO en dieta estándar y alta en grasa	103
7.4	Disminución hepática de los niveles de p53.....	104
7.5	Sobreexpresión de p53 en ratones p53 KO obesos.....	105
7.6	Inhibición de p63 en ratones p53 flox.....	106
7.7	Silenciamiento genético de p63 en ratones obesos.....	106
7.8	Sobreexpresión de TAp63 α e inhibición del estrés del retículo endoplasmático.....	107
7.9	Sobreexpresión de TAp63 α durante 2 semanas	108
7.10	Adiministración de C75 en ratones en los que se sobreexpresa TAp63 α	108
7.11	Sobreexpresión de las isoformas TAp63 α y Δ Np63 α en hepatocitos humanos.....	108
7.12	Silenciamiento de TAp63 α en THLE2 tratadas con ácido oleico	109
7.13	Silenciamiento de IKK β	110
7.14	Sobreexpresión de TAp63 α y silenciamiento de IKK β	110
RESULTADOS.....		113
1	CARACTERIZACIÓN DEL ESPECTRO TUMORAL DE LOS RATONES p53 KO.....	115
2	FENOTIPADO METABÓLICO DE RATONES p53 KO ALIMENTADOS CON DIETA ESTÁNDAR Y DIETA ALTA EN GRASA	115
2.1	La ausencia de p53 activa la termogénesis en el tejido adiposo marrón (BAT, Brown Adipose Tissue).....	119
2.2	La ausencia de p53 activa la lipogénesis y la oxidación en el tejido adiposo blanco (WAT, White Adipose Tissue).....	119
3	ACCIONES DE LA GHRELINA EN METABOLISMO DE RATONES p53 KO	120
3.1	La falta de p53 bloquea la ganancia de peso y de masa grasa provocada por la administración periférica crónica de ghrelina.....	120
3.2	La falta de p53 bloquea el efecto lipogénico de la ghrelina en el tejido adiposo blanco (WAT). 122	
3.3	La falta de p53 bloquea el efecto lipogénico de la ghrelina en el hígado	123
3.4	La falta de p53 bloquea la acción hipotalámica de la ghrelina en el metabolismo lipídico.124	
4	EFFECTOS HEPÁTICOS DE LA AUSENCIA DE p53	125
4.1	Los ratones p53 KO alimentados con dieta estándar y dieta alta en grasa muestran mayor contenido de grasa hepática.	125
4.2	La disminución selectiva hepática de p53 provoca esteatosis y esteatohepatitis.	127
4.3	La sobreexpresión de p53 mejora la esteatosis y la esteatohepatitis en ratones p53 KO y en ratones alimentados con dieta alta en grasa.	129
5	p53 regula la expresión de p63 en el hígado.....	131
5.1	Los niveles hepáticos de TAp63 aumentan con dieta alta en grasa.....	133
5.2	La inhibición de p63 mejora la esteatosis hepática provocada por la inactivación de p53.134	

5.3	La inhibición de p63 mejora la esteatosis hepática provocada por una dieta alta en grasa.	135
5.4	La sobreexpresión de TAp63 provoca esteatosis.....	136
5.4.1	La inhibición farmacológica del estrés del retículo endoplasmático revierte la esteatosis provocada por la sobreexpresión de TAp63 α	136
5.4.2	La inhibición genética del estrés del retículo endoplasmático revierte la esteatosis provocada por la sobreexpresión de TAp63 α	137
5.5	Los cambios en el estrés de retículo endoplasmático provocados por la sobreexpresión de TAp63 α ocurren antes que la esteatosis.....	138
5.6	IKK: la unión entre p63 y el estrés del retículo endoplasmático.....	139
6	Efectos de la manipulación genética de p63 en hepatocitos humanos.....	140
6.1	La sobreexpresión de TAp63 incrementa la cantidad de lípido y un incremento del estrés de retículo endoplasmático.	140
6.2	La inhibición TAp63 revierte la cantidad de lípidos acumulados por el ácido oleico	141
6.3	TAp63 α estimula la lipogénesis de novo en células THLE2.....	143
7	Estudio de los niveles de TAp63, IKK β y XBP1s en muestras humanas	144
	DISCUSIÓN.....	147
	CONCLUSIONES	157
	BIBLIOGRAFÍA.....	161
	ANEXO I	177





ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS





ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAV: virus adenoasociados (*adeno-associated virus*)

ACADL: *Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase*

ACADM: *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*

ACC: acetil CoA carboxilasa

ad: adenovirus

ADN: ácido desoxiribonucleico

AgRP: péptido relacionado con agouti (*agouti related protein*)

ALT: alanina aminotransferasa

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

AMPK: proteína quinasa activada por AMP

AP-1: proteína activadora 1

Apo: apolipoproteína

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AST: aspartato aminotransferasa

ATF4: factor de transcripción activador 4.

ATF6: factor de transcripción activante 6 (*Activating Transcription Factor 6*)

ATGL: trilicéridos lipasa (*adipose triglyceride lipase*)

ATP: adenosín trifosfato

BAT: tejido adiposo pardo (*brown adipose tissue*)

BW: peso corporal (*body weight*)

C/EBP: (*CCAAT/enhancer-binding protein*)

CAMKK: proteína quinasa quinasa dependiente de calcio/calmodulina (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase*).

CART: transcriptasa relacionada con la cocaína-amfetamina (*Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*)

CCK: colecitoquinina

CCL2: (*chemokine ligand 2*)

CHOP: proteína homóloga de C/EBP

ChREBP: proteína de unión en respuesta a carbohidratos (*carbohydrate-responsive element-binding protein*)

CPT1: carnitina palmitoiltransferasa 1

CREB: (*cAMP response element-binding*)

DAG: diacilglicerol

DGAT2: (*diacylglycerol O-acyltransferase*)

EE: gasto energético (*energy expenditure*)

eIF2 α : (α -subunit of the translation initiation factor eIF2)

ERAD: componentes de degradación asociados al RE (*ER-associated degradation*)

FAO: fatty acid oxidation

FAS: ácido graso sintasa

FATP: proteína transportadora de ácidos grasos (*fatty acid transport protein*)

FBS: fetal bovine serum

FGF21: factor de crecimiento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*).

FOXO1: Forkhead box O1

FQ: food quotient

G6P: glucosa 6 fosfato

GADD34 (*growth arrest and DNA damage 34*)

GAPDH: gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa

GCKR: regulaor de la glucoquinasa (*glucokinase regulator*)

GFP: proteína verde fluorescente (*Green fluorescent protein*)

GHSR: receptor del secretagogo de la hormona del crecimiento (*growth hormone secretagogue receptor*)

GK: glucoquinasa

GLP-1: péptido similar al glucagón 1 (*glucagon-like peptide-1*)

GLUT: transportador de glucosa (*glucose transporter*)

GRP78: proteína regulada por glucosa 78 (*glucose-regulated protein 78/immunoglobulin-heavy-chain-binding protein*)

GSK3: glucógeno sintasa quinasa 3 (*glycogen synthase kinase 3*)

GTT: test de tolerancia a la glucosa (*glucose test tolerance*)

- HCC:** hepatocarcinoma
- HDL:** lipoproteínas de alta densidad (*High density lipoproteins*)
- HFD:** dieta alta en grasa (*high fat diet*)
- HMG-CoA:** 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa
- HNE:** 4-hidroxinoneal
- HNF:** factor nuclear de hepatocitos (*hepatocyte nuclear factor*)
- HPRT:** *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase*
- HSL:** hormona sensible a lipasa
- IGF-1:** factor de crecimiento similar a la insulina (*insulin-like growth factor*)
- IKK β :** quinasa I κ B (*I κ B kinase*)
- IL:** interleuquina
- IMC:** índice de masa corporal
- INSIG2:** *insulin induced gene 2*
- IR:** resistencia a insulina (*insulin resistance*)
- IRE1 α :** proteína requerida de inositol 1 α (*Inositol Requiring enzyme 1 alpha*)
- IRS:** sustrato del receptor de la insulina (*insulin receptor substrate*)
- ITT:** test de tolerancia a la insulina (*insulin test tolerance*)
- JAK-STAT:** *janus kinase- Signal transducer and activator of transcription*
- JNK:** quinasa C-Jun N-terminal (*C-Jun N-terminal kinase*)
- KO:** knock out
- LA:** actividad locomotora (*locomotor activity*)
- LDL:** lipoproteína de baja densidad (*low density lipoprotein*)
- LKB1:** *liver kinase B1*
- LPL:** lipoproteína lipasa
- LPS:** lipopolisacárido
- LXR:** factor hepático X (*liver X receptor*)
- MAPK:** proteína quinasa activada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*)
- MCD:** dieta deficiente en metionina y colina (*methionine and choline deficient diet*)
- MCPI:** proteína quimioatrayente de monocitos (*monocyte chemoattractant protein-1*)

MDA: malondialdehyde

MGL: monoacilglicerol lipasa

mTOR: (*mammalian target of rapamicyn*)

mTORC: (*mammalian target of rapamicyn complex*)

MTTP: proteína microsomal de transferencia de lípidos (*microsomal triglyceride transfer protein*)

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAFLD: enfermedad de hígado graso no alcohólico (*non alcoholic fatty liver disease*)

NAS: NAFLD activity score

NASH: esteatohepatitis no alcohólica (*Nonalcoholic steatohepatitis*)

NEFFAs: ácidos grasos libres no esterificados (*non-sterified free fatty acids*)

NF κ B: factor nuclear κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NLRP3: *NLR Family Pyrin Domain Containing 3*

NOS2: óxido nítrico sintasa 2 (*nitric oxide synthase 2*)

NPY: neuropéptido Y

OMS: organización mundial de la salud

p70S6: quinasa ribosomal S6 (*ribosomal protein S6 kinase*)

PBS: tampón fosfato salino (*phosphate buffer saline*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*)

PDC: complejo piruvato deshidrogenasa

PDK: piruvato deshidrogenasa quinasa

PECK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*)

PERK: quinasa del factor de transcripción pancreático del retículo endoplásmico iniciador de la traducción eucariota (*PKR-like ER kinase*)

PFK: fosfofructoquinasa 1

PGC1 α : proteína 1 alpha coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*)

PGM: fosfoglicerato mutasa

PI3K: fosfoinositol 3 quinasa (*phosphatidylinositide 3-kinases*)

PK: piruvato quinasa

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

PNPLA3: proteína 3 que contiene el dominio de la fosfolipasa tipo patatin (*patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*)

POMC: proopiomelanocortina

PP1: fosfatasa 1

PPAR α : receptor del peroxisoma-proliferador activado alfa (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*)

PPARs: receptores del peroxisoma-proliferador activado (*peroxisome proliferator-activated receptors*)

PUFAs: ácidos grasos poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acids*)

PYY: péptido YY

QM: quilomicrones

RE: retículo endoplasmático

ROS: especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)

RQ: coeficiente respiratorio (*respiratory quotient*)

RT: *room temperature*

SCD-1: esteoil-CoA desaturasa

SCO2: enzima citocromo c oxidasa 2c

SD: dieta estándar (*standard diet*)

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

shRNA: short hairp ribonuclei acid

siRNA: *small interfering ribonucleotide*

SREBP: proteína de unión reguladora de esteroil tipo 1-c (*sterol regulatory element-binding protein 1c*)

T2DM: diabetes tipo 2 (*type 2 diabetes mellitus*)

TG: triglicéridos

TGF β : factor de crecimiento transformante β (*transforming growth factor β*)

TIGAR: (*TP53 inducible glycolysis and apoptosis regulator*)

TLR: receptor tipo toll

TM6SF2: superfamilia transmembrana 6 (*transmembrane 6 superfamily member 2*)

TNFR2: receptor 2 del factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor receptor 2*)

TNF α : factor de necrosis tumoral α (tumor necrosis factor α)

TRAIL: receptores de ligando inductores de apoptosis relacionados con el factor de necrosis tumoral (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)

TSC2: proteína 2 de la esclerosis tuberosa

TUDCA: ácido tauroso-deoxicólico (*tauroursodeoxycholic acid*)

TZD: tiazolidinedionas

UCP1: proteína desacoplante 1 (*uncouplin protein 1*)

UPR: respuesta a proteínas desplegadas (*unfolded protein response*)

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad (*very low density lipoprotein*)

WAT: tejido adiposo blanco (*white adipose tissue*)

WT: wild type

XPB1: proteína de unión X-box (*X-box binding protein 1*)

ANGLICISMOS

Ballooning: abalonzamiento

Browning: amarronzamiento

Downstream: más abajo

Splicing: corte alternativo

Knockout

Upstream: más arriba

El resto de las abreviaturas son de uso común o bien se detallan de un modo específico en el te

INTRODUCCIÓN





1 OBESIDAD Y SÍNDROME METABÓLICO

1.1 DEFINICIÓN Y PREVALENCIA

El término síndrome metabólico se define como la combinación de factores de riesgo que, cuando se combinan, dan lugar a eventos adversos incluyendo la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) y la enfermedad cardiovascular aumentando el riesgo de mortalidad. Los principales factores de riesgo para desarrollar síndrome metabólico son la falta de actividad física y las dietas altas en grasa y azúcares; esto contribuye a las dos características clínicas principales: la obesidad y la resistencia a insulina (dislipidemia)⁶. Los componentes que definen el síndrome metabólico de acuerdo a los criterios del NIH (*National Institutes of Health*) son:

- ✓ La circunferencia de la cintura: más de 89 cm para las mujeres y 102 cm para los hombres.
- ✓ Hipertrigliceridemia circulante: niveles superiores a 150 mg/dL.
- ✓ Niveles reducidos de lipoproteínas de alta densidad (HDL): menos de 40 mg/dL en hombres y menos de 50 mg/dL en mujeres.
- ✓ Presión arterial elevada: 130/85 milímetros de mercurio o superior.
- ✓ Niveles de glucosa en sangre elevados durante el ayuno: 100 mg/dL o superior.

Presentarán síndrome metabólico aquellas personas que posean tres o más de dichos componentes o si toman medicación para controlarlos.

La obesidad es fundamental para el desarrollo del síndrome metabólico, en la mayoría de los casos precede al resto de los factores de riesgo. Se define, de forma básica, como la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (imagen 1).

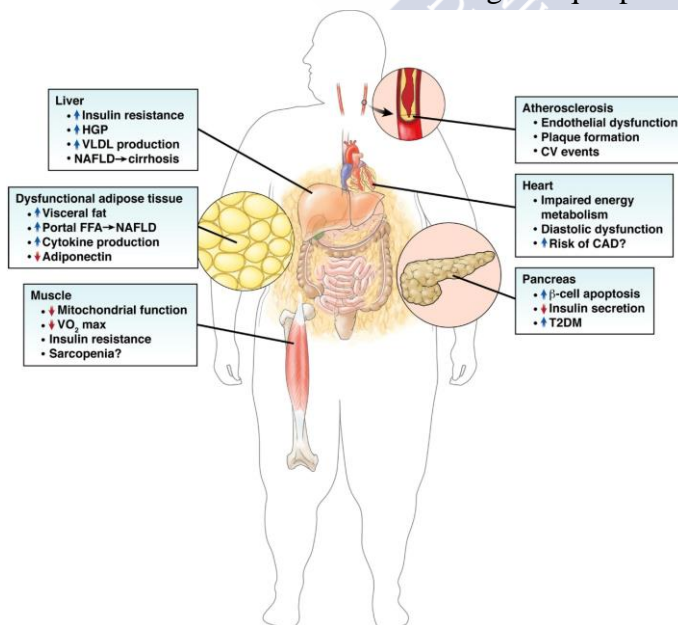


Imagen 1. La obesidad y los metabolitos lipídicos tóxicos derivados de triglicéridos se acumulan en los tejidos ectópicos y conducen a disfunción multiorgánica y enfermedades metabólicas crónicas¹³¹. Con permiso de Elsevier.

La organización mundial de la salud (OMS) clasifica el sobrepeso y la obesidad en base al índice de masa corporal (IMC) que se define como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros (Kg/m^2). Se considera sobrepeso un IMC igual o superior a 25 y la obesidad como un IMC igual o superior a 30. En términos termodinámicos, la obesidad resulta de un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto de energía; sin embargo, su etiología es más compleja. Las circunstancias socioeconómicas, el entorno y los comportamientos personales y las interacciones genotipo-fenotipo deben tenerse en cuenta para comprender la obesidad ya que todos esos factores afectan a la ingesta, el recambio de nutrientes, la termogénesis, la utilización de lípidos, el almacenamiento diferencial de grasa en depósitos que no son los adecuados⁷ (imagen 1).

En 2014, más de 1900 millones de adultos tenían sobrepeso (~32% población) y más de 500 millones eran obesos (8,3% población). Cada año mueren, como mínimo, 2,8 millones de personas a causa de la obesidad y sobrepeso⁸.

La obesidad en general, y especialmente la infantil es uno de los problemas de salud pública más graves del siglo XXI. Los niños con sobrepeso tienen muchas probabilidades de convertirse en adultos obesos y, en comparación con niños sin sobrepeso, tienen más probabilidades de sufrir a edades más tempranas diabetes y enfermedades cardiovasculares, que a su vez se asocian a un aumento de la probabilidad de muerte prematura y discapacidad⁸.

1.2 BALANCE ENERGÉTICO

La complejidad de la regulación del peso corporal representa un gran desafío para entender la etiología de la obesidad y poder así desarrollar estrategias para tratarla y/o prevenirla. Algunas investigaciones apuntan a la importancia de factores genéticos que generan susceptibilidad hacia el desarrollo de la obesidad, sin embargo, el peso, la composición corporal y el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos (TG) en el tejido adiposo, vienen también determinados por factores ambientales y sociales.

Para entender la obesidad, hay que entender el concepto de balance energético y sus componentes (imagen 2): ingesta de energía, almacenamiento y gasto energético.



Imagen 2. Componentes clave del Balance Energético¹⁰.
Adaptación de Spiegelman and Flier, 2001.

Suponiendo que un individuo no tiene ningún problema de absorción de nutrientes, la energía almacenada aumentará sólo si la ingesta excede al total del gasto energético; se produce un estado de balance energético positivo, y la consecuencia es un aumento de la masa corporal, de la cual entre el 60% y el 80% corresponde a la grasa corporal. Por el contrario, cuando el gasto energético excede al consumo, se produce un balance energético negativo y la consecuencia es una pérdida de masa corporal. Cualquier factor genético o ambiental que afecte al peso corporal debe actuar a través de uno o más componentes del balance energético⁹. Aunque la ingesta de energía se debe únicamente a la alimentación, el gasto energético total es más complejo y lo componen la actividad física, el metabolismo basal y la termogénesis adaptativa¹⁰ (imagen 2).

✓ **Actividad física:** se refiere a todo movimiento voluntario y representa entre un 8-15% del gasto metabólico total diario. Es muy variable y contribuye significativamente a las diferencias interindividuales en el gasto energético diario total. En estudios transversales, se ha comprobado que la actividad física es inversamente proporcional al peso corporal. Además, es un rasgo familiar, es decir, tiene influencia biológica, aunque el medio ambiente ejerce un gran impacto¹¹.

✓ **Metabolismo basal:** se define como el gasto energético de un individuo en reposo, en un ambiente termoneutral y un estado postabsorptivo. Aunque se puede determinar evaluando una serie de variables, se mide comúnmente como la tasa de consumo de oxígeno. El concepto de tasa metabólica basal se desarrolló para poder realizar comparaciones del estado metabólico de los animales. Esto es de gran importancia en un contexto clínico para determinar, por ejemplo el estado tiroideo en humanos¹². Desde hace mucho tiempo, se sabe que las hormonas tiroideas regulan el metabolismo basal y que su mal funcionamiento da lugar a alteraciones en la homeostasis energética. El 85% de los pacientes con hipertiroidismo presentan una pérdida de peso a pesar de incrementar su ingesta; por el contrario, el hipotiroidismo, se asocia con una disminución de la tasa metabólica, dando lugar a un aumento de peso a pesar de la disminución de la ingesta¹³.

✓ **Termogénesis adaptativa:** se define como la producción de calor en respuesta a la temperatura ambiental y a la dieta, y sirve para proteger al organismo de la exposición al frío o para regular el balance energético tras los cambios en la dieta. El tejido adiposo marrón (*brown adipose tissue*, BAT), es el lugar más importante donde se produce la termogénesis adaptativa¹⁴. Su capacidad termogénica es importante para la producción de calor en recién nacidos, en roedores y mamíferos que hibernan. Además, ayuda a “quemar” el exceso de energía adquirido por la dieta. Por ello, la captación de glucosa y ácidos grasos para la producción de calor a través de su oxidación en las mitocondrias, hacen a este tejido una diana para un posible tratamiento para la obesidad, diabetes y otros desordenes metabólicos¹⁵.

El BAT contiene pequeñas gotas lipídicas (estructura multilocular) y numerosas mitocondrias en cuya membrana interna se expresa la proteína desacoplante 1 (UCP1)^{16,17}. Esta proteína proporciona una ruta alternativa para el desacoplamiento de la respiración mitocondrial: favorece el gradiente de protones asociado a la fosforilación oxidativa, transformando la energía del gradiente en calor en lugar de adenosín trifosfato (ATP)^{16,17}. Está ampliamente innervado por fibras eferentes del sistema nervioso simpático, lo cual asegura el control central de la termogénesis y presenta gran vascularización, permitiendo así la disipación del calor generado.

La función del BAT está controlada a nivel central a través del sistema nervioso simpático, con la adrenalina como neurotransmisor clave. La activación del sistema nervioso simpático conduce a la liberación de dicho neurotransmisor y a la activación de los receptores β -adrenérgicos que se encuentran en los adipocitos marrones (principalmente el receptor adrenérgico β_3)¹⁸ (imagen 3). Tras la activación del receptor, acoplado a proteínas G, aumentan los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el cual activa a la proteína quinasa A (PKA)^{16,18}. Esta quinasa provoca el incremento de la termogénesis activando la quinasa p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)¹⁹. PKA tiene respuesta de acción crónica y aguda sobre el BAT. La respuesta aguda provoca un aumento en la lipólisis y consecuente liberación de ácidos grasos. Esto ocurre debido a la activación de tres proteínas: triglicérido lipasa (*adipose triglyceride lipase*, ATGL), hormona sensible a lipasa (HSL) y su forma activada por fosforilación, (pHSL) y la monoacylglicerol lipasa (MGL)^{20,21}.

Además de la regulación de la termogénesis a nivel central, existen señales periféricas (imagen 3) que influyen en su activación o inhibición, tales como las hormonas tiroideas que juegan un papel clave en el metabolismo energético actuando sobre tejidos periféricos como el hígado, páncreas, músculo esquelético, tejido adiposo blanco (*white adipose tissue*, WAT) y BAT¹³. En el BAT existe una elevada expresión de los receptores de estas hormonas; estudios genéticos y farmacológicos muestran que su bloqueo da lugar a hipotermia e intolerancia al frío debido a la alteración en la respuesta simpática^{22,23}. Además, las hormonas tiroideas también pueden actuar a nivel central activando el programa termogénico a través de sus acciones sobre el sistema nervioso simpático^{24,25}.

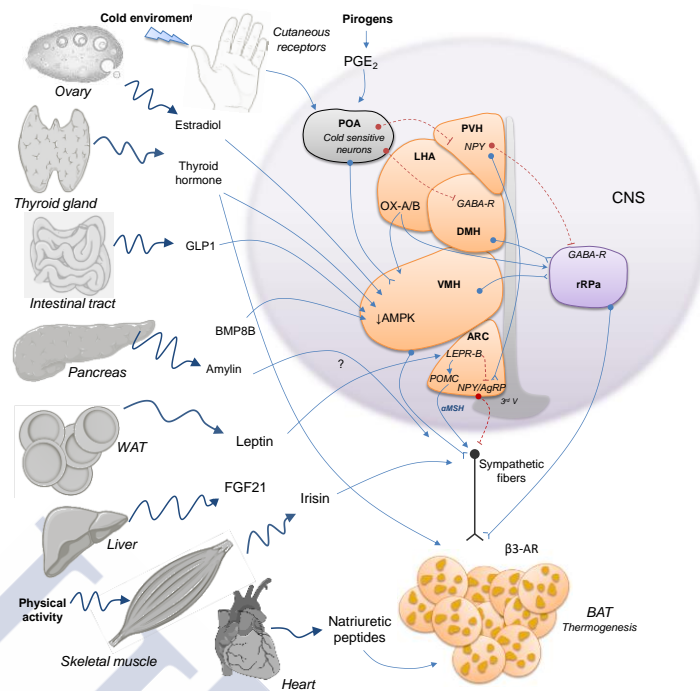


Imagen 3 : Regulación de la termogénesis en el BAT¹⁷. Licencia *creative commons*.

La leptina es una hormona/citoquina que incrementa la actividad del sistema nervioso simpático hacia el BAT²⁶; ratones deficientes en leptina (ratones *ob/ob*) o en su receptor (ratones *db/db*) tienen el BAT atrofiado, con una baja expresión de UCP1 dando lugar a una menor actividad termogénica^{27,28}. El BAT es uno de los tejidos más sensibles a la respuesta a la insulina. En condiciones fisiológicas, en las que los niveles de insulina son elevados, el BAT muestra una gran captación de glucosa^{16,29}. La adiponectina incrementa el consumo de energía a través del receptor activado de proliferación de los peroxisomas alfa, PPAR α (*peroxisome proliferator-activated recepto alpha*)³⁰. Otros estudios, han demostrado que reduce la termogénesis mediante la reducción de la señal de PKA³¹ y la expresión de UCP1^{17,32}.

FGF21 es un regulador metabólico involucrado en el control de la homeostasis de la glucosa, sensibilidad a insulina y cetogénesis. Se produce principalmente en el hígado y se libera a la sangre. Existen numerosos estudios que demuestran el papel del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (*fibroblast growth factor*, FGF21) en la inducción de la termogénesis en el BAT. Actúa bajo el control de PPAR α y la disponibilidad de ácidos grasos libres (*non sterified free fatty acids*, NEFFAs)¹⁷.

1.3 REGULACIÓN Y CONTROL DE LA INGESTA DE ALIMENTOS

Para la supervivencia y la reproducción, el cuerpo ha desarrollado un sistema complejo para controlar eficazmente la homeostasis energética. El cerebro supervisa constantemente el estado metabólico y ajusta su comportamiento, así como a la vez integra la salida de señales a órganos periféricos para asegurar un aporte de energía adecuado. Si el sistema nervioso central

detecta una escasez calórica o un exceso, el cerebro orquesta respuestas que alteran la ingesta de alimentos, la partición nutricional y funciones fisiológicas como la producción de glucosa hepática, la adiposidad y la termogénesis. La interrupción de este delicado equilibrio son las causas de patologías comunes de trastornos metabólicos como la obesidad y la diabetes³³.

La regulación de la alimentación debe dividirse en sistemas de control a corto plazo y sistemas de control a largo plazo. Ambos sistemas están interrelacionados de modo que la respuesta a un déficit de energía va acompañado de un incremento de la ingesta y viceversa¹⁰.

1.3.1 Sistemas de control a corto plazo.

Estos sistemas, a grandes rasgos, indican el “tamaño de las comidas”, es decir, el inicio y el final de la ingesta. Hablamos de la saciedad, respuesta a factores neuroendocrinos como la distensión intestinal y liberación de hormonas que se generan durante los procesos de digestión y absorción. Estas señales influyen en el apetito a través de sus acciones sobre el hipotálamo, el tronco cerebral y el sistema nervioso autónomo. Clasificaremos estas señales según su origen: células de la grasa, tracto gastrointestinal y páncreas³⁴.

Señales del tejido adiposo

Originalmente, se consideraba al tejido adiposo blanco tan solo como un órgano de almacenaje del exceso de calorías ingeridas en forma de triglicéridos; un depósito a partir del cual se liberan NEFFAs durante el ayuno para satisfacer las demandas energéticas del organismo. Estudios llevados a cabo en los últimos años revelan que el WAT es un órgano endocrino extraordinariamente complejo que actúa como regulador de la homeostasis energética³⁵. Libera una amplia gama de factores, incluyendo proteínas complejas, ácidos grasos, prostaglandinas y esteroides, que se sintetizan de novo o se convierten en el tejido adiposo. A estas señales se las denomina adipoquinas³⁶ y pueden actuar a nivel local (autocrino/paracrino) y sistémico (endocrino). Además, este tejido posee numerosos receptores que le permiten responder a las señales aferentes hormonales, así como las procedentes del sistema nervioso central. Así, el WAT, está implicado en la coordinación de una gran variedad de procesos biológicos, además del metabolismo energético, en la regulación de la hematopoyesis, proliferación celular y angiogénesis, inflamación y función inmune.

Además de los adipocitos y células precursoras, el WAT contiene células endoteliales, nerviosas e inmunitarias. Estas últimas son de especial interés ya que se ha puesto de manifiesto que la inflamación puede ser la base del desarrollo de trastornos relacionados con la obesidad. Se ha visto que en WAT de individuos obesos, existe una elevada expresión de proteínas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor*, TNF α), interleuquina 6 (IL6), la óxido nítrico sintasa 2 (*nitric oxide synthase 2*, NOS2), el factor de crecimiento transformante β (*transforming growth factor β* , TGF- β), etc³⁷.

A continuación, describiremos brevemente las acciones de las principales adipoquinas:

- **Leptina:** es una proteína de 167 aminoácidos codificada por el gen *ob*. Se secreta principalmente a partir de los adipocitos aunque también se encontraron ciertos niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en otros tejidos como la placenta, glándulas mamarias, mucosa gástrica e hígado³⁸. Su regulación transcripcional depende del flujo de energía dentro de los adipocitos, por lo que los niveles circulantes de leptina vienen definidos por la masa grasa; aumentan transitoriamente tras las comidas y disminuyen

durante el ayuno^{39,40}. Existen al menos seis isoformas de sus receptores, la principal (Ob-Rb) altamente expresada en el hipotálamo donde la leptina ejerce su acción sobre neuronas que expresen su receptor mediante una ruta de señalización dependiente JAK-STAT (*janus kinase- Signal transducer and activator of transcription*)⁴¹ La principal función de la leptina está mediada a través de su receptor en el cerebro dando lugar a una disminución del apetito y a un aumento del gasto energético, que se explica principalmente por el incremento de la termogénesis. La leptina también ejerce funciones a nivel periférico a través de la expresión de sus receptores en distintos tejidos. Promueve la β -oxidación y la lipólisis e inhibe la síntesis de TG. En los ratones *ob/ob*, el tratamiento con leptina restaura la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a insulina. Estudios con animales y cultivos celulares muestran que la leptina modula la acción de la insulina y viceversa, existiendo una interacción entre las dos vías de señalización⁴². Otros efectos endocrinos importantes de la leptina son, por ejemplo, la regulación de la función inmune, hematopoyesis, angiogénesis, desarrollo óseo y reproducción⁴⁰.

➤ Adiponectina: es un péptido de 244 aminoácidos altamente expresado por el WAT. Su secreción es estimulada por la insulina y otros factores que regulan sus niveles en la sangre. En individuos obesos, el incremento de masa grasa, da lugar a una disminución de la adiponectina circulante mientras que la pérdida de peso tiene como resultado concentraciones aumentadas en humanos y roedores³⁸. En humanos, los niveles circulantes de adiponectina están inversamente relacionados con el IMC⁴³ y la concentración de triglicéridos. Uno de los mecanismos que podrían explicar esta relación inversa es su actuación como factor antiinflamatorio; así, su producción es inhibida por factores proinflamatorios como TNF α , IL6, el estrés y la hipoxia⁴⁴. Posee dos receptores: AdipoR1 que se expresa principalmente en el músculo esquelético y AdipoR2, en el hígado⁴⁵. Ambos receptores actúan a través de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y PPAR α ³⁶. En el hígado, aumenta la β -oxidación y disminuye la gluconeogénesis. Además, los niveles de AdipoR1 y AdipoR2 están disminuidos en NASH. En el músculo, la unión con el receptor da lugar a un incremento de la β -oxidación y de la captación de glucosa. Reduce los niveles plasmáticos de glucosa y triglicéridos.

➤ Resistina: es un péptido de 12 KDa que se sintetiza principalmente en adipocitos aunque se han encontrado niveles bajos de ARNm en otros tejidos como el hipotálamo, glándula adrenal, bazo, músculo esquelético, páncreas y tracto gastrointestinal⁴⁶. Aunque es principalmente una adipoquina, en humanos puede ser sintetizada por el músculo, células pancreáticas y macrófagos⁴⁷. El patrón de secreción de la resistina es similar al observado en leptina. Los niveles circulantes incrementan tras las comidas y con el aumento de la masa grasa; se ve ampliamente afectada por el estado nutricional y metabólico ya que el ayuno da lugar a una disminución de los niveles de ARNm⁴⁸. Estudios en ratones deficientes en resistina muestran bajos niveles de glucosa en sangre debido a una menor producción hepática; su tratamiento con resistina administrada de forma periférica no afecta al peso corporal ni a la ingesta⁴⁹. Sin embargo, la administración central de resistina parece tener un efecto en la homeostasis metabólica por un lado inhibiendo la ingesta, y por otro lado induciendo la resistencia a insulina en el hígado. Estudios posteriores demostraron que la

administración central crónica de resistina reduce el peso corporal y activa la lipogénesis de novo en el hígado y en el WAT^{50,51}.

Señales procedentes del páncreas

❖ Insulina: A pesar de los períodos de ayuno y alimentación, la concentración de glucosa en plasma permanece en un rango estable (4-7 mM) en individuos normales. Este control se debe al equilibrio que existe entre la absorción de glucosa a través del intestino, la producción hepática y la captación por parte de los tejidos periféricos en función de la demanda metabólica. La insulina incrementa la captación de glucosa en el músculo y en la grasa e inhibe su síntesis en el hígado. Promueve el almacenamiento de los sustratos mediante la lipogénesis en el músculo y la grasa, mientras que inhibe la gluconeogénesis en el hígado. Estimula la glucólisis y la síntesis de proteínas, el crecimiento y la diferenciación celular⁵².

El receptor de la insulina es del tipo factor de crecimiento similar a la insulina (*insulin-like growth factor*, IGF-I) es una proteína tetramérica que consiste en dos subunidades α y dos subunidades β que poseen actividad tirosina quinasa. Con la unión de la insulina, se produce la autofosforilación de dichas tirosinas que actúan como sitios de unión para los siguientes componentes de la ruta de señalización. El receptor de la insulina posee 9 sustratos diferentes, de los cuales, cuatro son del tipo sustrato receptor de insulina (insulin-receptor substrate, IRS)⁵³. Los sustratos poseen diferentes funciones según su distribución tisular. Principalmente hay dos vías de transducción de señales activadas por la insulina: 1) vía de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) a través de la cual regula el metabolismo de glucosa y lípidos. 2) Vía de las MAPK que regula la síntesis de proteínas. La vía fosfatidilinositol 3 quinasa (*phosphatidylinositide 3-kinase*, PI3K) es la principal a través de la cual la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y lípidos. Esta vía transmite múltiples señales; la mejor caracterizada es la vía PI3K/Akt y PI3K/PKC (proteína quinasa C)^{54,55}. Existen otras quinasas como la quinasa C-Jun N-terminal (*C-Jun N-terminal kinase*, JNK), la quinasa I κ B (*I κ B kinase*, IKK β), PKC, mTORC (*mammalian target of rapamycin complex*) y la proteína ribosomal quinasa (*ribosomal protein S6 kinase*, p70S6) que pueden fosforilar varios residuos de serinas en los sustratos para los receptores de insulina. En general, dichas fosforilaciones actúan como reguladores negativos, disminuyendo la respuesta en la señalización de la insulina⁵⁶.

❖ Glucagón: es una hormona secretada por las células alfa de los islotes de *Langerhans* pancreáticos derivado del gen pre-pro-glucagón, en respuesta a bajos niveles de glucosa plasmática⁵⁷. Esta hormona contrarresta la hipoglucemia y se opone a las acciones de la insulina mediante la activación de la síntesis y movilización de la glucosa hepática⁵⁸. Sin embargo, además de su implicación en el metabolismo de la glucosa, se ha descrito que el glucagón también está involucrado en la regulación del metabolismo lipídico y gasto energético. Numerosos estudios han descrito que el efecto del glucagón sobre el metabolismo lipídico se traduce en una reducción de la síntesis y secreción de componentes implicados en el almacenamiento energético (TG,

lipoproteínas de muy baja densidad (*very low density lipoprotein*, VLDL), colesterol) y en una movilización lipídica^{59,60}. Se ha descrito que la administración periférica de glucagón reduce la ingesta pero este efecto es más acusado cuando la administración es central⁶¹; la acción anorexigénica del glucagón implican la vía PKA/proteína quinasa dependiente de calcio calmodulina (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase* CAMKK/AMPK en el arcuato⁶²).

Señales del tracto gastrointestinal

❖ Ghrelina: se descubrió como un ligando endógeno para el receptor secretagogo de la hormona de crecimiento (*growth hormone secretagogue receptor*, GHSR)⁶³. Se trata de un péptido de 28 aminoácidos producido y secretado por las células parietales del estómago⁶⁴. La expresión de ARNm de la ghrelina aumenta por la pérdida de peso, el ayuno y la hipoglucemia inducida por la insulina. Su administración periférica estimula la ingesta de alimentos y disminuye la utilización de la grasa. Por lo tanto, se ha propuesto a la ghrelina como una señal entérica involucrada en la homeostasis energética, siendo la única hormona peptídica que estimula el apetito en lugar de actuar como una señal de saciedad⁶⁵. Además de su efecto hiperfágico, se ha demostrado que la ghrelina provoca un aumento de la masa grasa tras su administración central^{66,67} o periférica⁶⁸. Para conocer los mecanismos moleculares que llevan a dicha adiposidad, estudios *in vitro* han demostrado que la ghrelina estimula la diferenciación de preadipocitos de rata⁶⁹ y estimula la acumulación de lípidos así como la apoptosis inducida por TNF α en adipocitos viscerales humanos^{70,71}. Además de sus acciones directas sobre el WAT, la infusión crónica de ghrelina provoca esteatosis hepática, aumentando el número de gotas lipídicas y el contenido de TG debido a un mecanismo dependiente receptor GHSR1a⁷². De forma similar, la administración central crónica de ghrelina también favorece la acumulación de lípidos hepáticos y reduce su movilización⁶⁷. Los efectos anabólicos de esta hormona, son parcialmente independientes de su efecto hiperfágico ya que se ha visto que en ratas obesas inducidas por dieta, aumenta la adiposidad y la expresión de enzimas lipogénicas sin efectos hiperfágicos debido a la resistencia de los efectos orexigénicos de la ghrelina en las neuronas ArRP/NPY⁷³.

❖ CCK (Colecitoquinia): péptido sintetizado en el yeyuno y duodeno en respuesta a la presencia de nutrientes. Tiene una vida media de entre 1-2 minutos, siendo su principal acción reducir el apetito activando aferencias del nervio vago. Tiene funciones locales como el retraso del vaciado gástrico, estimulación de la secreción de enzimas pancreáticas y contracción de la vesícula biliar⁷⁴.

❖ GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*): es una incretina derivada del procesamiento post-transcripcional del gen pre-pro-glucagón en las células L del intestino y en el sistema nervioso central⁷⁵. Las acciones de GLP-1 abarcan diversos tejidos, estimulando la secreción de insulina en el páncreas, retrasando el vaciado gástrico e incrementando la presión sanguínea en el corazón. En el cerebro, GLP-1 ejerce su acción metabólica entre otras zonas, en el hipotálamo, actuando como una hormona de saciedad y en el metabolismo de la glucosa. La activación de GLP-1 central inhibe la captación de glucosa en el músculo, favoreciendo la liberación de insulina⁷⁶. Las

acciones centrales de GLP-1 también involucran al metabolismo lipídico en el WAT reduciendo el almacenamiento de TG independientemente de la ingesta ⁷⁷. El BAT está también regulado por los efectos centrales de GLP-1, ya que incrementa el programa termogénico, favoreciendo la transformación de los adipocitos del WAT a un fenotipo de adipocito marrón (*browning*) ^{78,79}.

❖ PYY (péptido Y): este péptido se localiza a lo largo del intestino con una mayor concentración en el colón y en el recto. Aunque existe alguna controversia al respecto, la forma 1-36 es orexigénica mientras que PYY 3-36 ejerce un efecto anorexigénico. Sus efectos post-pandriales incluyen retraso del vaciado gástrico y reducción de la secreción gástrica. Se han detectado acciones sobre el metabolismo de la glucosa pero con un componente de dimorfismo sexual, que puede ser asociado a las diferencias de género sobre el eje hipotálamo-hipofisario ⁸⁰.

2 METABOLISMO HEPÁTICO

2.1 METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO

El hígado es un órgano metabólico clave que controla el metabolismo energético del cuerpo. Actúa como un centro para conectar metabólicamente a varios tejidos, incluidos el músculo esquelético y el tejido adiposo. Su metabolismo está estrechamente controlado. Se han identificado múltiples señales nutritivas, hormonales y neuronales para regular el metabolismo de la glucosa, lípidos y los aminoácidos. La disfunción de la señalización hepática y el metabolismo causa o predispone a la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y/o diabetes tipo 2⁸¹.

Tras la digestión, la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos se transportan al hígado. En estado posprandial, la glucosa se almacena en forma de glucógeno y/o se convierte en ácidos grasos o aminoácidos. El hígado es el principal órgano que puede convertir carbohidratos en ácidos grasos. Cuando existe un exceso de glucosa en los hepatocitos, los ácidos grasos libres se esterifican con glicerol-3-fosfato para generar TG que se almacenan en gotas lipídicas o bien se empaquetan y secretan a la circulación como partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) hacia el WAT y otros tejidos extrahepáticos (imagen 4). Los aminoácidos se metabolizan para proporcionar energía o se utilizan para sintetizar proteínas, glucosa y/u otras moléculas bioactivas. En ayuno o durante el ejercicio, los combustibles (glucosa y TG) se liberan desde el hígado a la circulación y se metabolizan en el músculo, tejido adiposo y otros

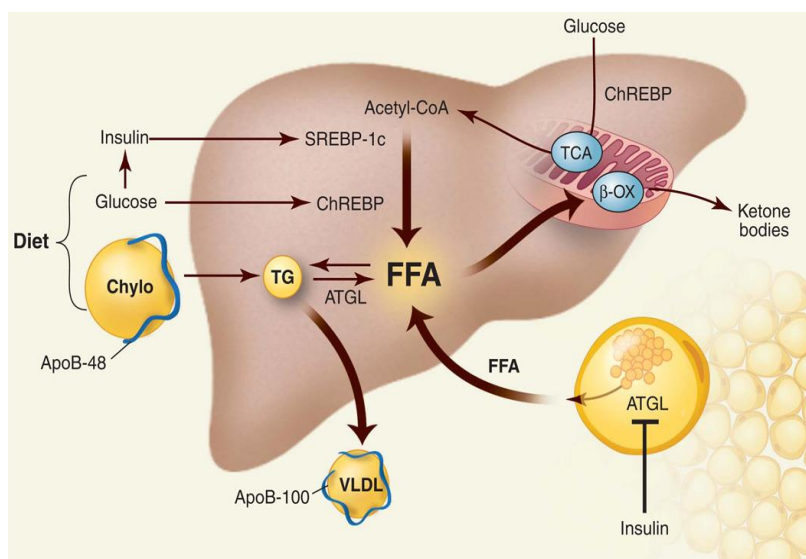


Imagen 4 : Metabolismo hepático de TG¹.
Con permiso de American ASSN for the
advancement of science.

tejidos. El WAT produce y libera NEFFAs y glicerol a través de la lipólisis. El músculo descompone el glucógeno y las proteínas liberando lactato y alanina. Lactato, alanina y glicerol vuelven al hígado para ser utilizados como precursores para la síntesis de glucosa (gluconeogénesis). Los NEFFAs se oxidan en las mitocondrias hepáticas a través de la β -oxidación generando cuerpos cetónicos (cetogénesis) (imagen 4) los cuales proporcionan combustibles metabólicos para los tejidos extrahepáticos durante períodos de inanición o durante el ejercicio⁸¹.

2.1.1 Grasa procedente de la dieta

El hígado es altamente susceptible a alteraciones en el contenido de lípidos de la dieta. La esteatosis hepática se desarrolla en humanos y roedores en los primeros días de inicio de dieta alta en grasa. Esto no es de extrañar ya que el 75% del aporte sanguíneo que recibe el hígado procede de la vena porta hepática que transporta la sangre procedente del tracto gastrointestinal, páncreas, bazo y vesícula biliar al hígado. Aproximadamente entre un 15-20% del contenido de TG proceden de la grasa de la dieta⁸².

2.1.2 Metabolismo lipídico extrahepático

Comienza con la absorción intestinal de las grasas procedentes de la dieta. Para poder pasar del lumen intestinal al plasma, los lípidos son emulsionados e hidrolizados por los ácidos biliares dentro del lumen. Los lípidos hidrolizados son absorbidos por los enterocitos donde son empaquetados en partículas de lipoproteínas (quilomicrones nacientes). Se secretan al sistema linfático y entran en la circulación. Durante su viaje pierden dos apolipoproteínas, ApoA-I y ApoA-IV, que son sustituidas por ApoE y ApoC-II, importantes para su procesado. ApoC-II activa a la lipoproteína lipasa (LPL) que facilita la digestión de los quilomicrones a ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos son captados parcialmente por los adipocitos mientras que los quilomicrones remanentes vuelven a la circulación. ApoE es reconocido por el receptor de lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein*, LDL) en el hepatocito lo que facilita su captación. Dentro del hepatocito los quilomicrones remanentes son eliminados por lisosomas liberando glicerol, ácidos grasos, colesterol, aminoácidos y residuos de fosfato que son metabolizados y reciclados en nuevas partículas, VLDL⁸³.

2.1.3 Lipogénesis

La lipogénesis implica la síntesis de ácidos grasos *de novo* a partir de intermediarios metabólicos como el acetil-CoA o el malonil-CoA. Está altamente regulada por la glucosa y la insulina, que activan factores de transcripción como la proteína de unión reguladora de esteroles tipo 1-c (*sterol regulatory element-binding protein 1c*, SREBP1c) y la proteína de unión en respuesta a carbohidratos (*carbohydrate-responsive element-binding protein*, ChREBP) en el núcleo (imagen 4). La insulina activa SREBP1c a través de la vía de señalización AKT, factor hepático X (*liver X receptor*, LXR) y mTOR⁸⁴. SREBP1c es la isoforma más expresada en el hígado; tiene funciones superpuestas con otra proteína de la misma familia, SREBP2 pero ésta, está implicada en la regulación del metabolismo del colesterol⁸⁵. Los ratones transgénicos para SREBP1c, donde incrementa su expresión, poseen mayor actividad lipogénica⁸⁶. La glucosa promueve la lipogénesis activando a ChREBP⁸⁷ que al igual que SREBP1c, regula de forma positiva la expresión de múltiples genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos como la acetil CoA carboxilasa (ACC), la ácido graso sintasa (FAS) y la esteoil CoA desaturasa (SCD1)^{87,88}. ChREBP, además, incrementa genes involucrados en la glucólisis lo cual proporciona más sustratos para la síntesis de NEFFAs y TG⁸⁷.

Dependiendo del estado metabólico, los ácidos grasos son procesados hacia TG e inmediatamente almacenados o bien son rápidamente oxidados como fuente de energía durante un estado de ayuno (imagen 4). En individuos sanos, en ayuno, la tasa de lipogénesis *de novo* es de aproximadamente el 5% mientras que durante la comida incrementa hasta un 23%. Sin embargo, en pacientes con NAFLD que presentan hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia, muestran un incremento de la lipogénesis *de novo* hasta un 26% tras un ayuno^{82,83}.

2.1.4 Captación

Otra fuente de ácidos grasos en el hepatocito es el reclutamiento desde el torrente sanguíneo. Los ácidos grasos, no solo pasan al interior de la célula de forma pasiva sino también facilitada a través de proteínas transportadoras de ácidos grasos (*fatty acid transport protein*, FATP) como FATP2 y FATP5. Los ratones deficientes en el FATP5 poseen una disminución de la absorción hepática de NEFFAs y por tanto del almacenamiento de TG⁸⁹. La translocasa de ácidos grasos CD36/FAT se expresa en macrófagos, adipocitos, miocitos, enterocitos y hepatocitos facilitando la captación y el tráfico intracelular de los ácidos grasos libres. En roedores con esteatosis hepática, la expresión de CD36/FAT se incrementa, aunque su papel en la enfermedad hepática en humanos no está muy claro. En pacientes con obesidad mórbida, los niveles de ARNm de CD36/FAT se correlacionaron positivamente con el contenido de grasa hepática y con la apoptosis en esteatohepatitis no alcohólica (*Nonalcoholic steatohepatitis*, NASH)^{90,91}.

2.1.5 Oxidación

Facilita la degradación de los ácidos grasos a acetyl-CoA para obtener energía por lo que su tasa será elevada en ayuno y baja en estado posprandial. La oxidación β mitocondrial no solo proporciona energía para los hepatocitos sino que también genera cuerpos cetónicos (β -

hidroxibutirato, acetoacetato y acetona) que se exportan a la circulación y proporcionan combustibles metabólicos para los tejidos extrahepáticos durante el ayuno⁸¹.

Los ácidos grasos se activan mediante la acyl-CoA sintetasa en el citosol. Este proceso es indispensable para que puedan entrar en la mitocondria. Los de cadena media y corta pueden pasar directamente por difusión, mientras que los de cadena larga lo hacen a través de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1). El malonil CoA, intermediario en la síntesis *de novo* de TG, es un inhibidor alostérico de CPT1⁸³.

PPAR α y la insulina están involucrados en la regulación de la oxidación⁹². PPAR α regula de forma positiva las proteínas de transporte de ácidos grasos y enzimas relacionadas con el metabolismo de la ApoB⁹³.

En circunstancias normales, los ácidos grasos de cadena corta, media y larga sufren β -oxidación en las mitocondrias, mientras que los ácidos grasos de cadena muy larga se oxidan en los peroxisomas. En situaciones de sobrecarga de ácidos grasos o en diabéticos, la ω -oxidación, tiene lugar en el retículo endoplasmático⁹⁴.

2.1.6 Secreción de lípidos

Aunque los mecanismos de cómo las lipoproteínas se ensamblan y son secretadas no se conoce en detalle, hay tres componentes esenciales para el proceso: ApoB, la principal proteína responsable del ensamblaje y secreción de lípidos; una cantidad adecuada de lípidos y la enzima responsable de su transferencia hacia las lipoproteínas nacientes, la proteína microsomal de transferencia de lípidos (*microsomal triglyceride transfer protein*, MTTP). Por lo tanto, mutaciones en Apob o deleciones en Mttp, reducen la secreción hepática de las VLDL y provocan esteatosis⁹⁵. En humanos, mutaciones en el exón 26 de Apob resulta en elevados niveles de colesterol, hígado graso y posible cirrosis y hepatocarcinoma⁹⁶. La secreción de VLDL desde el hígado está a menudo incrementada en pacientes con esteatosis; la tasa de secreción de lípidos es lineal conforme a su incremento, hasta que se alcanza una meseta (umbral) en el que los niveles de lípidos hepáticos exceden el 10%. En esos casos, a pesar de la secreción, no se revierte la enfermedad de hígado graso no alcohólico (*Nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD⁸²).

2.1.7 Macroautofagia

Estudios recientes han relacionado la macroautofagia con la homeostasis lipídica en el hígado⁹⁷. Mediante la ruta lisosomal, se reciclan los constituyentes celulares prescindibles en fuentes de energía durante un estado de ayuno⁹⁸. Estudios recientes en animales sugieren que es un proceso clave en la lipólisis hepática y degradación de la gota lipídica. Durante la inanición, la macroautofagia conduce a la fusión de lisosomas y gotas lipídicas dentro de autofagosomas que son degradados; los ácidos grasos son por tanto liberados (imagen 5) y pueden ser catabolizados vía oxidación o a cuerpos cetónicos en caso de inanición. Además, el glicerol liberado en la degradación de los TG, se puede convertir en glucosa vía gluconeogénesis hepática.

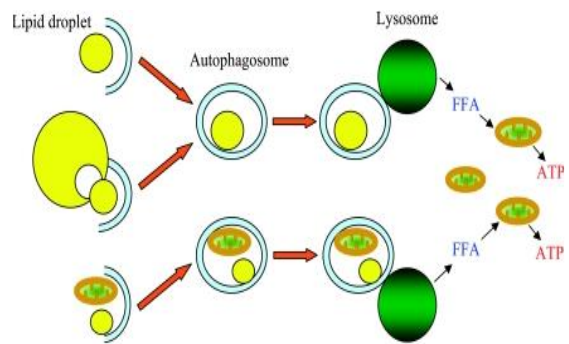


Imagen 5 : Función de la macroautofagia en el metabolismo lipídico hepático⁹⁷. Con permiso de *American Physiological Society*.

2.2 METABOLISMO HEPÁTICO DE LA GLUCOSA

2.2.1 Captación, síntesis de glucógeno y gluconeogénesis

El hígado desempeña un papel fundamental en el metabolismo de la glucosa ya que regula su concentración en sangre. La glucosa llega a los hepatocitos a través de los transportadores de glucosa, GLUT2. La delección de este transportador bloquea su entrada a la célula sin afectar a la síntesis de novo; esto sugiere que la glucosa puede utilizar otros mecanismos de entrada⁹⁹. Tras su entrada, la glucosa se fosforila a glucosa-6-fosfato (G6P) mediante la enzima glucoquinasa (GK). Se sabe que las mutaciones en el gen de la GK están implicadas en el desarrollo de NAFLD⁹¹. Se regula transcripcionalmente por SREBP1c, por los factores nucleares de hepatocito (*hepatocyte nuclear factor*, HNF) HNF4 α , HNF6, FOXO1 (*Forkhead box O1*)⁸³ (imagen 5). La G6P no puede ser pasar a través de los transportadores por lo que es retenida en el interior del hepatocito.

Tras la ingesta, la G6P actúa como precursor para la síntesis de glucógeno a través de la glucógeno sintasa¹⁰⁰. La insulina activa a la fosfoprotein fosfatasa, la cuál cataliza la hidrólisis de los grupos fosfato de varios enzimas implicados en el metabolismo del glucógeno, incluyendo la glucógeno sintasa. Esta enzima solo está activa cuando no está fosforilada y este hecho es dependiente del PKA la cuál se activa alostericamente por la G6P y además está finamente regulada por la ratio glucagon/insulina. En ayuno, la concentración de insulina disminuye. El glucagón y las catecolaminas, secretadas por las células α del páncreas y la médula adrenal respectivamente, activan a PKA la cual activa a la glucógeno fosforilasa⁸¹.

Durante períodos cortos de ayuno, el hígado produce glucosa principalmente a través de la glucógenolisis. Sin embargo, el glucógeno se agota rápidamente durante las 2-6 horas de ayuno y decrece progresivamente después de las 12-40 horas; luego entra en juego un segundo aporte de glucosa proveniente de la gluconeogénesis, capaz de mantener la homeostasis de la glucosa

hasta las 60 horas de ayuno¹⁰¹. En la gluconeogénesis, el hepatocito es capaz de producir glucosa a partir de precursores como lactato, piruvato, glicerol y aminoácidos. La tasa de gluconeogénica se controla por la activación de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PECK), fructosa-1,6-bifosfatasa y la G6P fosfatasa¹⁰². En ayuno, hormonas catabólicas, como el glucagón, dan lugar a una señalización mediada por AMP cíclico que desencadenan la interacción de CREB con sus coactivadores para dar lugar a la activación transcripcional de genes gluconeogénicos¹⁰³. Además del elemento de respuesta a AMPc (*cAMP response element-binding*, CREB), FOXO1 junto con la proteína 1 alpha coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*, PGC1 α) y otros factores tienen efectos transcripcionales sobre genes gluconeogénicos en ayuno gracias a la falta de señalización de la vía de insulina y su principal diana AKT¹⁰⁴. De forma contraria, después de la ingesta, la terminación de la gluconeogénesis hepática se alcanza por la inhibición transcripcional de genes gluconeogénicos por insulina. Concretamente, en estas condiciones, cuando los niveles de insulina son elevados se activa la señalización por AKT de forma que se impide la actuación de FOXO1 sobre la transcripción de genes gluconeogénicos¹⁰⁵.

2.2.2 Glucólisis

Los hepatocitos poseen una gran flexibilidad a la hora de seleccionar combustibles para la obtención de energía (glucosa y/o ácidos grasos). Dicha selección está regulada por señales hormonales. Tras la ingesta, momento en que la glucosa es abundante, el hepatocito prefiere la vía glucolítica; la G6P se metaboliza para generar piruvato y otros intermediarios que se utilizan para la síntesis de lípidos y aminoácidos o bien se procesa en el ciclo de Krebs para obtener energía. En ayuno, estado en que la concentración de glucosa es baja, el hepatocito oxida ácidos grasos para obtener energía⁸¹.

La glucólisis está regulada por cuatro enzimas principales: la GK, fosfofructoquinasa 1 (PFK), la piruvato kinasa (PK) y las piruvato deshidrogenasa quinasa (PDKs). Durante el

ayuno, la expresión de estas enzimas se encuentra baja mientras que tras la ingesta incrementan su actividad glucolítica¹⁰⁶. La glucosa puede activar factores de transcripción como ChREBP que induce la expresión de genes como la PK dando lugar a piruvato. ChREBP juega por tanto un papel crítico para el depósito del exceso de carbohidratos en forma de grasas pudiendo contribuir al desequilibrio entre el consumo de nutrientes y su almacenaje favoreciendo la obesidad¹⁰⁷ (imagen 6).

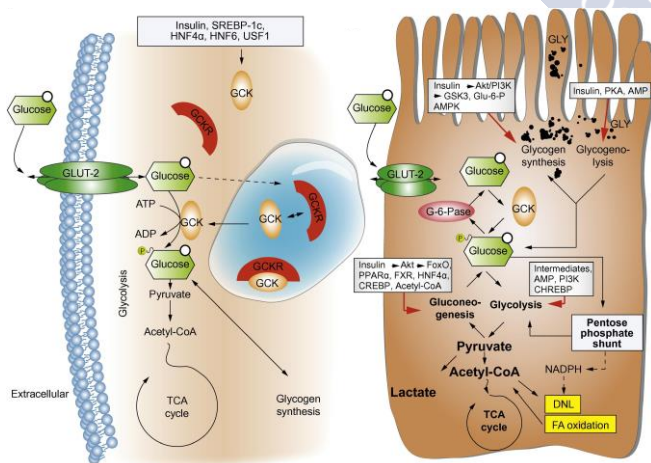


Imagen 6 : Metabolismo hepático de la glucosa⁸³. Licencia creative commons.

3 ENFERMEDADES HEPÁTICAS ASOCIADAS AL SÍNDROME METABÓLICO

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (*nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD) se define como la presencia de más de un 5% triglicéridos en los hepatocitos, en ausencia de otras patologías hepáticas como infecciones víricas crónicas como la hepatitis, el uso de medicamentos que inducen esteatosis y otras enfermedades como hepatitis autoinmune, hemocromatosis, enfermedad de Wilson o consumo de alcohol¹⁰⁸. La NAFLD está fuertemente asociada con las características del síndrome metabólico, que incluyen obesidad, resistencia a insulina (*insulin resistance*, IR) o T2DM y dislipidemia; por lo tanto, se considera la manifestación hepática de este síndrome. Se ha convertido en la causa más frecuente de disfunción hepática en muchos países desarrollados o en vías de desarrollo, en línea creciente con la prevalencia en aumento de la obesidad e IR. Se prevé además, que sea la causa principal para el trasplante hepático en varios países en una década ya que la incidencia de daño hepático más severo (cirrosis) por hepatitis viral crónica disminuye, mientras que la de NAFLD aumenta⁹¹.

La NAFLD se presenta como una enfermedad inflamatoria hepática crónica con un amplio espectro de estadios, como podemos observar en la imagen 7, desde una simple esteatosis (acumulación intrahepática de TG) hacia NASH y hasta fases finales de la enfermedad como la fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma celular. En paralelo a dicha acumulación de lípidos, pueden ocurrir otros eventos dañinos como lipotoxicidad, estrés oxidativo, inflamación, apoptosis, etc. que son los que provocan la progresión de NAFLD a NASH y hacia fibrosis, cirrosis y, en último caso, a hepatocarcinoma¹⁰⁹.

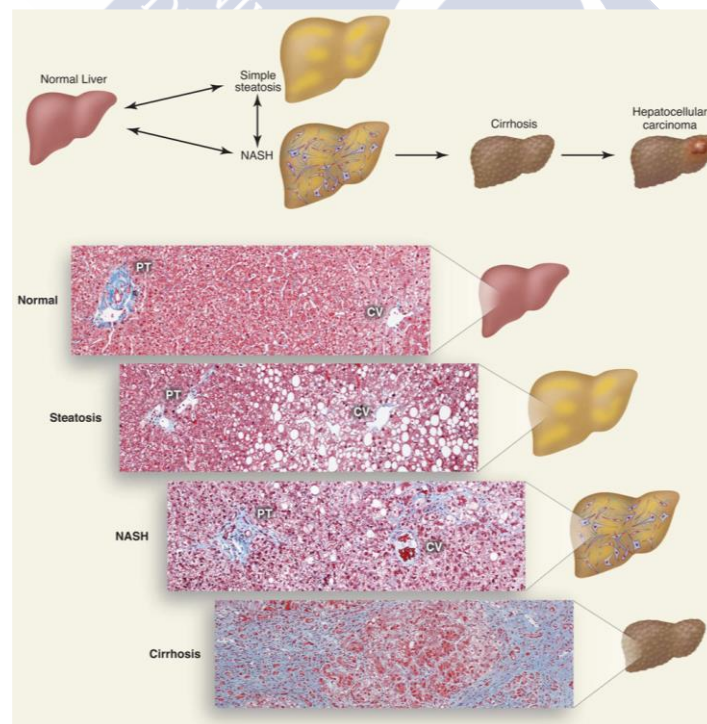


Imagen 7 : El espectro de la enfermedad del hígado graso no alcohólico¹.
Con permiso de *American ASSN for the advancement of Science*.

3.1 PREVALENCIA DE NAFLD Y NASH

Existen limitaciones a la hora de realizar las estimaciones de la prevalencia de NAFLD tanto por la población estudiada (etnia, sexo..) como por la sensibilidad de la técnica de diagnóstico utilizada. La disponibilidad de técnicas no invasivas para estudiar el metabolismo hepático en humanos son limitadas; se requieren biopsias hepáticas para identificar a los individuos con NASH, lo cual impide realizar grandes estudios poblacionales⁸⁵. A pesar de sus limitaciones, la biopsia hepática sigue siendo el método estándar. Otras técnicas no invasivas como las basadas en imagen (tomografías, resonancia magnética..) proporcionan una evaluación del contenido de triglicéridos hepáticos pero no pueden distinguir entre esteatosis y NASH o detectar fibrosis poco avanzadas. Los estudios basados en la bioquímica hepática informan de una menor prevalencia de NAFLD que los estudios basados en imágenes o biopsias¹¹⁰.

Clínicamente, los pacientes con NAFLD suelen ser obesos con resistencia a insulina y/o diabetes tipo 2, dislipidemia, hipertrigliceridemia, hipertensión; todos ellos factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular. De hecho, la prevalencia de NAFLD en pacientes con componentes del síndrome metabólico es muy alta. El 76% de los pacientes con diabetes, desarrollan NAFLD y el 90% de los pacientes con obesidad severa sometidos a cirugía bariátrica, tienen NAFLD¹⁰⁸. La prevalencia de NAFLD en personas con un IMC normal, sin la presencia de factores de riesgo metabólico, es de alrededor del 16%¹¹⁰.

La prevalencia obtenida para pacientes con NASH a partir de pacientes con NAFLD, es del 59,1%¹⁰⁸. La mortalidad aumenta en pacientes con NASH y fibrosis avanzada. Un estudio de seguimiento a largo plazo, ha mostrado que en 129 pacientes con NAFLD, la mortalidad no aumentó en aquellos pacientes que mostraban una simple esteatosis pero sí en pacientes con NASH¹¹¹. Aproximadamente el 41% de los pacientes con NASH desarrollan una progresión de fibrosis con una progresión anual del 0,09%. La incidencia anual de hepatocarcinoma (HCC) en pacientes con NAFLD fue del 0,44 por cada 1000 personas al año mientras que para NASH fue de 5,29 por cada 1000 personas al año¹⁰⁸.

3.2 HISTOPATOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES HEPÁTICAS NAFLD Y NASH

El sello histológico de NAFLD es la esteatosis, la acumulación de TG hepáticos; normalmente gotas mixtas grandes (macrovesiculares) y pequeñas (microvesiculares) contenidas dentro de los hepatocitos (imagen 7). La esteatosis macrovesicular es la más extendida en pacientes con NAFLD en donde una gran vacuola de grasa desplaza al núcleo hacia la periferia celular¹¹². Las características histológicas de NASH incluyen esteatosis con lesión hepatocelular e inflamación lobular con o sin fibrosis. Si se produce fibrosis, se producen cambios en la arquitectura hepática como la pérdida de la distribución normal de las queratinas 8 y 18 dentro de los hepatocitos¹¹³. También pueden aparecer cuerpos apoptóticos y necrosis. La lesión en los hepatocitos se describe como *ballooning* que significa que aparecen hinchados y agrandados, con el citoplasma con una apariencia reticulada. Aparecen infiltraciones de linfocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos^{91,114} (imagen 7).

En 1999 el grupo de Brunt *et al.* realizó una evaluación semicuantitativa de lesiones asociadas con NASH estableciendo una clasificación del estado de la fibrosis como se había hecho para otras enfermedades hepáticas crónicas¹¹⁴. Sin embargo, este sistema no tuvo en cuenta que para evaluar la NASH es necesario contar con todas las características de esta enfermedad de forma individual (esteatosis, inflamación y *ballooning*). Más tarde, la NAHS Clinical Research Network (CRN), una red de ocho centros de investigación en EEUU que cooperan entre sí, pertenecientes al National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), validaron un sistema de puntuación que abarca todo el espectro de la NAFLD¹¹⁵. El NAFLD Activity Score (NAS) es un sistema que puntúa de forma independiente cada una de las características de la NASH⁹¹. Se ha utilizado un NAS > 5 para diagnosticar la NASH. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que tan solo un 75% de las biopsias analizadas la NASH presentaban un NAS > 5¹¹⁶; también se puso de manifiesto la falta de criterios histopatológicos unificados¹¹⁷. Con el fin de reducir las variaciones entre patólogos, un consorcio europeo denominado FLIP (*Fatty liver: Inhibition or Progression*) ideó un nuevo sistema de puntuación llamado SAF (*steatosis-activity-fibrosis*)¹¹⁸ (imagen 8). Con este nuevo sistema se distinguen claramente esteatosis de actividad y hepatocitos normales de aquellos adyacentes que tienen *ballooning*. En la siguiente imagen podemos ver los valores asignados².

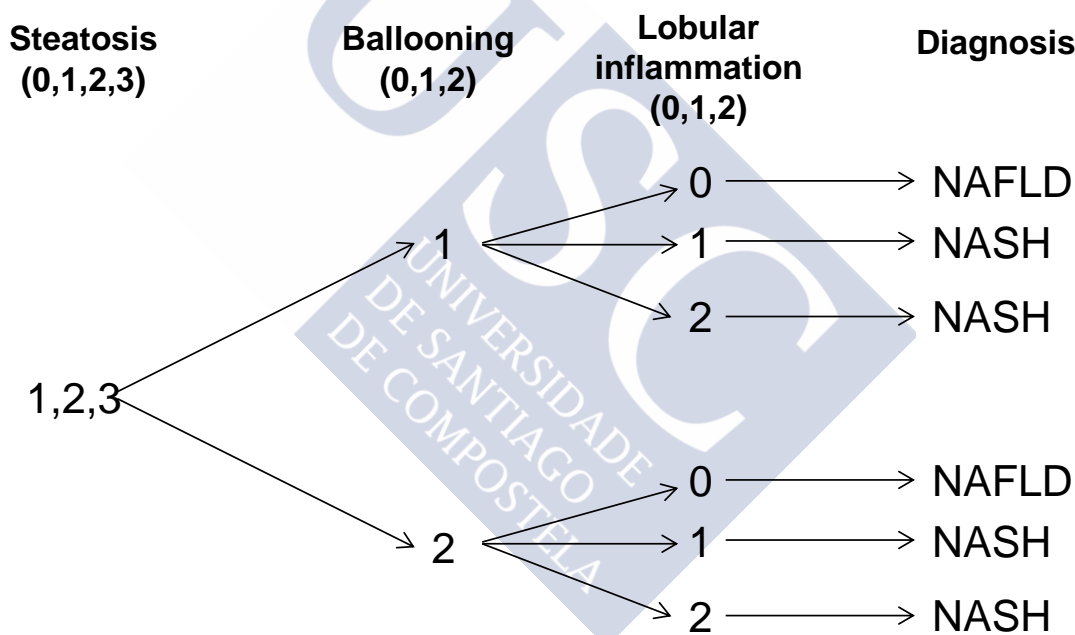


Imagen 8: Algoritmo de diagnóstico y seguimiento de NAFLD adaptado del método de inhibición de la progresión de hígado graso (FLIP) y el método de puntuación SAF².

3.3 PATOLOGÍA DE NAFLD Y NASH

Como principal órgano detoxificante del cuerpo, el hígado juega un papel importante en el control de la homeostasis metabólica como lugar principal de síntesis, metabolismo, almacenaje y redistribución de carbohidratos, lípidos y proteínas⁸³. Los mecanismos implicados en la progresión de la enfermedad hepática, NAFLD y NASH son complejos. En general, para explicar la patogénesis de NAFLD, se acepta que los eventos que conducen a su desarrollo están relacionados con la obesidad y la resistencia a insulina. Estos eventos provocan una mayor liberación de ácidos grasos libres, que podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo de la esteatosis hepática¹¹⁰.

En 1998 Day et al. propusieron la hipótesis de los “dos golpes”. El primer “golpe” consiste en la acumulación de TG y ácidos grasos libres en los hepatocitos como consecuencia del aumento de la lipólisis periférica, de lípidos en la ingesta o bien de la lipogénesis de novo hepática (imagen 9). La simple acumulación de TG citosólicos se considera inerte e incluso la acumulación de gotas lipídicas puede tener un efecto hepatoprotector¹¹⁹. Sin embargo, la acumulación de intermediarios lipotóxicos, como el diacilglicerol (DAG), provocan resistencia a insulina hepática¹²⁰. El segundo “golpe” implica daño hepático (progresión a NASH) provocado por el aumento del flujo continuado de ácidos grasos libres en el hígado generando lipotoxicidad, estrés oxidativo y del retículo endoplasmático (RE), inflamación, apoptosis y alteraciones en los niveles de adipoquinas^{83,110}. Este daño hepático puede terminar con el desarrollo de fibrosis debido a la activación de las células estelares y la deposición de colágeno¹²¹ (imagen 9). Sin embargo, durante los últimos años se cree que el daño hepático se debe a un proceso de “múltiples golpes” que ocurren de forma simultánea y paralela a la acumulación de TG y gotas lipídicas y a los mecanismos fisiopatológicos del NASH previamente mencionados.

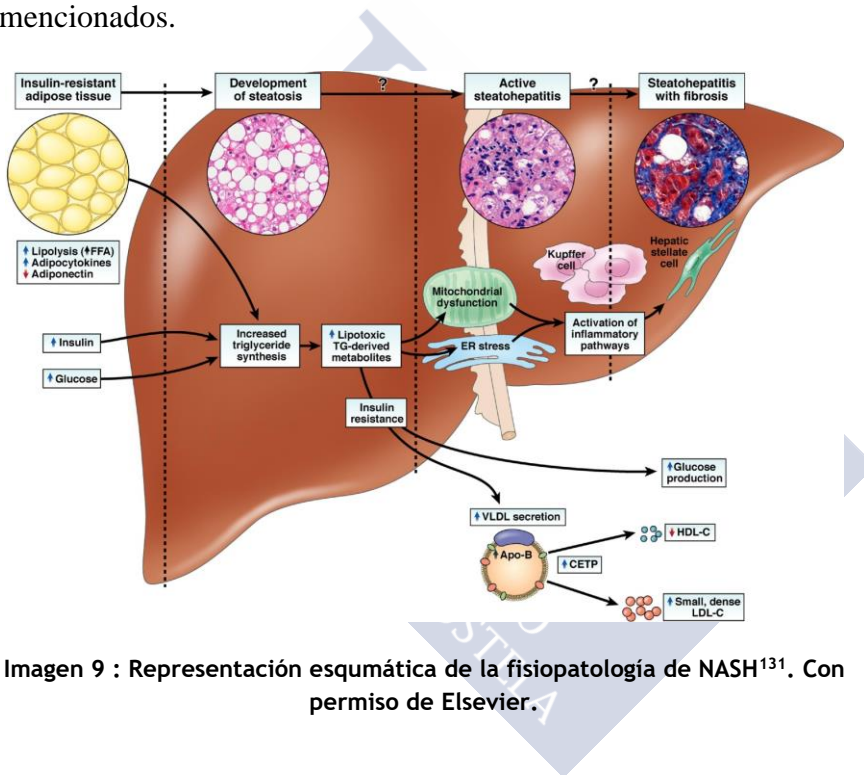


Imagen 9 : Representación esquemática de la fisiopatología de NASH¹³¹. Con permiso de Elsevier.

4 MECANISMOS CELULARES QUE CONDUCEN AL DAÑO HEPÁTICO

4.1 RESISTENCIA A INSULINA

Como ya hemos mencionado, la insulina es lipogénica y antigluconeogénica en el hepatocito. En una situación fisiológica, la insulina favorece la entrada de glucosa y su fosforilación a G6P, promoviendo la formación de glucógeno primero, y a la oxidación por la glucólisis y ruta de las pentosas fosfato después¹²². De esta manera, la glucosa proporciona

acetil-CoA y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) necesarios para la síntesis de novo de ácidos grasos⁸¹.

La resistencia a insulina se considera el factor fisiopatológico más importante en el desarrollo de la NAFLD. Disminuye el transporte de glucosa estimulado por la insulina al interior de los adipocitos y miocitos y empeora su acción en la inhibición de la síntesis hepática de glucosa. Se han propuesto varias rutas metabólicas que juegan un papel importante en el desarrollo de esta patología como la inflamación, la activación del estrés del RE y la acumulación de lípidos extrahepáticos¹²³. En la mayor parte de los casos de resistencia se cree que se deben a defectos en la vía de señalización: mecanismos de regulación negativa o anomalías en la función de los transportadores de glucosa¹²⁴. Estos defectos varían según la función fisiológica de los tejidos y órganos afectados.

4.1.1 Resistencia a insulina periférica base de la esteatosis hepática asociada a obesidad

La resistencia a insulina se define como un desajuste en su capacidad para regular el metabolismo de glucosa y lípidos. Es un efecto temprano y crucial asociado con la obesidad y la diabetes tipo 2^{125,126}, así como a otros desórdenes del metabolismo^{127,128}.

En una situación posprandial, en el tejido adiposo la insulina frena la lipólisis de los TG almacenados inhibiendo la HSL¹²⁹, aumenta la entrada de glucosa y su oxidación glucolítica generando intermediarios metabólicos para la síntesis de TG de novo, activa la LPL del endotelio vascular que rompen los quilomicrones (QM) y las VLDL liberando ácidos grasos que entran por difusión al adipocito¹³⁰.

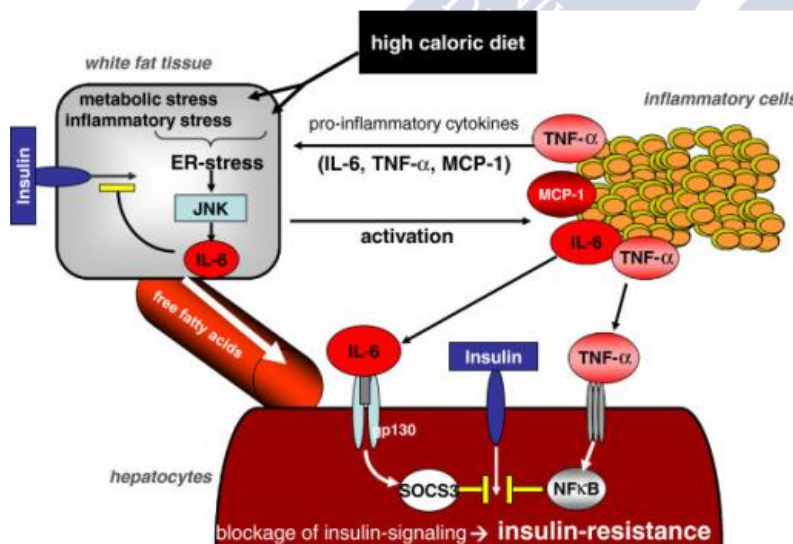


Imagen 10 : El exceso de calorías provoca estrés metabólico e inflamatorio en el WAT⁴. Licencia creative commons.

Cuando existe un exceso de calorías, éstas se almacenan en los adipocitos del WAT. En adultos, la primera adaptación para evitar la lipotoxicidad derivada de la sobrealimentación crónica, es el aumento de tamaño de los adipocitos (hipertrofia) seguido de un mecanismo compensatorio a largo plazo que implica la replicación celular de la grasa (hiperplasia), mecanismo predominante en la obesidad infantil. En esta situación, el adipocito expresa un perfil genético similar al de los macrófagos¹³¹ y produce adipoquinas proinflamatorias como TNF α , interleuquinas, proteína quimioatrayente de monocitos 1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP1) y otros productos derivados de macrófagos (imagen 10). Numerosos estudios señalan que TNF α , IL6 y, en menor medida, la adiponectina, son los responsables del desarrollo de la IR al desajustar la fosforilación del receptor^{132,133}. La reducida

secreción de adiponectina en obesidad, altera el metabolismo de lípidos y la sensibilidad de la insulina en el hígado; la administración de adiponectina en ratones obesos alimentados con dieta alta en grasa alivia la esteatosis y la inflamación¹³⁴. En la esteatohepatitis, la disminución de la secreción de adiponectina por los adipocitos disfuncionales contribuye a la formación de NASH¹³⁵. Por otro lado, TNF α e IL6 actúan a través de rutas metabólicas activadas por las quinasas JNK e IKK β , que conducen a una mayor respuesta inflamatoria y resistencia a insulina^{54,136,137}.

Se ha demostrado que las citoquinas incrementan la lipólisis en el tejido adiposo^{138,139} afectando a la estabilidad de las gotas lipídicas favoreciendo la función de las lipasas¹⁴⁰. Los ácidos grasos bloquean la señal intracelular de la insulina en el propio tejido adiposo y además estimula la secreción de insulina por las células β del páncreas provocando hiperinsulinemia y, si el páncreas se agota, T2DM. La elevada concentración de ácidos grasos circulantes contribuye a la acumulación ectópica en otros tejidos, como el hígado y el músculo^{123,130}.

4.1.2 Resistencia a insulina hepática

En un individuo obeso con resistencia periférica a la insulina es de esperar una elevada concentración de ácidos grasos libres en el hepatocito, al encontrarse inducidas las tres principales fuentes de ácidos grasos: la dieta (15%), NEFFAs circulantes, principalmente del tejido adiposo (59%) y la síntesis de novo hepática (26%) (imagen 11). Además, también se generan NEFFAs en los sinusoides hepáticos por la acción de la lipasa hepática sobre los quilomicrones¹⁴¹.

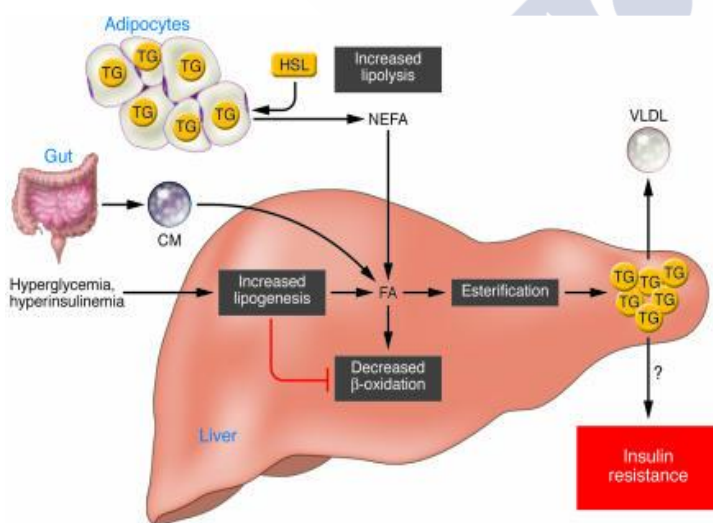


Imagen 11 : Defectos metabólicos que conducen al desarrollo de la esteatosis hepática³. Con permiso de American Society for Clinical Investigation.

Dentro del hepatocito, los ácidos grasos son metabolizados de dos formas: vía oxidación para generar ATP o bien se esterifican para dar lugar a TG, incorporados en las VLDL y exportadas o almacenadas dentro del hepatocito (imagen 11). Por otro lado, los DAGs son metabolitos intermediarios en la conversión a TG; su acumulación hepática en las gotas lipídicas citosólicas se asocia con una mayor translocación de una nueva isoforma de las quinasas tipo C, la PKC ϵ , a la membrana plasmática donde se une e inhibe el dominio quinasa intracelular del receptor de la insulina y la fosforilación de los sustratos de

insulina 1 y 2. En un estudio traslacional reciente, en un grupo de pacientes obesos no diabéticos sometidos a cirugía bariátrica, encontraron una variación significativa en la resistencia a insulina. El contenido de DAG y la activación de PKC ϵ fueron los predictores más potentes de la resistencia a insulina hepática y representaron el 60% de dicha variabilidad¹⁴² (imagen 12).

El exceso de glucosa se convierte en ácidos grasos mediante la conversión de glucosa en piruvato, y de ahí pasan a la mitocondria para entrar en el ciclo de Krebs. El citrato formado es enviado al citosol donde es convertido a acetyl-CoA. La enzima ACC1, lo convierte en malonil-CoA para acabar formando moléculas de TG⁸⁵.

La sobrecarga de lípidos provoca en la célula β pancreática una secreción de insulina desregulada para compensar la incapacidad del hígado para reducir la producción de glucosa. La hiperinsulinemia conduce a una regulación positiva de los factores de transcripción SREBP1c y ChREBP incluso bajo estas condiciones de resistencia a insulina, resultando en un incremento de la síntesis de novo de TG. SREBP1c también activa ACC2, una isoforma de ACC que produce malonil-CoA en la membrana mitocondrial. Este incremento de malonil-CoA disminuye la oxidación de los ácidos grasos⁸¹.

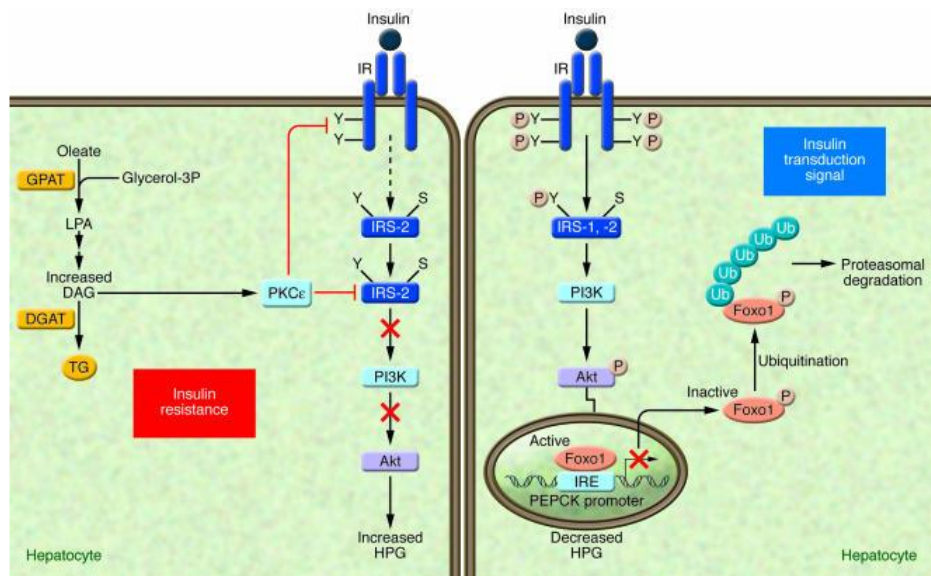


Imagen 12 : Mecanismos por los cuales los metabolitos lipídicos afectan la sensibilidad a la insulina en el hígado³. Con permiso de *American Society for Clinical Investigation*.

Tanto la β -oxidación como el ensamblaje de las VLDL están inhibidos en pacientes con hígado graso no alcohólico¹⁴³. Siendo la insulina una hormona lipogénica, su papel en la regulación de las VLDL es controvertido. Se ha descrito que concentraciones elevadas de insulina promueven la degradación de ApoB y una menor secreción de VLDL en cultivos primarios de hepatocitos de modelos murinos¹⁴⁴. En esta línea, también se ha registrado una menor secreción de VLDL en pacientes con NASH¹⁴⁵. Sin embargo, otros estudios relacionan la hiperinsulinemia y resistencia a insulina con un aumento en la síntesis de ApoB^{130,146}. Sin embargo, más adelante en esta tesis, discutiremos sobre el papel del retículo endoplásmico y sus efectos sobre la secreción de TG.

4.2 MEDIADORES MOLECULARES DE LA LIPOGÉNESIS Y SU PAPEL EN LA ESTEATOSIS

A. Factores de transcripción nucleares:

- FXR (farsenoid X receptor): En el hígado, los agonistas de FXR mejoran la sensibilidad a insulina incrementando la eliminación de TG, debido al aumento de la expresión de la APOCII y el receptor de las VLDL. Aumentan la β -oxidación

mitocondrial. FXR también inhibe directamente la activación de las células estelares hepáticas y la fibrogénesis hepática así como la inflamación de la microbiota intestinal¹⁴⁷.

- LXR: es un factor de transcripción que juega un papel crítico en la homeostasis del colesterol y el metabolismo de los ácidos biliares. Aumentan la lipogénesis hepática ya que regula SREBP1c. Además, el promotor de ChREBP contiene sitios de unión a LXR incrementando así su actividad¹⁴⁸.

- PXR (*pregnane X receptor*): modula la homeostasis lipídica a través de SREBP1c y de carbohidratos, la inflamación y la fibrogénesis. Suprime la gluconeogénesis hepática compitiendo con el factor nuclear HNF4 por su lugar de unión a PGC1 α . PXR también actúa como co-represor de la transcripción de FOXO1, otro regulador positivo de la gluconeogénesis que está sobreexpresada en NASH. Además de sus efectos en la regulación metabólica, PXR tiene potentes actividades antiinflamatorias y antifibróticas tanto in vivo como in vitro. Es capaz de suprimir la apoptosis vía factor nuclear $\kappa\beta$ (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF $\kappa\beta$) y mejora la autofagia en los hepatocitos^{147,149}.

- PPARs receptores del peroxisoma-proliferador activado (*peroxisome proliferator-activated receptors*): Pertenecen a una superfamilia de receptores nucleares; se pueden clasificar en tres subtipos: PPAR α , PPAR δ (también llamado PPAR β) y PPAR γ ¹⁴⁷.

- PPAR γ . Normalmente su expresión es baja en hígado, pero en modelos de resistencia a insulina e hígado graso, su expresión es elevada. La delección parcial de PPAR γ en modelos de ratones resistentes a insulina (ob/ob) pudo atenuar el desarrollo de la esteatosis, independientemente de la presencia de hiperinsulinemia o hiperglicemia¹⁵⁰. PPAR γ promueve la diferenciación de los adipocitos, la secreción de adiponectina y mejora la sensibilidad a insulina. Las tiazolidinedionas (TZDs), utilizadas en el tratamiento para la diabetes, son agonistas de PPAR γ que revierten NASH y una ligera fibrosis en pacientes con NASH, pero poseen efectos secundarios no deseados; por eso se trabaja en compuestos en los que se combinan PPAR α y PPAR γ ¹⁴⁹.

- PPAR α : se expresa en el hígado y otros órganos metabólicamente activos como el músculo estriado, el riñón y el páncreas. Regula de forma positiva numerosos enzimas involucrados en la β -oxidación, transportadores de ácidos grasos a través de la membrana y la cetogénesis. La activación de PPAR α mejora la eliminación de TG mediante la regulación positiva de LPL. Otra diana de PPAR α es la catalasa, que mejora la detoxificación del peróxido de hidrógeno y protege al hepatocito frente al estrés oxidativo, que es crucial para el desarrollo del daño hepático en NASH. PPAR α aumenta la transcripción de FGF21. Por último, PPAR α tiene propiedades antiinflamatorias e inhibe la secreción de citoquinas como IL1, IL6 y TNF α liberadas debido al incremento LPS (lipopolisacárido).

- PPAR δ : su expresión es ubicua y se ha implicado en el metabolismo lipídico y la homeostasis energética en varios órganos, incluyendo el hígado. En las células no parenquimales, tiene propiedades anti-inflamatorias, ya que polariza a los macrófagos de un tipo de respuesta pro-inflamatorio M1 a un fenotipo M2 anti-inflamatorio¹⁴⁹.

B. AMPK

Es un sensor celular de estado energético de la célula y un regulador clave del metabolismo celular. Se activa durante la restricción calórica o demandas de energía elevadas, cuando se agotan las reservas de ATP. La activación de AMPK estimula la producción de ATP mediante la activación de rutas catabólicas, como la β -oxidación y la inhibición de procesos que consumen ATP, como la lipogénesis. La metformina, tratamiento para la diabetes, activa

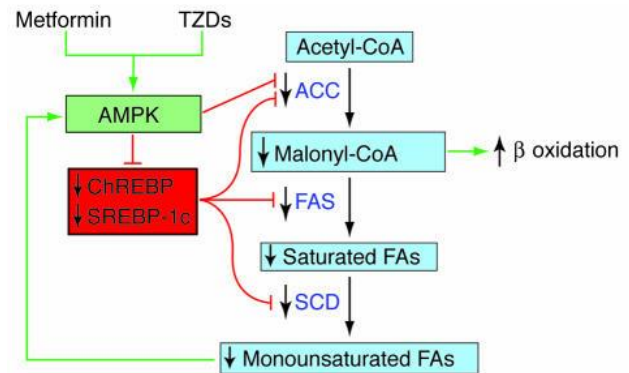


Imagen 13 : Consecuencias hepáticas de la activación de AMPK⁸⁵. Con permiso de *American Society for Clinical Investigation*.

la actividad hepática de AMPK. Las TZDs se conocen principalmente porque actúan activando PPAR γ , sin embargo, se ha visto que también activan AMPK⁸⁵ (imagen 13).

En modelos preclínicos de NASH, los activadores de AMPK mejoran la resistencia a insulina suprimiendo la gluconeogénesis. También mejora NASH inducido debido a la ingesta de una dieta alta en grasa a través de la regulación negativa de factores clave en la síntesis de colesterol y ácidos grasos, como SREBP y ACC. En los hepatocitos, la activación de AMPK puede también mejorar la biogénesis y actividad mitocondrial mediante la inhibición de mTORC1, previniendo así la acumulación hepática de lípidos debido al exceso de nutrientes. Además de sus efectos metabólicos, la activación de AMPK también tiene un efecto directo antiinflamatorio ya que induce la transición funcional de macrófagos que liberan citoquinas proinflamatorias, fenotipo M1 a fenotipo M2 o antiinflamatorias^{147,149}.

C. mTOR

Es también un regulador del metabolismo y crecimiento celular que responde a estímulos nutricionales y hormonales; la desregulación de mTOR está implicada en muchas enfermedades como la diabetes, la obesidad y NASH.

mTOR se asocia con varias proteínas para formar dos complejos de señalización con diferentes reguladores y sustratos diana: mTORC1 y mTORC2. mTORC1 se activa por aminoácidos y factores de crecimiento como la insulina e IGFs. Promueve el anabolismo celular mediante la síntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos. Regula positivamente la lipogénesis a través de la inhibición de AKT y directamente a través de la activación transcripcional de SREBP1c. Además del metabolismo de ácidos grasos, mTORC1 activa la síntesis de colesterol y su captación mediante el control de SREBP2. Bloquea rutas catabólicas y procesos como la autofagia a nivel transcripcional y post-transcripcional regulando negativamente PPAR α y la cetogénesis. En modelos animales, la inhibición de mTORC1 mejora NASH inducido por dieta alta en grasa¹⁴⁷.

4.3 LIPOTOXICIDAD

La progresión de la esteatosis a NASH podría determinarse no por la cantidad de TG en el hígado, sino más bien por la acumulación de intermediarios lipotóxicos procedentes de la síntesis de TG y/o la lipólisis. Los mediadores lipotóxicos clave en el daño hepático podrían también ser objeto de intervenciones farmacológicas. SREBP2 es el mediador de la acumulación del colesterol libre. Existen estudios del papel de la acumulación del colesterol libre y la patogénesis del NASH¹⁵¹. El mecanismo por el cual se interrumpe la regulación negativa de SREBP2 y los depósitos de colesterol en la patogénesis del NASH involucran a mTORC1 que media la transcripción del gen que codifica para SREBP2, SREBF2¹⁴⁷.

La ceramida es un esfingolípido que consiste en un ácido graso saturado o monoinsaturado de longitud variable unido a un grupo amino y una base esfingosina. Existen evidencias clínicas y de laboratorio que indican que la acumulación intracelular de ceramidas favorece la patogénesis de NASH a través de una gran variedad de mecanismos que incluyen, la disfunción de la homeostasis del calcio, lo cual conduce a estrés del retículo endoplasmático y, en última instancia, a la activación de la apoptosis mediada por dicho estrés. La acumulación de ceramidas puede provocar resistencia a insulina mediante la inhibición de Akt. También participa en la activación del inflamósoma y empeora la autofagia¹⁴⁷.

La enzima DGAT2 (*diacylglycerol O-acyltransferase*) cataliza el último paso en la síntesis de TG, la esterificación del DAG mediante ésteres de acil-CoA de cadena larga. Existen dos isoformas de la DGAT, DGAT1 y DGAT2. La DGAT2 se expresa principalmente en hígado y tejido adiposo. Su inhibición reduce la expresión de SREBP1c y mejora la expresión de genes relacionados con la oxidación de los ácidos grasos y rutas termogénicas. La sobreexpresión de DGAT2 está relacionada con una marcada esteatosis hepática, adiposidad y resistencia a insulina. La acumulación de DAG puede desencadenar inflamación a través de NFκβ mediada por la acción de la PKC (PKCε) además de fibrosis hepática mediada por las células estelares¹⁴⁷.

4.4 ESTRÉS OXIDATIVO

En un contexto de gran abundancia de ácidos grasos, la mitocondria está sobrepasada y los peroxisomas y la membrana del retículo endoplasmático comienzan a ser sitios de oxidación¹⁵². Se han observado defectos estructurales en las mitocondrias de pacientes con NAFLD, lo que puede ser indicativo de fallo en la fosforilación oxidativa. La disfunción de la respiración mitocondrial puede conducir directamente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). La oxidación en el retículo endoplasmático está controlada por el sistema de citocromos p450, concretamente por CYP2E1 y los miembros de la familia CYP4A. CYP2E1 parece ser la principal fuente de H₂O₂ y de peroxidación lipídica (imagen 12). Además, presenta mayor actividad en individuos obesos, diabéticos o hiperlipidémicos¹³⁰.

El efecto acumulativo de la oxidación de ácidos grasos extramitocondrial incrementa el estrés oxidativo. Algunas consecuencias de la formación de estas especies es el agotamiento del ATP, daño en el ácido desoxiribonucleico (ADN) (afectando a la biogénesis mitocondrial), alteraciones en la estabilidad de las proteínas, destrucción de membranas vía peroxidación lipídica y liberación de citoquinas inflamatorias⁸⁵.

La peroxidación lipídica hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos de las membranas celulares. Las especies reactivas de oxígeno son moléculas de vida media corta y con efectos locales. Cuando atacan a ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), resulta en la formación de productos aldehído, como el HNE (*4-hydroxynoneal*) y el MDA (*malondialdehyde*), que poseen una vida media más larga y tiene capacidad de difundir, amplificando los efectos del estrés oxidativo¹⁵³ (imagen 12). Los aldehídos formados a través de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) empeoran la homeostasis celular: la síntesis de nucleótidos y proteínas, agotan el glutatión (antioxidante natural), aumentan la producción de citoquinas proinflamatorias como el $\text{TNF}\alpha$, promueven la infiltración de células inflamatorias en el hígado y activan las células estelares que promueven la deposición de colágeno, la fibrosis y la perpetuación de la respuesta inflamatoria¹⁵³. Además, la oxidación de los PUFA aumenta la proteólisis en el retículo endoplasmático de ApoB, atenuando así la secreción de VLDL en roedores¹⁵⁴.

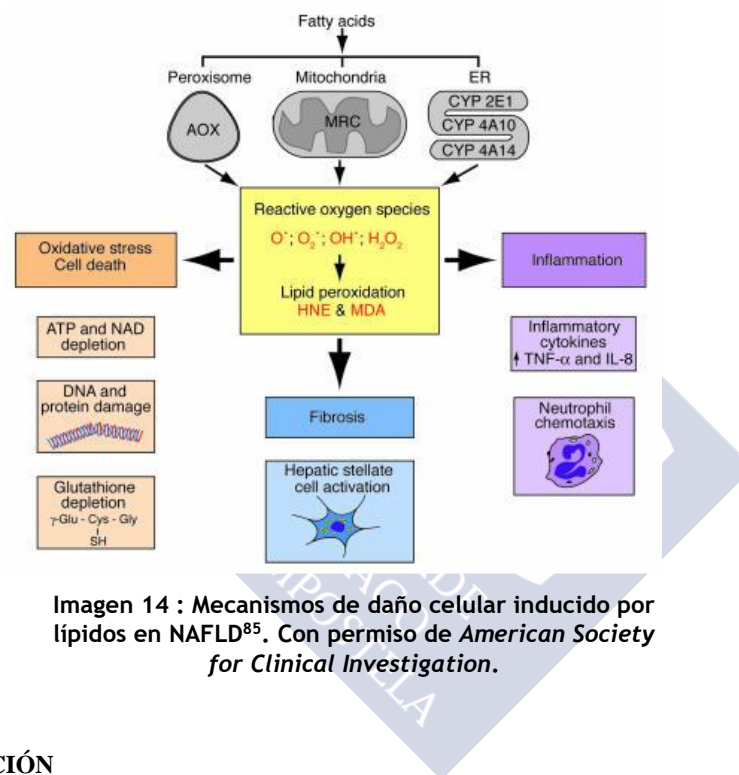


Imagen 14 : Mecanismos de daño celular inducido por lípidos en NAFLD⁸⁵. Con permiso de *American Society for Clinical Investigation*.

4.5 INFLAMACIÓN

Existen numerosas evidencias de la relación entre la obesidad y la inflamación. La obesidad se asocia con un grado de inflamación bajo y crónico en el tejido adiposo blanco a través de la activación del sistema inmune innato. Además, la inflamación asociada a la obesidad va unida a la resistencia a insulina en tejidos periféricos¹⁵⁵.

En el hígado, las células de Kupffer se activan en individuos obesos y segregan citoquinas que promueven la acumulación de macrófagos proinflamatorios, contribuyendo a la esteatosis hepática. Dichas citoquinas proinflamatorias activan quinasas con actividad serina/treonina como JNK e IKK¹⁵⁶.

4.5.1 Principales vías de señalización inflamatorias

A. Factor nuclear $\kappa\beta$ -I κ B quinasa

TNF α estimula la ruta de señalización del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$)-I κ B quinasa (IKK) para estimular la liberación de señales proinflamatorias a través del control transcripcional. En el citoplasma, NF- $\kappa\beta$, está secuestrado por el inhibidor I κ B para evitar su translocación al núcleo. La activación de IKK conduce a la fosforilación de I κ B y a la liberación de NF- $\kappa\beta$, que ya puede llegar al núcleo y unirse a promotores de genes proinflamatorios para iniciar su transcripción. Las subunidades catalíticas son IKK α e IKK β que, junto con la subunidad reguladora NEMO, forman el complejo IKK^{157,158}.

B. Quinasa c-Jun N-terminal (JNK)

La ruta de señalización c-Jun N-terminal quinasa (JNK) proteína activadora 1 (AP-1), promueve la liberación de señales proinflamatorias. La activación y fosforilación de JNK conlleva la fosforilación del extremo N-terminal en los homodímeros c-Jun para formar heterodímeros c-Jun-c-Fos que se unen a los promotores de genes proinflamatorios. La actividad de JNK aumenta en los tejidos sensibles a insulina (hígado, músculo y tejido adiposo) tanto en ratones alimentados con una dieta alta en grasa como en ratones deficientes en leptina (*ob/ob*)¹⁵⁹. La señalización de JNK también puede ser activada por el estrés del retículo endoplasmático e inhibe directamente la señalización de la insulina a través de la fosforilación serina/treonina de su receptor, evitando así, la fosforilación de los sustratos IRS¹⁶⁰.

C. El inflamosoma

Es un complejo proteico que comprende proteínas “andamio” (*scaffold*), proteínas adaptadoras y caspasas que participan en la maduración y secreción de citoquinas inflamatorias como IL1 β e IL18¹⁶¹. Este tipo de inflamación tiene gran relevancia en algunas patologías como el NASH, ya que acentúan el daño inicial y lo agravan. El inflamosoma requiere dos señales para producir la inflamación. La primera señal de activación se debe a las citoquinas inflamatorias; éstas, activan la vía de señalización NF- $\kappa\beta$. NLRP3 (*NLR Family Pyrin Domain Containing 3*) es el inflamosoma más estudiado; forma un complejo con la pro-caspasa 1 la cual se activa y provoca el corte y activación de las procaspasas IL1 β e IL18. La segunda señal de activación es proporcionada por moléculas exógenas, por ejemplo, producidas por agentes patógenos. Estos factores también incluyen al palmitato y las ceramidas, presentes en concentraciones elevadas en individuos obesos^{156,162}.

D. Activación de macrófagos en el hígado en el desarrollo de la lipotoxicidad hepática

Existen dos tipos de macrófagos; los denominados macrófagos M1 o macrófagos activados clásicamente, juegan un papel fundamental en la inmunidad humoral y respuesta común a patógenos. Secretan grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias como TNF α e IL12. Macrófagos tipo M2, con respuesta antiinflamatoria. En animales alimentados con dieta alta en grasa y en individuos obesos, lo que ocurre es un incremento del número de macrófagos tipo M1 en relación a los M2. La activación de macrófagos en el tejido adiposo precede a la activación de las células de Kupffer. La infiltración en el hígado de macrófagos tipo M1 y el desarrollo por tanto de esteatohepatitis ocurre semanas después de la disfunción del tejido adiposo. El desequilibrio M1/M2 en favor de M1 y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias

por las células Kupffer es un paso crítico para el desarrollo de NASH y posibles dianas para su tratamiento^{82,131}.

Los ácidos grasos pueden activar la ruta de señalización NF- κ B directamente o vía ER estrés y desregulación mitocondrial, induciendo la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias como IL6, TNF α y su receptor. En pacientes con NASH, se han encontrado niveles circulantes elevados de TNF α y su receptor (*tumor necrosis factor receptor 2*, TNFR2). Curiosamente, en pacientes con NAFLD, los niveles séricos tanto de TNF α como de su receptor no se encuentran elevados en comparación con individuos sanos. Sin embargo, sí se han encontrado diferencias en cuanto a su expresión hepática. Por lo tanto, los niveles séricos elevados de TNF α se relacionan con un grado de fibrosis hepática. IL6 se encuentra elevado tanto en suero como en hígado de pacientes con NASH comparado con individuos normales pacientes^{131,163,164}.

E. Antagonistas de quemoquinas

Son pequeñas proteínas secretadas que regulan la inflamación, la migración de leucocitos, la fibrosis y remodelado tisular y la angiogénesis. La familia de las quemoquinas incluye a 45 ligandos diferentes y 22 receptores que se diferencia por el tipo celular donde se expresan: leucocitos, hepatocitos, células estelares y adipocitos. Las células de Kupffer son la mayor fuente de quemoquinas mediadoras en el daño hepático y NASH. Se encontraron niveles elevados de CCL2 (*chemokine ligand 2*) en pacientes con NASH en comparación con pacientes con simple esteatosis. Este resultado indica que esta quemoquina podría ser un buen indicador de la transición de esteatosis a NASH^{165 155}.

4.6 MUERTE CELULAR Y NECROSIS

La apoptosis y necrosis en los hepatocitos juega un papel crítico en la lesión hepática y el desarrollo de NASH¹¹⁰. La muerte de los hepatocitos ocurre en forma de apoptosis (muerte celular programada) o accidental (necrótica). La apoptosis se define morfológicamente en base al redondeo celular, la concentración citoplasmática, la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear. Para la adquisición de esta morfología se requiere la activación de las caspasas (proteasas que rompen a otras proteínas en sus residuos aspartato). La necrosis conduce a la inflamación celular, pérdida del núcleo y ruptura de la membrana celular; comúnmente se asocia con una reacción celular inflamatoria¹⁶⁶. Tanto la apoptosis como la necrosis pueden ocurrir como consecuencia del mismo evento desencadenante⁹¹.

La apoptosis es una muerte celular altamente regulada y una característica morfológica y patogénica de NASH. Se ejecuta mediante dos vías diferentes: la vía extrínseca mediada por receptores de muerte celular en las membranas y la vía intrínseca activada por mecanismos de estrés celular y de membrana, estrés de retículo endoplasmático y mitocondrial⁹¹.

Los receptores de muerte celular que pueden iniciar la vía extrínseca incluyen Fas, TNFR1 y receptores tipo TRAIL (receptores de ligando inductores de apoptosis relacionados con el factor de necrosis tumoral).

Los ácidos grasos provocan la regulación positiva de receptores tipo Fas y TRAIL-R5; se ha encontrado que la expresión de estos receptores es más alta en pacientes con NASH que con

una simple esteatosis¹⁶⁷. Tras la activación de vía TNF α y JNK a través del receptor TNFR1, se forma un complejo que resulta en la activación de la caspasa 8 y muerte celular. Se ha encontrado que la expresión de TNF α y su receptor R1, se encuentra elevado en pacientes con NASH y también con fibrosis^{166,168}.

La vía de apoptosis intrínseca se caracteriza por la liberación de citocromo C u otros factores activadores de caspasas desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citoplasma. En el citoplasma, se forma un complejo llamado apoptosoma que activa la caspasa 9. Alteraciones de la homeostasis del calcio, sobrecarga de proteínas o su mal plegamiento inducirá estrés del RE que, como explicaremos más adelante, puede desencadenar apoptosis. El exceso de ROS provocado por el estrés oxidativo puede causar daños en el ADN mitocondrial, proteínas y fosfolípidos e inducir apoptosis en los hepatocitos¹⁶⁹.

4.7 ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

El lumen del RE proporciona un ambiente especializado para la maduración de las proteínas ya que es el lugar donde se encuentran las chaperonas para facilitar su adecuado plegamiento. Por otro lado, enzimas clave en la síntesis de colesterol, fosfolípidos y TG, y los componentes lipídicos de las lipoproteínas se encuentran integradas en las membranas del RE de los hepatocitos. Por todo esto, el RE se somete a un flujo continuo de vesículas que transportan proteínas secretadas o proteínas de membrana hacia su destino final.

El RE también juega un papel importante en la detoxificación ya que las enzimas del complejo citocromo P450 están asociadas a su membrana. Cuando la célula está expuesta a compuestos tóxicos, el RE liso de los hepatocitos puede aumentar su superficie para la eliminación de dichos compuestos. Finalmente, el RE es un orgánulo clave para la homeostasis del calcio celular. Dentro del RE, los niveles elevados de calcio son esenciales ya que la actividad de muchas chaperonas son dependientes de él para su funcionamiento¹⁷⁰.

Las alteraciones que se producen en el RE son provocadas por infinidad de estímulos tanto farmacológicos como fisiológicos o simplemente debidas a una elevada demanda de proteínas. Todas esas perturbaciones se conocen como estrés del retículo endoplasmático (*endoplasmic reticulum stress, ER stress*). Para combatir el estrés, la célula dispone de un sistema de transducción de señales que comunica al lumen del RE con el citoplasma y el núcleo en lo que se conoce como respuesta a proteínas desplegadas (*unfolded protein response, UPR*). El sistema UPR consta de tres rutas de señalización: la enzima dependiente de inositol, IRE1 α (*Inositol requiring enzyme 1 alpha*), la quinasa del factor de transcripción pancreático del retículo endoplasmático iniciador de la traducción eucariota, PERK (*PKR-like ER kinase*) y el factor de transcripción activante 6, ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*) (imagen 15).

En las células no estresadas, los tres sensores se mantienen en un estado inactivo a través de su asociación con la proteína regulada por glucosa GRP78 (*glucose-regulated protein 78/immunoglobulin-heavy-chain-binding protein*). El RE es muy sensible a las alteraciones en la homeostasis celular como la deprivación de nutrientes o glucosa, infecciones viales, acumulación de lípidos, incremento de proteínas mal plegadas¹⁷¹, etc. Tras producirse el estrés, GRP78 se libera y secuestra a las proteínas mal plegadas, lo que permite la activación de la UPR. Esta activación inicia una cascada de respuestas que incluyen la atenuación de la traducción de proteínas y la regulación positiva de proteínas de empaquetamiento y degradación

a través de los componentes de degradación asociados al RE (*ER-associated degradation*, ERAD) y así restablecer la homeostasis del RE¹⁷².

IRE1 α , cuando se disocia de la chaperona GRP78, también conocida como BiP, dimeriza y se autofosforila, activándose su actividad endorribonucleasa. Gracias a esta actividad provoca la escisión del ARNm del factor de transcripción Xbp1 (*X-box binding protein 1*) (imagen 15). La actividad RNasa de IRE1 implica la degradación de otros ARNm como el de la insulina y el del propio Ire1. Además, la expresión del ARNm de Xbp1 aumenta a través de la acción de ATF6, proporcionando un sustrato adicional a IRE1.

PERK, es una de las cuatro quinasas que pueden fosforilar a eIF2 α . La fosforilación de eIF2 α (*α -subunit of the translation initiation factor eIF2*) por parte de PERK es fundamental para la supervivencia celular ya que limita la cantidad de proteínas mal plegadas y el consiguiente aumento de estrés oxidativo por su acumulación. Uno de los genes clave que se activa, es el factor de transcripción 4 (ATF4), el cual induce genes responsables de la respuesta antioxidante, el metabolismo de los aminoácidos y de la apoptosis, como la proteína homóloga de C/EBP (CHOP). CHOP fue identificado como un regulador negativo de otros miembros de la familia C/EBP. ATF4 induce la expresión de la síntesis de aminoácidos y genes de respuesta antioxidante. CHOP activa la expresión de GADD34 (*growth arrest and DNA damage 34*), que se asocia con la fosfatasa 1 (PP1) para desfosforilar eIF2 α (imagen 15) en un bucle de retroalimentación negativa, reanudando así la traducción.

ATF6, tras la disociación de BiP, ATF6 α se traslada al Golgi donde unas proteasas cortan su extremo C-terminal. El fragmento de 50 KDa generado, se trasloca al núcleo para activar la transcripción uniéndose a elementos de respuesta ATF/cAMP (CRE) y a elementos de respuesta al ER estrés (ERSE) (imagen 15). ATF6 α puede activar elementos de ERAD mediante dimerización con la forma escindida de XBP1 (XBP1s). Los ratones deficientes en Atf6 α con ER estrés en el hígado desarrollan hepatoesteatosis y mueren^{172,173}.

4.7.1 UPR y desarrollo de la esteatosis hepática, NAFLD

Los hepatocitos realizan innumerables funciones metabólicas como la síntesis de proteínas, la secreción de proteínas plasmáticas (albúmina, globulinas, fibrinógeno...), ensamblaje y secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), biosíntesis de colesterol y metabolismo de xenobióticos; por lo tanto, poseen una gran extensión de retículo endoplasmático liso y rugoso. De acuerdo con esta función secretora, el hígado puede activar fisiológicamente la UPR. Por ejemplo, el ritmo de activación basal de IRE1 α está relacionado con la regulación circadiana de la homeostasis lipídica¹⁷⁴.

Los sensores de estrés del RE desempeñan un papel importante en el metabolismo de los lípidos hepáticos, en el desarrollo de la esteatosis y la resistencia a insulina hepática. Esto es debido a que en enfermedades crónicas como la obesidad y NAFLD, la habilidad para resolver el estrés del RE está comprometida. El vínculo entre el estrés del RE y la esteatosis se ha demostrado en modelos de ratones con la transducción de la señal PERK/eIF2 α , IRE1 α /XBP1 y ATF6 modificada genéticamente, en modelos de ratones con obesidad inducida por dieta, en ratones alimentados con dieta deficiente en colina (MCD) que muestran esteatosis sin obesidad

y en modelos genéticos como los ratones *ob/ob*. Más tarde, la activación de varios componentes de la UPR se confirmó en pacientes con NAFLD y NASH¹⁷⁵.

En los ratones *ob/ob*, la esteatosis provoca estrés del RE, lo cual conduce a la escisión proteolítica de los factores de transcripción SREBP1c y SREBP2, que controlan la lipogénesis y el metabolismo del colesterol respectivamente. La sobreexpresión hepática de adenovirus BiP en estos ratones, disminuye la activación de los SREBP, los niveles de TG hepáticos, colesterol y mejora la sensibilidad a insulina¹⁷⁶.

La vía PERK-eiF2 α -ATF4 regula la lipogénesis y la esteatosis hepática. Se ha encontrado que la señalización PERK dependiente contribuye a la diferenciación lipogénica en el epitelio mamario, y la eliminación de PERK inhibe la expresión de enzimas lipogénicas como FAS, ATP-citrato liasa, SCD1. Oyadomari et al. ha demostrado que a través de la inhibición de GADD34, que desfosforila eiF2 α , da como resultado una disminución de la hepatoesteatosis en animales alimentados con una dieta alta en grasas¹⁷⁷. La disminución de la fosforilación de eiF2 α se correlaciona con una expresión disminuida del factor de transcripción PPAR γ y de sus reguladores *upstream*, C/EBP α (*CCAAT/enhancer-binding protein α*) y C/EBP β (*CCAAT/enhancer-binding protein β*). Los ratones KO para ATF4, están protegidos contra la obesidad inducida por dieta, la hipertrigliceridemia y la esteatosis ya que la falta de ATF4 reduce la expresión de PPAR γ , SREBP1c, ACC y FAS. El mantenimiento prolongado estrés de RE se traduce en una elevada acción de CHOP lo que da lugar a la inhibición del factor de transcripción C/EBP α , activador de importantes reguladores del metabolismo lipídico; reduciéndose la oxidación lipídica, secreción de lipoproteínas y lipogénesis, participando por tanto en la generación de la esteatosis¹⁷⁸.

Por otro lado, la vía IRE1 α -XBP1 es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis lipídica hepática en condiciones de estrés del retículo endoplasmático (imagen 15). Los ratones con una delección específica en los hepatocitos de IRE1 α , desarrollan esteatosis severa después de un tratamiento inductor de estrés del RE. El desarrollo de la esteatosis se debe a la disminución de la expresión de los reguladores metabólicos C/EBP α , C/EBP β y PPAR γ . IRE1 α se requiere para la secreción eficiente de apolipoproteínas tras la interrupción de la homeostasis del RE. Esta vía, desempeña un papel esencial en la regulación del ensamblaje y secreción de VLDL hepática, que se debe, al menos en parte, a la disminución de la actividad de la proteína MTT. En los hepatocitos, XBP1 regula la lipogénesis hepática mediante la unión directa a los promotores de genes lipogénicos como SCD1, DGAT2 y ACC2, activando su expresión. Por lo tanto, la síntesis de lípidos de novo se reduce en los hígados de ratones con una delección en XBP1. La delección condicional hepática de XBP1 reduce la lipogénesis de novo, los TG en suero así como colesterol y NEFFAs¹⁷⁹. Poco se conoce acerca del mecanismo de acción de XBP1; estudios recientes muestran que la vía de señalización de la insulina aumenta la eficacia de la translocación al núcleo de XBP1 debido a su unión a la subunidad p85 de PI3K a XBP1¹⁸⁰.

El estrés del RE hepático también afecta a la producción de las VLDL mediante la degradación de apoB100¹⁸¹ (imagen 15). Como hemos mencionado anteriormente, la regulación de la secreción de lipoproteínas desde el hígado es controvertida y hemos visto que la exposición prolongada a ácidos grasos afecta al estrés del RE. Un estudio ha propuesto que un estrés de RE moderado está en un principio asociado con un incremento en ApoB (puesto que la activación de la formación de ApoB por la elevada presencia de ácidos grasos es mayor que la inhibición mediada por el estrés del RE); mientras que un estrés de RE severo da lugar a

una reducción de la activación inducida por ácidos grasos por lo que se inhibe la secreción de las VLDL. Sin embargo, debido al estrés de RE y a la UPR, la secreción de TG no es proporcional al continuo acumulo de ácidos grasos. Debido a ello, el aumento de la UPR terminará por reducir la secreción de VLDL, y activando rutas inflamatorias, aumentando la lipotoxicidad y sustituyendo la esteatosis hepática por esteato-hepatitis ¹⁸².

Por último, la vía ATF6 también juega un papel importante en la acumulación de lípidos inducida por estrés (imagen 15). Un estudio detallado sobre la relación entre la actividad de ATF6 y la lipogénesis, ha revelado que ATF6 nuclear interactúa con la forma nuclear de SREBP2 inhibiendo su acción lipogénica en cultivos celulares ¹⁷⁵. El ratón deficiente para ATF6 desarrolla esteatosis cuando se somete a condiciones de estrés ¹⁸³.

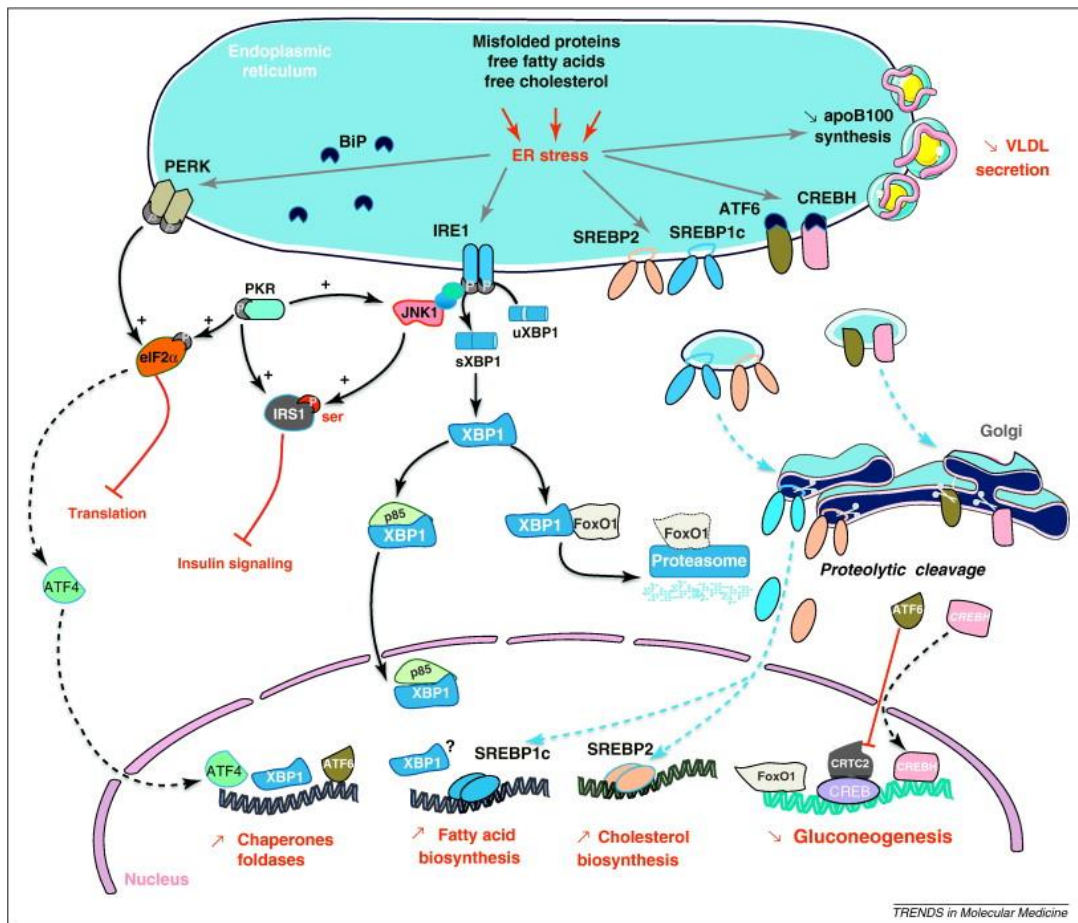


Imagen 15 :Papel del estrés del RE en el control del metabolismo hepático¹⁸³. Con permiso de Elsevier.

4.7.2 LA UPR y la progresión de NAFLD a NASH

La inflamación y la apoptosis son características clave para el desarrollo de NASH, y ambas están unidas a la UPR. La integración del estrés del RE, el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria son críticas en la patogénesis de la enfermedad hepática por ello es esencial conocer su integración¹⁸⁴ (imagen 16).

Apoptosis. El estrés de RE crónico conduce a la apoptosis en los hepatocitos. Cuando IRE1 α se activa, puede interactuar con el receptor TNFR2 y activar quinasas de estrés como p38 y JNK y activar la vía NF κ B. Por lo tanto, esta vía de señalización no solo regula la adaptación del RE al estrés a través de la escisión de *Xbp1* sino también debido a la activación de rutas de señalización involucradas en inflamación, resistencia a insulina y apoptosis^{172,173}. En células estresadas, la expresión de XBP1s disminuye con el tiempo lo cual está relacionado con la muerte celular¹⁷² (imagen 16). El papel de CHOP es paradójico; se encuentra entre las proteínas proapoptóticas mejor reguladas de UPR provocando la activación de Bax. Sin embargo, un estudio demostró que la delección de CHOP podría reducir la apoptosis inducida por palmitato en líneas celulares de hepatocitos, mientras que el daño provocado por la dieta MCD no se redujo en ratones KO para CHOP¹⁸⁵. La acumulación de ácidos grasos saturados puede provocar estrés de RE y apoptosis provocando un incremento de los genes CHOP, GADD34 y GRP78¹⁸⁶. Por último, destacar que perturbaciones en la homeostasis del calcio en el RE, conduce a la apoptosis.

Disfunción mitocondrial. La sobrecarga de lípidos influye en la composición de la membrana celular. En ratones obesos, incrementa la ratio fosfatidilcolina a fosfatidiletanolamina¹⁸⁷; esto altera la fluidez de la membrana y por tanto a la homeostasis del calcio. La disminución de calcio en el RE es la principal causa del estrés del RE debido a la dependencia por este elemento de las chaperonas¹⁷⁰. CHOP activa a GADD34 que desfosforila a eIF2 α por lo que las proteínas pueden continuar sintetizándose y entrando prematuramente en el RE para plegarse. La entrada de proteínas en el RE bajo condiciones de estrés, puede generar ROS; es lo que se conoce como plegamiento oxidativo de las proteínas (*oxidative protein folding*). La vía PERK de la UPR puede activar un programa antioxidante para limitar la producción de las especies reactivas en respuesta al estrés del RE a través de la fosforilación del factor Nrf2. Nrf2 fosforilado se trasloca al núcleo y activa la transcripción de enzimas antioxidantes.

Inflamación. En muchos estudios previos se ha demostrado el vínculo entre el estrés del RE y las vías de inflamación mediante la activación de la quinasa JNK y el factor nuclear κ B^{188,189}, así como la producción de ROS y óxido nítrico^{190,191}. Estas son también las vías y mecanismos que juegan un papel importante en la inflamación inducida por obesidad y en los trastornos metabólicos como la resistencia a insulina¹⁹² (imagen 16). Por ejemplo, durante el estrés del RE, IRE1 α puede activar una vía de señalización inflamatoria a través de la activación de JNK. La activación de JNK puede conducir al daño hepático y apoptosis en los hepatocitos. La delección total de JNK1, pero no de JNK2, reduce la acumulación de TG hepáticos, la inflamación, daño hepático y apoptosis en ratones alimentados con dieta MCD¹⁹³. Sin embargo, la delección específica de JNK1 en los hepatocitos produce un fenotipo que incluye intolerancia a la glucosa, resistencia a insulina y esteatosis hepática¹⁹⁴; esto sugiere que las isoformas de JNK podrían tener acciones tejido-específicas.

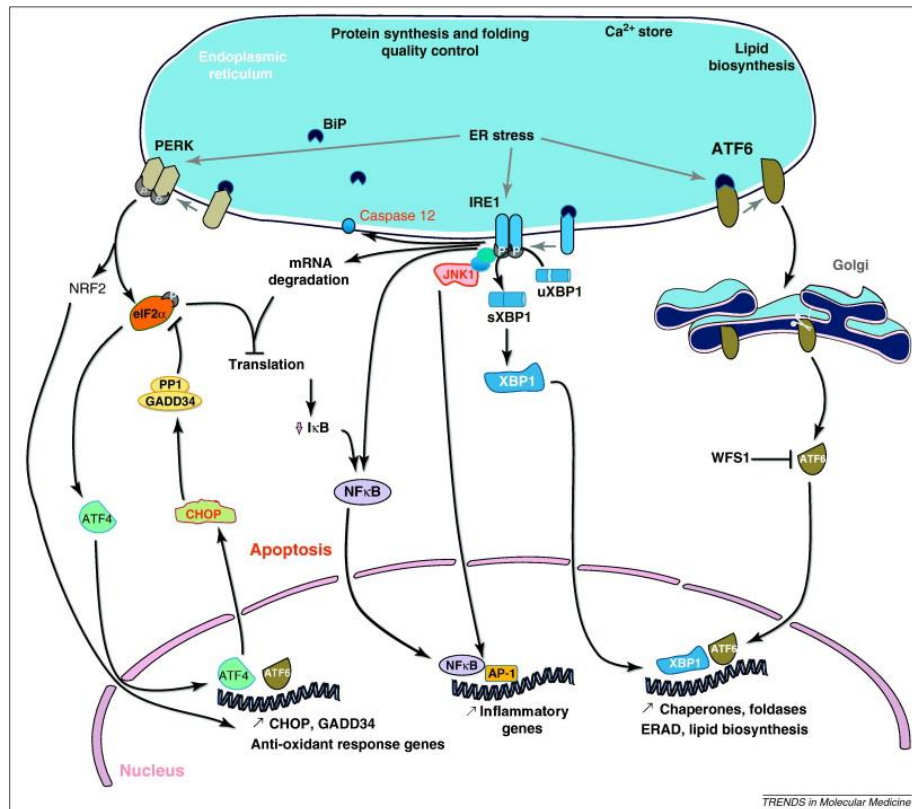


Imagen 16 :Transducción de señales de estrés de RE¹⁸³. Con permiso de Elsevier.

5 p53 Y SU PAPEL EN EL METABOLISMO

El factor de transcripción p53 es conocido por su papel como supresor tumoral¹⁹⁵. Se descubrió hace más de cuatro décadas como un oncogén altamente expresado en cáncer convirtiéndose en el supresor tumoral más importante y conocido como “el guardián del genoma”. Los ratones que carecen de p53 son propensos al desarrollo de tumores¹⁹⁶. En la mayoría de los tumores estudiados en pacientes, la función de p53 se pierde¹⁹⁷, mientras que aquellos que heredan un alelo mutado del gen tp53 tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer, condición conocida como síndrome de *Li-Fraumeni*¹⁹⁸.

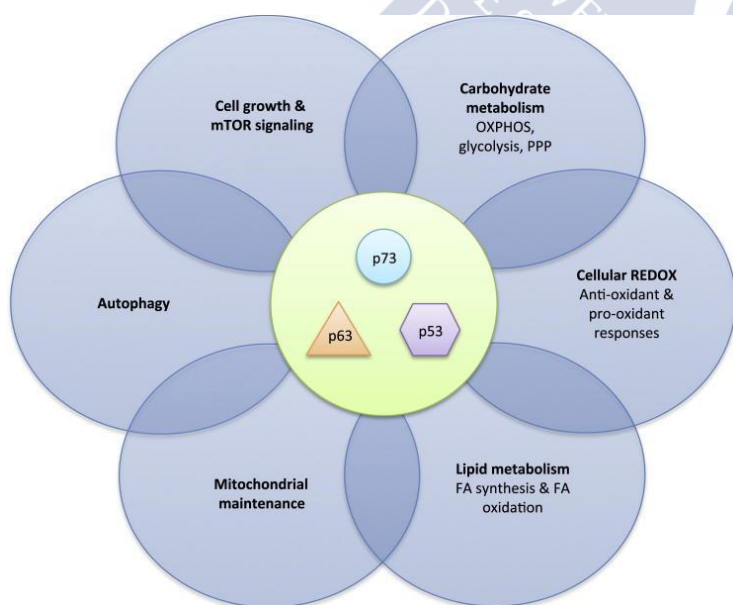
p53 es un componente clave en la respuesta celular al estrés; se activa mediante numerosas señales intrínsecas y extrínsecas que incluyen daño genotóxico, activación de oncogenes, pérdida de contactos celulares normales y privación de nutrientes u oxígeno. Muchos de estos estresantes se encuentran durante la tumorigénesis¹⁹⁹. El resultado de la respuesta al estrés mediado por p53 depende del tipo celular, el alcance, duración y origen del estrés. El estrés severo o sostenido va acompañado de daño irreversible, como el daño genotóxico extremo o la

activación de oncogenes, induce la muerte celular o senescencia. Ante un estrés leve, la respuesta de p53 consisten en la reparación o prevención del daño; p53 puede activar respuestas antioxidantes, reparar daños en el ADN o inducir un arresto transitorio del ciclo celular lo que permite que las células sobrevivan hasta que se resuelva el daño. Las alteraciones metabólicas, como las variaciones en la disponibilidad de nutrientes²⁰⁰ u oxígeno, también desencadenan una respuesta adaptativa en la que p53 modula el metabolismo a la vez que coordina la proliferación y el crecimiento celular²⁰¹.

5.1 FUNCIONES DE P53

Una vez activado, p53 ejerce sus principales funciones actuando como factor de transcripción, regulando la expresión de genes y microRNAs. Las funciones de p53 son extremadamente diversas. Su localización celular y su concentración pueden ser factores que determinen su función. p53 está implicado entre otros, en la defensa antioxidante, supresión y promoción de la diferenciación celular, envejecimiento, metabolismo, etc.²⁰² Por ejemplo, en el citoplasma, p53 inhibe la autofagia²⁰³, interactúa con miembros de la familia Bcl2 que promueven la apoptosis y regula el metabolismo de la glucosa al unirse a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)²⁰¹.

Las alteraciones en el metabolismo se consideran cada vez más importantes para la progresión tumoral. Muchos estudios han comenzado a desentrañar el papel de p53 en la regulación de vías metabólicas como la glucólisis, la fosforilación oxidativa y el metabolismo de los aminoácidos. Inicialmente, los estudios se centraban en el papel supresor tumoral de p53 ya que las células tumorales dependen de la remodelación metabólica para su crecimiento y supervivencia²⁰⁴ Para proliferar, las células deben duplicar su contenido biológico, por lo tanto, pasan de un metabolismo catabólico a anabólico²⁰⁵. Aunque inicialmente la regulación de los



genes metabólicos se veía solo a través de su capacidad antitumoral, cada vez existen más evidencias que su papel regulador se extiende más allá de la supresión tumoral²⁰⁶. Además, se han atribuido funciones en el metabolismo a otros miembros de la familia de proteínas de p53, como p63 y p73 (imagen 17), por lo que ya no solo son esenciales para frenar el desarrollo de los tumores, sino que pueden influir en el desarrollo de enfermedades metabólicas.

Imagen 17 :Esquema de la interacción entre miembros de la familia p53 y vías metabólicas involucradas²⁰⁶. Licencia *creative commons*.

5.2 p53 Y LA RUTA AMPK/MTOR

p53 interactúa con los principales sensores energéticos y nutricionales de las células: AMPK y mTOR implicados en numerosas rutas clave en el metabolismo de los lípidos y carbohidratos además de regular autofagia y participar en la respuesta al estrés oxidativo

Cuando los nutrientes son escasos, los niveles de ATP disminuyen por lo que la relación de AMP/ATP es más alta. La proteína AMPK detecta esta situación de estrés activando rutas anabólicas. En relación con el metabolismo lipídico, AMPK potencia por tanto la oxidación de ácidos grasos mientras que inhibe su síntesis y la de colesterol mediante la fosforilación directa de las enzimas clave como ACC y HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa). Otro sustrato principal para AMPK es la proteína 2 de la esclerosis tuberosa (TSC2) que, tras su fosforilación, y junto con tsc1, regula negativamente a mTOR, reduciendo así la síntesis proteica y el crecimiento/división celular. De manera similar a AMPK, mTORC1 regula el metabolismo de los lípidos, pero a diferencia de AMPK, regula positivamente el programa lipogénico a través del factor de transcripción SREBP.

Es importante para la homeostasis celular la flexibilidad en la señalización entre p53 y las rutas activadas por AMPK y mTOR para así adecuar la respuesta al estrés²⁰⁷. Esto quiere decir que AMPK y mTOR no solo actúan downstream de p53 sino que pueden influir en su activación. Por ejemplo, en la situación de privación de nutrientes, y falta de energía AMPK activa a p53 y p53 regula negativamente a mTORC1 deteniendo rutas anabólicas y el crecimiento/división celular²⁰⁸. Se ha visto además que AMPK puede ejercer un efecto inhibitorio sobre p53 a través de la acetilación vía Sirt1 en hepatocarcinoma²⁰⁹ por ejemplo mientras que otros estudios sugieren la activación de p53 también mediante la acetilación vía Sirt 1, en este caso en células de músculo esquelético²¹⁰. Esto pone de manifiesto la habilidad de AMPK de activar o inhibir p53 de forma dependiente del tejido y contexto.

5.3 p53 Y METABOLISMO DE LA GLUCOSA

La glucosa es la principal fuente de carbono de las células. Una vez captada, se rompe en piruvato en el citosol en un proceso llamado glucólisis. En la mayoría de las células, el piruvato entra en el ciclo de Krebs para generar NADH y FADH₂ que podría utilizarse para la producción de ATP durante la fosforilación oxidativa. Sin embargo, en la mayoría de las células tumorales la vía preferida para la obtención de energía es la glucólisis convirtiéndose el piruvato en lactato. Este cambio de la respiración mitocondrial a la glucólisis aeróbica se conoce como efecto *Warburg* y se cree que ayuda a satisfacer las necesidades metabólicas de las células tumorales^{201,211}.

p53 puede limitar el flujo de glucosa hacia la vía glucolítica a través de varios mecanismos:

- 1) Induciendo la expresión de la enzima TIGAR (*tp53 inducible glycolysis and apoptosis regulator*) que disminuye los niveles de fructosa-2,6-bisfosfato, sustrato que promueve la glucólisis; de esta forma se desvía la glucosa hacia la ruta de las pentosas fosfato evitando la glucólisis²¹².
- 2) Regulando de forma negativa enzimas glucolíticas como la fosfoglicerato mutasa (PGM) y la PDK2 que inactiva al complejo piruvato deshidrogenasa (PDC) cuya función es convertir el piruvato en acetyl-CoA²¹³.
- 3) Disminuyendo los niveles de glucosa

intracelular mediante la inhibición de la captación. La expresión de los transportadores GLUT1 y GLUT4 están directamente regulados negativamente por p53^{206,214}

5.4 P53 Y ESTRÉS OXIDATIVO

p53 posee actividad pro y antioxidante, y ambas relacionadas con su papel como supresor tumoral. El vínculo entre p53 y el estrés oxidativo surgió de la observación de que puede activar la expresión de genes que aumentan los niveles de ROS intracelulares²¹⁵ como PIG-3 y la prolina oxidasa e inhibir la expresión de genes antioxidantes. Como resultado del aumento de ROS, se produce muerte celular por apoptosis. Por otro lado, p53 puede activar la expresión de proteínas con actividad antioxidante como las sestrinas²¹⁶, la glutatión peroxidasa²¹⁷ y la aldheido deshidrogenasa (ALDH4)²¹⁸.

p53 puede regular la respiración mitocondrial a través de la enzima citocromo c oxidasa 2 (SCO2). Niveles basales de p53 son suficientes para promover la expresión de SCO2, esencial para la producción de energía en la mitocondria mediante el empleo de oxígeno. En células en las que falta p53 se ve un menor consumo de oxígeno debido a una reducción de dicha enzima. Así, se produce el salto hacia la glucólisis para la obtención de energía²¹⁹.

La capacidad de p53 para regular la glucólisis también puede dar como resultado cambios en los niveles de ROS intracelulares. La activación de TIGAR disminuye los niveles celulares de fructosa-2,6-bisfosfato, sustrato que promueve la glucólisis. Debido a la acción de este enzima, la glucosa se dirige a la ruta alternativa de las pentosas fosfato, fuente principal de NADPH. Este NADPH se utiliza para eliminar ROS mediante el glutatión reducido (GSH). Como consecuencia, disminuye también la apoptosis asociada al estrés oxidativo²⁰¹.

5.5 P53 Y METABOLISMO LIPÍDICO

El metabolismo de los lípidos es un proceso altamente regulado y sincronizado. Los ácidos grasos pueden ser utilizados por las células como una fuente de energía o como un medio de almacenamiento. La oxidación de los ácidos grasos (FAO, *fatty acid oxidation*) tiene lugar en las mitocondrias; allí, los ácidos grasos se descomponen en unidades de dos carbonos para producir acetil-CoA, NADH y FADH₂, que pueden derivarse directamente al ciclo de Krebs y a la cadena de transporte electrónico para producir ATP. La síntesis de los ácidos grasos tiene lugar en el citosol donde a partir de unidades de dos carbonos se elongan gradualmente en un proceso que requiere ATP y NADPH. La síntesis de novo se produce principalmente en tejido adiposo e hígado. En células adultas diferenciadas, los lípidos proceden principalmente de la dieta mientras que las células tumorales o las células embrionarias, altamente proliferativas, poseen tasas elevadas de lipogénesis de novo. En muchos tipos de tumores encontramos aumentada la expresión de enzimas clave en la lipogénesis como ACC y FAS²⁰¹.

Los ácidos grasos se transportan a las células de todo el cuerpo a través de la circulación en forma de lipoproteínas, formadas por ácidos grasos recién sintetizados o bien por ácidos grasos derivados de la dieta. Cada clase de lipoproteína se caracteriza por una composición de fosfolípidos, colesterol y apoproteínas diferentes, lo cual permite diferenciarlas por su densidad. Los quilomicrones procedentes de la dieta transportan los lípidos desde el intestino y transfieren su contenido lipídico en los tejidos. Los quilomicrones remanentes son retirados del torrente sanguíneo y endocitados por los hepatocitos en el hígado. El exceso de lípidos que no ha sido utilizado en tejidos extrahepáticos se ensambla con lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)

y se secretan al torrente sanguíneo donde los lípidos se transfieren de nuevo a los tejidos. La mitad de las VLDL remanentes vuelven al hígado, mientras que otra parte continúa en circulación, cediendo más TG a los tejidos, perdiendo más densidad convirtiéndose en moléculas ricas en colesterol de baja densidad (LDL). Estas LDL captan colesterol, lípidos de los tejidos o de quilomicrones circulantes; estas partículas poseen más densidad (HDL) y vuelven al hígado donde son captadas a través de un proceso mediado por receptor^{208,212,220}.

p53 juega un papel crucial en el metabolismo de los lípidos, participando tanto en condiciones normales como patológicas. Debido a su función principal como supresor tumoral, generalmente actúa como un regulador negativo de la síntesis de lípidos mediante la activación de la oxidación de los ácidos grasos y la inhibición de su síntesis. Para investigar el papel de p53 en el metabolismo lipídico se utilizaron fibroblastos embrionarios de ratón inducibles para diferenciarse en adipocitos. En este sistema se ha demostrado que la activación de p53 inhibe la diferenciación de los adipocitos²²¹ así como su inactivación promueve la acumulación de lípidos.

Otro enfoque para abordar el papel de p53 en el metabolismo lipídico procede de la modificación de la disponibilidad de nutrientes. En ausencia de nutrientes, p53 incrementa la FAO como fuente de energía alternativa a la glucólisis. La privación de glucosa conduce a un aumento de la expresión génica de la lipina 1 (LPIN1)²²² (imagen 16) que coopera con dos reguladores transcripcionales, PGC1 α y PPAR α para inducir la expresión de genes implicados en la FAO e inhibición de la síntesis de ácidos grasos en el hígado²²³. Mutaciones en el gen de la lipina 1 están relacionadas con el desarrollo de la esteatosis hepática. p53 regula la oxidación no solo a través de mediadores, sino que puede modificar directamente la expresión de proteínas clave como la carnitina O-octanoiltransferasa (CROT), la CPT1A y CPT1C. Además, p53 induce la expresión de citocromos P450 y de dos enzimas, CYP4F2 y CYP4F3, que catalizan la ω -hidroxilación de ácidos grasos de cadena larga²⁰⁵.

p53 inhibe el anabolismo lipídico a través de la regulación transcripcional del factor regulador de esteroides (SREBP); suprime la expresión de SREBP1c en el tejido adiposo de ratones ob/ob, dando lugar así a la disminución de la expresión de otros genes lipogénicos como FAS y la ATP citrato liasa (ACLY)²²⁴ (imagen 18).

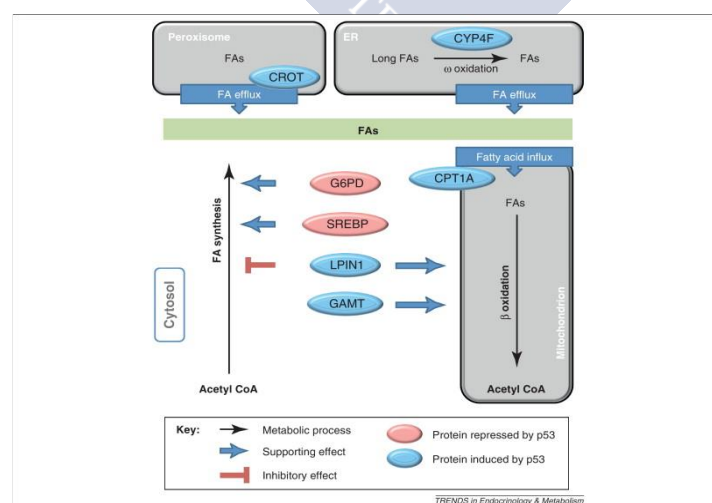


Imagen 18 :p53 promueve el catabolismo lipídico e inhibe su anabolismo²⁰⁸. Con permiso de Elsevier.

Finalmente, se ha encontrado que p53 también puede tener un papel en el transporte de los lípidos. A nivel hepático, se ha realizado un estudio de expresión génica en una línea celular de un hepatocarcinoma, HepG2, y se han encontrado incrementados genes que juegan un papel importante en el metabolismo de las lipoproteínas²²⁰. Entre esos genes se encuentran la PLTP (*phospholipid transfer protein*) y la apolipoproteína M que forma parte de las HDL. PLTP es una proteína que interviene en la transferencia de lípidos entre LDL/VLDL a partículas HDL. El hecho de que p53 regule estos genes sugiere que desempeña un papel activo en el transporte de los lípidos. En el caso de PLTP, p53 induce dicho gene a través de la unión a elementos de respuesta (p53RE)²⁰⁸.

5.6 FAMILIA P53: P63 Y SU PAPEL EN EL METABOLISMO HEPÁTICO

p53 pertenece a una familia de factores de transcripción que incluye a p63 y p73, homólogos funcionales de p53 que poseen una elevada similitud en cuanto a secuencia y estructura (imagen 19). Tanto Tp63 como Tp73 son genes que se transcriben a partir de dos promotores diferentes, resultando en dos proteínas diferentes: una de ellas posee el dominio de transactivación (TA) completo (TAp63 y TAp73) y otra posee el extremo N-terminal truncado (Δ Np63 y Δ Np73) faltándoles parte de ese dominio, pero manteniendo alguna capacidad de transactivación. Además, un splicing alternativo del ARN en el extremo C-terminal, da lugar a tres isoformas distintas en cada una de las proteínas, α , β y γ respectivamente. El tamaño de dicho extremo C-terminal afecta a la función. En el caso de p63, la isoforma transcripcionalmente más activa es curiosamente la más corta, TAp63 γ mientras que la isoforma más larga, TAp63 α es la menos activa debido a acciones inhibitorias del propio extremo C-terminal²²⁵ (imagen 19).

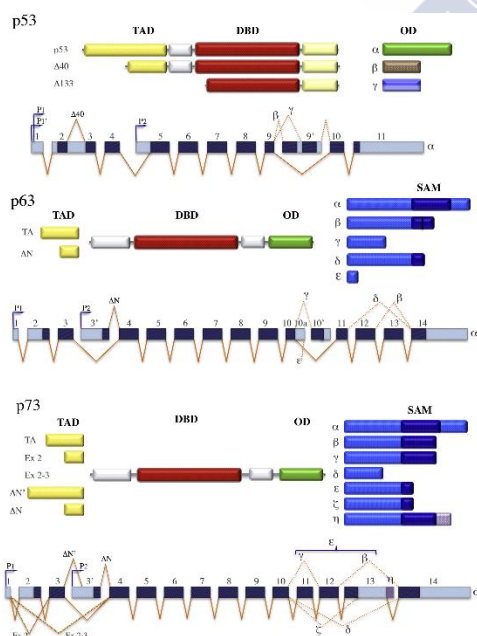


Imagen 19 :Representación esquemática del gen de la familia p53 y la estructura de la proteína. Principales dominios proteicos: dominio de transactivación (TAD) en amarillo, dominio de unión al ADN (DBD) en rojo, dominio de oligomerización (OD) en verde, motivo alfa estéril (SAM) en azul. Los diferentes dominios C-terminales se pueden combinar con los diferentes N-terminales para generar un gran número de proteínas diferentes. Las regiones codificantes de ADN están en azul oscuro mientras que las UTR 5' y 3' están en azul claro. P1 y P2 indican los diferentes promotores utilizados²²⁶. Con permiso de Elsevier.

TAp63 y TAp73 pueden suplementar la función de p53 y activar genes dando lugar a arresto del ciclo celular o muerte celular; aunque pueden tener dianas de transactivación diferentes. Por el contrario, las formas Δ Np63 y Δ Np73, generalmente, tienen actividad antiapoptótica y actúan como dominantes negativos para inhibir la función de los miembros de

la familia p53. Las isoformas Δ N pueden activar genes diana específicos y actuar de forma independiente (imagen 20). A pesar de las similitudes y superposición en cuanto a actividad, como se puede ver en la imagen 19, p63 y p73 presentan funciones sorprendentemente diferentes y ambas juegan un papel fundamental en el desarrollo²²⁶.

Mientras que los ratones p53 KO son viables y no muestran ningún defecto de desarrollo importante, los ratones p73 y p63 KO muestran fenotipos muy marcados. p73 es esencial para el desarrollo neural adecuado; los ratones Tp73^{-/-} muestran defectos en el desarrollo del SNC.

Los ratones Tp63^{-/-} tienen defectos en el desarrollo de tejidos epiteliales y extramidades. En humanos, mutaciones en p63 provocan displasias ectodérmicas. En cuanto al papel de p63 en cáncer, es controvertido. Algunos tumores muestran una sobreexpresión de p63, mientras que la progresión y metástasis de otros tumores se asocia a la pérdida de p63. Esto se debe a la presencia de las distintas isoformas: TAp63 actúa como un supresor tumoral mientras que ΔNp63 como un oncogen²²⁷. Las funciones de las isoformas de p63 en tejidos normales, se han debatido durante varios años. La controversia comenzó a aclararse con la generación de ratones KO específicos de cada isoforma. Los ratones deficientes para ΔNp63 muestran una epidermis y epitelio estratificado poco desarrollado, lo que demuestra que esta isoforma es responsable del desarrollo del epitelio y mantenimiento de las células madre²²⁸. ΔNp63α, ha demostrado poseer un papel importante en el desarrollo de tumores promoviendo la supervivencia de las células epiteliales ya que es capaz de activar transcripcionalmente a FAS²²⁹.

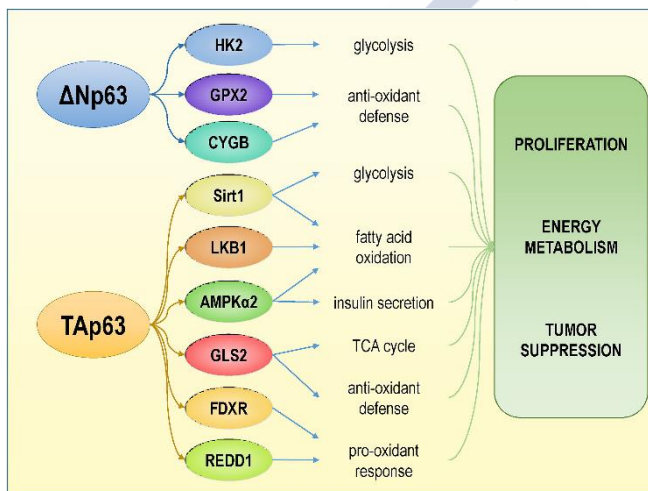


Imagen 20 :Funciones metabólicas de los genes diana específicos de las isoformas de p63⁵. Con permiso de Elsevier.

En cambio, los ratones deficientes en TAp63 mostraron un envejecimiento prematuro, desarrollaron tumores y alteraciones en el metabolismo de lípidos y glucosa²³⁰. En este estudio, los ratones desarrollaron múltiples fenotipos como un envejecimiento prematuro, resistencia a insulina, intolerancia a la glucosa e hígado graso. Se encontraron alteraciones en los niveles de ARNm de genes implicados en el metabolismo lipídico como FAS y CPT1, entre otros, lo cual indica defectos tanto en la síntesis como en la oxidación de los ácidos grasos. El mecanismo molecular que promueve estos efectos es directo a través de Sirt1, AMPKα2 y LKB1. Aunque estos datos

mostraron un papel importante de TAp63 en el control del metabolismo lipídico en ratones, hasta el momento, no se ha encontrado evidencias de estos trastornos metabólicos en pacientes.

Además de Sirt1, AMPK y LKB1, se han identificado nuevas dianas de TAp63 implicadas en el metabolismo hepático de los lípidos. Se ha propuesto la vía TAp63-CCDC3 para regular la acumulación de lípidos hepáticos. CCDC3 (*Coiled-Coil Domain Containing 3*), como diana de TAp63, actúa como una molécula endocrina que puede aliviar los cambios patológicos asociados a la esteatosis en los hepatocitos a través de su efecto antilipogénico²³¹.

En busca de otras dianas de p63, encontramos que IKKα es una diana downstream fundamental que participa en el desarrollo epidérmico. En humanos, su promotor, contiene lugares de unión que pueden ser reconocidos por las tres isoformas de TAp63, pero no de

$\Delta Np63$ ²³². Se ha demostrado que IKK β puede inhibir a la isoforma TAp63 γ ²³³. IKK α e IKK β son dos subunidades catalíticas homólogas que forman un complejo quinasa junto con la subunidad reguladora IKK γ ; este complejo activa a NF κ β en respuesta a citoquinas inflamatorias como TNF α . Se ha demostrado que NF κ β se encuentra incrementado en modelos de roedores con obesidad inducida por dieta o bien genética (ratones *ob/ob*). Mediante el empleo de ratones que sobreexpresan IKK β y NF κ β de forma específica en el hígado (ratones LIKK), desarrollaron resistencia a insulina local y sistémica a través de la producción de IL6 e IL1 β ²³⁴. De esta forma se relaciona a la subunidad IKK β con el desarrollo de la inflamación y resistencia a insulina. Otro estudio realizado por Karin *et al.* demostró que la inhibición de IKK β específica en el hígado, mejora la sensibilidad a insulina y reduce la gluconeogénesis hepática en ratones *ob/ob* alimentados con dieta alta en grasa.²³⁵

5.7 p53 Y p63 EN EL DESARROLLO DE NAFLD

Como hemos visto, NAFLD es la manifestación hepática del síndrome metabólico, una enfermedad crónica fuertemente asociada con enfermedades cada vez más incidentes como la obesidad y la T2DM. También hemos visto los principales mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la esteatosis y la progresión a esteatohepatitis como la inflamación, el estrés oxidativo, estrés del retículo endoplasmático, la apoptosis y la resistencia a insulina. La alteración de p53 promueve los efectos de dichos eventos moleculares y la lesión hepática. Dada la importancia que p53 juega en la regulación del metabolismo lipídico, no es de extrañar que participe en el desarrollo de enfermedades sistémicas relacionadas con la homeostasis lipídica como la obesidad, diabetes y NAFLD.

En modelos de ratones con obesidad inducida por dieta, los niveles elevados de lípidos dan lugar a un aumento del estrés oxidativo y por tanto a la activación de p53 que intentará mejorar el catabolismo lipídico; por otro lado también se producirá resistencia a insulina y diabetes²³⁶. Los adipocitos y hepatocitos de ratones obesos muestran niveles elevados de p53^{237 224}.

En la bibliografía, en relación al papel de p53 en el desarrollo de la esteatosis hepática encontramos grandes controversias. Por ejemplo, en el estudio de Derdak *et al.*, la inhibición farmacológica de p53 disminuyó la acumulación de TG, el estrés oxidativo y la apoptosis a través de la ruta SIRT1/PGC1 α /PPAR α y SIRT1/LKB1/AMPK²³⁸. Otro estudio realizado en ratones deficientes para la proteína p53 a los que se le induce esteatohepatitis con una dieta MCD, mostró que p53 regula la progresión de la esteatohepatitis mediante la vía de p66shc (una diana *downstream* de p53) controlando los niveles de ROS y la apoptosis. Además, experimentos *in vitro*, mostraron que la interrupción de la vía de señalización de p53 inhibe la actividad de p66shc y disminuye la acumulación de ROS en los hepatocitos.²³⁹ En estos modelos, la inhibición química o la delección total de p53, mejora la enfermedad hepática.

Un estudio posterior realizado por Liu *et al.*, ha demostrado un papel de p53 totalmente opuesto en el metabolismo lipídico hepático. El ayuno provoca un estrés ribosomal que impide la síntesis de la enzima mdm2, p53 se activa, e induce la transactivación de la enzima malonil-CoA descarboxilasa (MCD) que cataliza la degradación de malonil-CoA a acetil-CoA, favoreciendo la oxidación. Sin embargo, en ratones con la mutación mdm2 C305F, con una actividad de p53 disminuida, no pudieron activar a la enzima MCD, por lo tanto se acumula el malonil-CoA con una consecuente disminución de la tasa oxidativa y acumulación de ácidos

grasos en el hígado²⁴⁰. En esta línea, en ratones obesos, la pérdida de p53 resultó en un aumento sustancial de la acumulación de lípidos en el hígado y de masa corporal²⁴¹.

Estos resultados contradictorios sugieren que el resultado de la activación de p53 es específico de tejido y probablemente dependa del tipo de estrés. Otra posibilidad es que los niveles basales de p53 ayuden a mantener la homeostasis lipídica²⁰⁸ y protejan de la enfermedad metabólica, mientras que la desregulación de p53 o la activación crónica debido a estrés metabólico sostenido (como en el caso de la obesidad), contribuyen a la patogénesis de la enfermedad.

Un estudio reciente mostró que los niveles de p53 en el hígado son altamente dinámicos y regulados por la disponibilidad de nutrientes. La deleción aguda y específica de p53 en hígado de ratones adultos dio lugar a defectos en el almacenaje de glucógeno y provocó el desarrollo de esteatosis. La privación de alimentos estabiliza los niveles de p53 hepáticos y la expresión de sus genes diana a través del sensor metabólico AMPK. Por otro lado, durante el ayuno, la pérdida hepática de p53 empeora la homeostasis de la glucosa y el catabolismo de los aminoácidos²⁴².

Recientemente se ha demostrado que la deficiencia de TAp63 α provoca obesidad y síntomas de diabetes tipo 2 tanto en ratones ancianos como en ratones alimentados con dieta alta en grasa²³⁰. Por otro lado, la deficiencia de TAp73 da lugar a un aumento de la sensibilidad a insulina y protección contra la intolerancia a la glucosa en ratones alimentados con dieta alta en grasa, debido a un efecto positivo en la vía de señalización de la insulina²⁴³. Teniendo en cuenta estos estudios, queda clara de nuevo la complejidad del papel de la familia p53 durante el desarrollo del síndrome metabólico²⁰¹.

En general, todos estos factores de transcripción cooperan en la supervisión del metabolismo de glucosa y lípidos, funciones mitocondriales y producción de RO



OBJETIVOS





OBJETIVOS

Para el desarrollo de esta tesis se propusieron los siguientes objetivos:

- Estudiar el papel de p53 en la regulación del metabolismo lipídico hepático.
- Estudiar el papel de p53 en las acciones periféricas de la ghrelina sobre el metabolismo lipídico en el tejido adiposo y en el hígado.





MATERIAL Y MÉTODOS





1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los procedimientos experimentales realizados en este trabajo se llevaron a cabo bajo la supervisión del Comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela (procedimiento del Profesor Rubén Nogueiras Pozo: 15005E/12/FUN01/FIS02/RNP2) y siguiendo la normativa vigente:

- ✓ Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
- ✓ Ley estatal 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- ✓ Real decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- ✓ Decreto 296/2008, de 30 de diciembre, de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el Registro de los centros de cría, de suministradores y usuarios y la Comisión Gallega de Bienestar de los Animales de Experimentación.

En los últimos años, la investigación con animales experimentó numerosas variaciones debidas, entre otras causas, a la incorporación de los animales modificados genéticamente y a la mayor conciencia de la sociedad sobre la necesidad de favorecer el bienestar animal durante la experimentación. El real decreto 53/2013 tiene como finalidad principal asegurar que el número de animales utilizados en los procedimientos se reduzca al mínimo y que no se les cause innecesariamente dolor (artículo 4: Principio de reemplazo, reducción y refinamiento). Todo esto se ha tenido en cuenta a lo largo de este trabajo. En cuanto al número de animales se ha intentado evitar la duplicación innecesaria de experimentos y reducir al máximo dentro de cada grupo experimental sin llegar a comprometer la finalidad del estudio. Hay que tener en cuenta posibles resistencias a tratamientos y la variabilidad intraespecífica. En algunos casos se ha valorado el uso de métodos alternativos (cultivo celular y explantes) y poner especial cuidado en el bienestar animal para reducir el estrés causado por dolor, sufrimiento o daño duradero en los animales.

1.1 MODELOS ANIMALES

Además del ratón común, en esta tesis se utilizaron ratones modificados genéticamente:

- ✓ Ratón *knock-out* para el gen p53¹. Para la generación de estos ratones se emplearon células ES-D3 (línea de células madre embrionarias procedentes de blastocistos de ratón de la cepa 129/SV) en las que se introduce un vector que reemplaza el 40% de la secuencia de un alelo del gen p53. Se inyectaron clones de estas células en los blastocistos de ratonas WT de la cepa C57BL6 dando lugar a machos quimeras capaces de transmitir la mutación para el gen p53. Esto da lugar a ratones con un fondo genético mixto de tipo C57BL6J/129sv. Los ratones homocigotos para esta mutación del gen p53 tienen una deficiencia del 40% de la región de codificación lo cual bloquea completamente la producción de la proteína p53²⁴⁴.

¹ Ratones p53 KO, cedidos por el Dr. Manuel Serrano (CNIO, Madrid)

Para el desarrollo de nuestros experimentos se seleccionaron ratones macho homocigotos para la mutación del gen p53 (p53 KO) y ratones macho homocigotos sin mutación (p53 WT) procedentes de cruces heterocigotos. Se tuvo en cuenta la alta predisposición de estos ratones al desarrollo de tumores. Todos los ratones utilizados se sacrificaron sin ningún síntoma de tumor o de daño provocado por un tumor. En caso de haberlo, dicho ratón no se tuvo en cuenta para el experimento.

✓ Ratón floxeado para el gen p53 (cepa B6;129S4-Trp53^{tm5Tyj/J}) procedentes de la casa comercial *The Jackson Laboratory*.

El sistema Cre-lox se ha descubierto en el bacteriófago P1 como parte de su mecanismo de replicación del DNA genómico. Desde su descubrimiento, se ha utilizado esta estrategia para la manipulación genética, ampliamente utilizada en cultivos celulares, levaduras, plantas, ratones y otros organismos. Su éxito se debe a su sencillez ya que tan solo se requieren dos componentes: las secuencias loxP y una enzima que catalice la recombinación de los sitios lox, la Cre recombinasa.

El primer paso es la creación de un vector de reemplazamiento que contenga una secuencia homóloga para nuestro gen de interés, en este caso p53 en el intrón 1, flanqueado por unas secuencias denominadas loxP. Con este vector se transfecta a células madre embrionarias de ratón que, posteriormente, se someten a un proceso de selección para identificar aquellos clones en los que se haya producido la recombinación de interés. Estos clones se inyectarán en blastocistos de ratonas pseudopreñadas y obtener así ratones quimera que permitirán la transmisión de la mutación a la descendencia. Al cruzar estas quimeras con ratones normales, se obtendrán ratones heterocigotos. Por último, mediante el cruce de animales heterocigotos entre sí obtendremos ratones con los dos alelos del gen mutado. Este gen p53 floxeado es totalmente funcional hasta que se produzca la recombinación con la enzima Cre.

Como hemos mencionado, para el desarrollo de esta tesis utilizamos dos modelos animales: el primero, un ratón con una deficiencia total y global para el gen p53, y el segundo, un ratón en el que vamos a disminuir de forma parcial y específica la expresión de p53 en el hígado. Para la disminución específica de p53 utilizamos un virus adenoasociado que contienen en su genoma la secuencia para la enzima Cre recombinasa. Los virus adenoasociados (AAV, siglas en inglés) son virus de ADN de cadena sencilla perteneciente a la familia *Parvoviridae*. Es un virus muy simple, pero no autónomo, ya que requiere la coinfección con otro virus (normalmente un adenovirus) para poder replicarse.

Inyectamos a través de la vena de la cola del ratón, 100µl de una disolución de suero salino con una concentración de virus adenoasociado serotipo 8 (AAV8-Cre-GFP, *Signagen Laboratories*) de 10¹⁰ partículas virales/mL. Al mismo tiempo inyectamos un AAV8-GFP sin los genes para la enzima Cre recombinasa como control de nuestros experimentos. Esperamos un mes tras la inyección de los virus para realizar los experimentos ya que de esa manera nos aseguramos de que la disminución en la expresión de p53 es significativa.

1.2 GENOTIPADO DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS

1.2.1 Extracción de ADN a partir de un fragmento de cola

Para genotipar a estos ratones se tomó una pequeña muestra de la punta de la cola (≤ 5 mm) en un tubo, antes de los 21 días de edad. A continuación, se procede a la extracción del ADN para lo cual se añaden 500 μ l tampón de cola (Tabla 1) y 10 μ l de proteinasa K (20mg/ mL) (*Invitrogen*, EO0491). Para una digestión eficiente es preferible dejar toda la noche las colas en un baño o termobloque a 55°C.

Composición del tampón de cola	
Tris	100mM pH 8
EDTA	0,5mM pH 8
SDS	0,2%
NaCl	200mM
Completar con agua destilada un volumen de 500mL	

Tabla 1. Composición del tampón de cola para la extracción del ADN.

Una vez digerida la cola, se procede según el protocolo:

- ✓ Centrifugar a 13200 rpm durante 10 minutos y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo descartando así restos celulares, pelo...
- ✓ Añadir 500 μ l de isopropanol puro y mezclar mediante inversión.
- ✓ Centrifugar a 13200 rmp durante 10 minutos. Al finalizar deberíamos observar un precipitado en el fondo del tubo. Descastar el sobrenadante con cuidado para no perder el precipitado.
- ✓ Añadir 500 μ l de etanol al 70% e invertir varias veces para lavar el precipitado.
- ✓ Centrifugar a 13200 rmp durante 10 minutos.
- ✓ Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado a temperatura ambiente durante 15-25 minutos dejando los tubos abiertos.
- ✓ Añadir 50 μ l de agua Milli-Q y guardar a 4°C hasta hacer la PCR.

1.2.2 Amplificación mediante PCR convencional

Una vez extraído el ADN genómico procedemos a su amplificación mediante PCR convencional utilizando en cada caso unos cebadores específicos. La síntesis de los cebadores se encargó a EUROFINSDNA (*Thermofisher*) con una purificación tipo HPSF y una concentración de 0,01 μ ml.

Denominación	Secuencia 5' → 3'	T _m (°C)
p53 WT	TATACTCAGAGCCGGCCT	56,3
p53 KO	TCCTCGTGCTTTACGGTATC	58,4
p53 Común	ACAGCGTGGTGGTACCTTAT	58,4

Tabla 2. Oligonucleótidos para el genotipado de los ratones p53 KO.

En las siguientes tablas se detallan las condiciones para el genotipado de los ratones p53 KO global:

Paso	T (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	1 min	34
Alineamiento	60	1min 30 seg	
Extensión	72	5	
Elongación final	72	10 min	1

Tabla 3. Condiciones de la PCR para el genotipado para el genotipado de los ratones p53 KO.

Reactivo	Casa comercial	Concentración	Volumen (μl)
H ₂ O miliQ	--	--	11,64
Tampón Taq Polimerasa 10x	Thermo Fisher Scientific (EP0712)	--	2
dNTPs	Thermo Fisher Scientific; 100mM dNTP set (10297018)	4mM	1
Oligo p53 WT	Thermo Fisher Scientific (Eurofinsdna)	5μM	1
Oligo p53 KO	Thermo Fisher Scientific (Eurofinsdna)	5μM	0,6
Oligo p53 Común	Thermo Fisher Scientific (Eurofinsdna)	5μM	1,6
Taq polimerasa	Dream Taq Green DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific (EP0712)	--	0,16

Añadir 18 μl de mezcla de PCR y 2μl de ADN genómico

Tabla 4. Cantidades de los reactivos necesarios para la mezcla de PCR de los ratones p53 KO.

Para el genotipado de los ratones p53 flox extraemos el ADN genómico con el mismo procedimiento explicado anteriormente. Para su amplificación mediante PCR convencional utilizamos unos cebadores específicos cuya síntesis se encarga a EUROFINSDNA (Thermofisher) con una purificación tipo HPSF y una concentración de 0,01μml.

Denominación	Secuencia 5' → 3'	T _m (°C)
p53 flox WT	CAACTGTTCTACCTCAAGAGCC	62,1
p53 flox Mutante	AGCTAGCCACCATGGCTTGAGTAAGT	67,9
p53 flox Común	CTTGCAGACATAGCCCACTG	61,2

Tabla 5. Oligonucleótidos para el genotipado de los ratones p53 flox.

En las siguientes tablas se detallan las condiciones para el genotipado de los ratones p53 flox:

Paso	T (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	30 seg	34
Alineamiento	62	1min	
Extensión	72	1 min	
Elongación final	72	2 min	1

Tabla 6. Condiciones de la PCR para el genotipado de los ratones p53 flox.

Reactivo	Casa comercial	Concentración	Volumen (μl)
H ₂ O miliQ	--	--	5,74
Tampón Taq Polimerasa 10x	Thermo Fisher Scientific (EP0712)	--	1,2
dNTPs	Thermo Fisher Scientific; 100mM dNTP set (10297018)	2,5mM	0,96
Oligo p53 WT	Thermo Fisher Scientific (Eurofinsdna)	5μM	1
DMSO	Dimethyl sulfoxide (DMSO) Sigma Aldrich (D8418)	99,9%	0,48
p53 flox WT	Thermo Fisher Scientific (Eurofinsdna)	5μM	0,3
p53 flox común	Thermo Fisher Scientific (Eurofinsdna)	5μM	0,3
p53 flox mutante	Thermo Fisher Scientific (Eurofinsdna)	5μM	0,3
Taq polimerasa	Dream Taq Green DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific (EP0712)	--	0,06
Añadir 18 μl de mezcla de PCR y 2μl de ADN genómico			

Tabla 7. Cantidades de los reactivos necesarios para la mezcla de PCR de los ratones p53 flox.

Las incubaciones de ambas PCRs se hicieron en el termociclador T100™ *Thermal Cycler* de BIO-RAD.

1.2.3 Electroforesis de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN correspondientes a los alelos WT y KO ó WT y mutante se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. El gel se preparó a una concentración de agarosa del 2% en tampón de electroforesis TAE (TRIS 40mM pH 7,6; Ácido acético 20mM y EDTA 1mM). Tras cargar el marcador de peso molecular de 100 pares de bases de *Invitrogen* (15628-019) y las muestras, se aplicó un voltaje de 90 V durante una hora sumergido en el tampón de electroforesis. El ADN se visualizó mediante la incorporación de *Red Safe* de *iNtRON biotechnology* (21141) al gel, usando un transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc 1000 de BIO-RAD.

2 PROCEDIMIENTOS EN ANIMALES

2.1 ESTABLACIÓN Y SEGUIMIENTO DE PESO E INGESTA

Para realizar los distintos experimentos se utilizaron ratones macho (cepa C57BL6J) de entre 6 a 8 semanas de edad con un peso entre 20-25 gr. Los animales se establecieron bajo condiciones de luz (12 horas luz/ 12 horas oscuridad) y temperatura (22±2°C), con un periodo de adaptación a las nuevas instalaciones previo a los procedimientos experimentales de 7 días. Durante dicho periodo, los ratones tuvieron acceso libre al agua y comida excepto en aquellos procedimientos en los que se requería el seguimiento de la ingesta.

La determinación del peso corporal se realizó con una balanza de precisión. Los animales se pesaron diariamente en el caso de tratamientos crónicos cortos (días). Es el caso de la administración de ghrelina intraperitoneal (7 días) o la administración de adenovirus (ad) en los que la duración del efecto es de 5 a 7 días. En este caso los ratones se estabularon individualmente y se hizo además un seguimiento de la ingesta. En el caso de los tratamientos de larga duración (meses) los animales se estabularon en grupos, teniendo en cuenta el comportamiento social de la especie. Se trata de experimentos en los que se administran virus adenoasociados y lentivirus cuyo efecto es permanente en el tiempo. En este caso se mide la ingesta por caja y se hace un promedio en función del número de ratones por caja.

También se llevó a cabo un seguimiento de peso e ingesta semanal en los modelos en los que se induce obesidad mediante el uso de dietas altas en grasa. Utilizamos dos tipos de dietas altas en grasa que se diferencian entre sí por el porcentaje de grasa: dieta alta en grasa (HFD, *High Fat Diet*) con un 45% de grasa (*Research Diets*, D12451) y dieta alta en grasa con un 60% de contenido graso (*Research Diets*, D12492) (tabla 8). Para el mantenimiento general y cría, los ratones se alimentaron con un pienso sólido comercial que constituía la dieta estándar (SD, *Standard Diet*) (Harlan Laboratories, 2019).

Composición	SD % kcal	HFD (45%)	HFD (60%)
Proteína	23	20	20
Carbohidrato	55	35	20
Grasa	22	45	60
Total	100	100	100
Kcal/g	3,3	4,73	5,24

Tabla 8. Composición en %kcal de las dietas SD, HFD (45%) y HFD (60%)

2.2 FENOTIPADO METABÓLICO

Para realizar el fenotipado metabólico de los ratones p53 KO y de los ratones tratados con ghrelina se mide la composición corporal de los ratones al inicio y al finalizar el tratamiento con un aparato de resonancia magnética nuclear para roedores (NMR, Echo Medical System) y el gasto energético, actividad locomotora y coeficiente respiratorio (RQ) utilizando un sistema de 12 cajas con medición de calorimetría indirecta (LABMaster TSE Systems).

2.2.1 Determinación de la composición corporal

El análisis de la composición corporal se realizó a través de resonancia magnética nuclear (Whole Body Composition Analyzer; Echo MRI). Obtenemos datos de composición de masa grasa y masa magra. Las determinaciones se hacen al inicio y al final del experimento por lo que podemos analizar los cambios que provoca el tratamiento en el almacenamiento de los depósitos grasos.

2.2.2 Fotografía termogénica

Para medir la temperatura interscapular de los animales es necesario afeitar el pelo de esta zona previamente a la realización de la fotografía termogénica (E60bx: *Compact-Infrared-*

Thermal-Imaging-Camera; FLIR; West Malling, Kent, Reino Unido). Las imágenes fueron analizadas mediante el software específico de FLIR-Tools.

2.2.3 Sistema de calorimetría indirecta

La calorimetría indirecta nos permite reflejar el estado nutricional del ratón en estudio bajo diferentes condiciones genéticas, farmacológicas o utilizando distintos tipos de dieta. Además del tipo de sustrato que se utiliza para la obtención de energía, también obtenemos información acerca de la asimilación de los macronutrientes, la termogénesis, del ejercicio físico y la patogénesis de la obesidad y la diabetes. El sistema de calorimetría indirecta está formado por jaulas individuales que presentan sensores que registran la actividad locomotora (LA, *Locomotor Activity*), el gasto energético (EE, *Energy expenditure*), el cociente respiratorio (RQ, *Respiratory Quotient*) y la ingesta. Los animales se adaptaron al nuevo tipo de ambiente colocándolos en cajas de adaptación durante 48 horas previas a la medida. El sistema realiza medidas cada 30 minutos durante 48 horas de ingesta, consumo de O₂ (vO₂), producción de CO₂ (vCO₂) y actividad locomotora, entre otros.

✓ Actividad locomotora (LA): se detecta utilizando haces de luz infrarroja que registra el movimiento del animal en sentido horizontal y vertical.

✓ Gasto energético (EE): mediante el uso del sistema de calorimetría indirecto podemos estimar la cantidad de energía producida por el cuerpo mediante la medida del consumo de O₂ y la producción de CO₂. La cantidad de energía varía debido a la manipulación genética, tratamientos farmacológicos o simplemente cambios en la dieta. Esto se debe tener en cuenta a la hora de representar los datos del gasto energético ya que no podrán representarse como datos brutos, sino que debemos normalizarlos. El método más extendido para normalizar el gasto energético es dividir el vO₂ entre el peso corporal total, que es como se representan en este estudio (Kcal/Kg/48h); sin embargo, la tasa metabólica no siempre es proporcional al peso corporal ya que, en los animales obesos, el aumento de tamaño se debe a un incremento en la masa grasa, tejido que posee una tasa metabólica muy baja. Teniendo en cuenta que no todos los tejidos tienen los mismos requerimientos metabólicos, podemos corregir el gasto energético de una forma más precisa teniendo en cuenta el cambio en la composición corporal (dividir el vO₂ entre la masa libre de grasa ó *lean mass*) (Kcal/g *lean mass*/48h). Esta aproximación tampoco es la más correcta ya que, aunque la grasa es un tejido metabólicamente menos activo, ocupa más volumen en animales obesos por lo que puede hacer una aportación mayor al gasto energético oxidando el aporte de calorías extra; una parte del depósito de grasa corresponde a la grasa parda (tejido metabólicamente muy activo) y, por último, la grasa también puede actuar como órgano endocrino. Por todo ello, forma más apropiada de representar los datos de gasto energético, más que con una simple división por BW o *lean mass*, sería mediante una regresión lineal enfrentando los datos de EE frente a la masa libre de grasa y realizar un análisis de la covarianza (ANCOVA). Este análisis estadístico nos permite eliminar la heterogeneidad que existe sobre el gasto energético al ejercer sobre él influencia tantos factores (edad, hormonas, masa grasa, masa libre de grasa....)²⁴⁵⁻²⁴⁷

✓ Tasa de respiración metabólica (RQ): Se calcula como la ratio entre el CO₂ liberado y el O₂ consumido. Esto nos permite detectar cuál es el principal combustible

utilizado en el organismo estudiado, ya que el valor del RQ es característico del sustrato energético que está siendo oxidado. En el caso de la glucosa el valor del RQ es 1 ya que por cada mol de O₂ utilizado, se libera un mol de CO₂. El valor de la RQ disminuye a 0,8 y 0,7 si se utilizan aminoácidos o grasa como fuente de energía²⁴⁸. Existen determinados estados metabólicos como la diabetes, hipo o hiper ventilación o una elevada presencia de glucosa en la urea que provocan variaciones en los valores de RQ lo cual nos puede llevar a una mala interpretación del tipo de sustrato que el individuo está utilizando como combustible²⁴⁹. En el caso de valorar el RQ cuando el animal de estudio es sometido a distintos tipos de dieta (alta en grasa, alta en glucosa...) debemos tener en cuenta el *food quotient*, que es un indicador de la proporción de calorías procedentes de cada macronutriente, y se calcula de la siguiente forma ($0,835 \times \% \text{proteína} + 0,71 \times \% \text{grasa} + 1 \times \% \text{carbohidrato}$). La relación entre el RQ y el FQ depende de la homeostasis energética del ratón. En los animales en los que existe un balance entre la ingesta y el gasto, el depósito de grasa es constante y por tanto los valores de RQ y FQ son iguales. Si el balance energético es positivo, es decir, cuando la ingesta supera al gasto, aumenta el valor de RQ ya que un aumento de la ingesta provoca un incremento en el almacenaje de grasa. Por el contrario, si el gasto energético es negativo el valor del RQ se sitúa por debajo del valor de FQ²⁵⁰.

2.3 TEST DE TOLERANCIA A GLUCOSA E INSULINA

Los test de tolerancia a glucosa (GTT, *Glucose Test Tolerance*) e insulina (ITT, *Insulin Tolerance Test*) permiten conocer la capacidad que tiene el metabolismo del ratón para tolerar la glucosa y el grado de resistencia a insulina respectivamente. Para ello, a primera hora de la mañana, ponemos a los ratones en ayuno y, tras 6 horas, realizamos las mediciones de glucosa basal, tomando una muestra de sangre a través de una pequeña incisión en la cola. Medimos la cantidad de glucosa en sangre (mg/dL) con una tira comercial (GLUCOCARD G Sensor) conectada a un glucómetro (GLUCOCARD G+ meter, A. MERANINI diagnostics).

2.4 INYECCIÓN INTRAPERITONEAL (IP) Y SUSTANCIAS INYECTADAS

Esta vía de administración de sustancias no requiere anestesia. Sujetamos al ratón por la espalda y cuando esté correctamente inmovilizado, lo inclinamos caudalmente e inclinamos ligeramente la cabeza del ratón hacia abajo para minimizar el riesgo de pinchar alguna víscera. Trazamos una línea imaginaria que cruce su abdomen transversalmente a la altura de las rodillas. La aguja (BD Microlance, 25G 5/8" 0,5x16mm, BD Medical Surgical Systems) (acoplada a una jeringa (1 ml BD slip-tip siringe, bulk, non-sterile, BD Medical Surgical Systems)) deberá ser insertada a dicha altura, preferiblemente en el lado derecho del ratón. La aguja debe alcanzar una profundidad de medio centímetro, aproximadamente, y debe insertarse con un ángulo de 30° con respecto a la superficie del abdomen. Las sustancias que inyectamos de forma intraperitoneal a lo largo de la tesis fueron las siguientes:

Sustancia IP	Casa comercial y número de referencia	Dosis	Vehículo
Glucosa	SIGMA; San Luis, Estados Unidos (158968)	2g/Kg	Suero salino
Insulina	Actrapid, Novo Nordisk; Bagsværd, Dinamarca	0,75U/Kg	Suero salino
Ghrelina	SIGMA; San Luis, Estados Unidos (G3902)	30µg/día	Suero salino
C75	SIGMA; San Luis, Estados Unidos (C5490)	10mg/Kg	Suero salino:DMSO (1:50)
TUDCA	Calbiochem; San Diego, Estados Unidos (580549)	250mg/Kg	Suero salino

Tabla 9. Lista de sustancias inyectadas vía intraperitoneal.

2.5 INYECCIÓN EN LA VENA DE LA COLA

La inyección en la vena lateral del ratón (*tail vein injection*, TVI) es el método más común y eficiente de administrar vectores virales en el hígado²⁵¹. Se han identificado al menos 12 serotipos diferentes de AAVs que vienen determinados por las distintas proteínas de la cápside. Cada uno de estos serotipos posee un tropismo diferente. Seleccionamos el AAV serotipo 8 por poseer una elevada afinidad por la infección en los hepatocitos. Dependiendo de la dosis, AAV8 puede infectar entre el 90 y 95% de los hepatocitos tras la inyección a través de la vena²⁵². Esta vía de administración tampoco requiere anestesia, pero sí la utilización de un cepo para inmovilizar de forma correcta al ratón. Los cepos se adquirieron en la casa comercial BIOSEB, Francia (modelo: TV-150-STD). Antes de administrar las sustancias hay que dilatar la vena del ratón para facilitar su inyección. Para ello se pueden utilizar varios métodos como las lámparas de infrarrojo, calentar la cola en agua a menos de 43°C o utilizar vasodilatadores. En nuestro caso utilizamos la luz infrarroja con exposiciones cortas (5 minutos aproximadamente). Inyectamos con agujas de 27G x 3/8” (0.40mm x 10mm) BD Plastipak syringe (1112678990) un volumen de 100µl. Las sustancias se inyectan en las venas laterales que se localizan a ambos lados de la línea central de la cola. Estas venas son muy superficiales de manera que la inyección ha de hacerse paralela a la superficie. Para comprobar si estamos accediendo a la vena de forma correcta basta con comprobar si aparece sangre al aspirar, o bien, no apreciar ninguna resistencia al presionar el émbolo de la aguja al inyectar. Una vez inoculada la sustancia, se retira la aguja despacio y se presiona la zona hasta detener la hemorragia.

A lo largo de esta tesis, hemos utilizado esta vía de administración para inyectar virus que modifican la expresión de determinados genes:

Virus	Casa comercial y número de referencia	Dosis (UV/ml)	Vehículo
AAV8-Cre-GFP	Signagen; Maryland, Estados Unidos (SL100835)	10 ¹⁰	Suero salino
AAV8-GFP	Signagen; Maryland, Estados Unidos (SL100833)	10 ¹⁰	Suero salino
AAV8-TAp63	Signagen; Maryland, Estados Unidos (189SL100865)	10 ¹⁰	Suero salino
Lentivirus shp63	Dharmacon; Colorado, Estados Unidos (: SH01-040654-02-20)	10 ⁷	Suero salino
Turbo GFP shRNA control	SIGMA; San Luis, Estados Unidos (SHC004)	10 ⁷	Suero salino
ad-p53	Signagen; Maryland, Estados Unidos (SL100777)	10 ⁹	Suero salino

ad-GFP	Signagen; Maryland, Estados Unidos (SL100833)	10 ⁹	Suero salino
ad-GRP78 WT	ViraQuest; Iowa, Estados Unidos (050312)	10 ⁹	Suero salino
ad-GFP	ViraQuest; Iowa, Estados Unidos (101311)	10 ⁹	Suero salino

Tabla 10. Lista de virus inyectados por la vena de la cola del ratón.

2.6 SACRIFICIO, RECOGIDA DE TEJIDOS Y MUESTRAS

Al final de los experimentos, los animales se sacrificaron por decapitación. Las muestras obtenidas por disección se almacenaban rápidamente a -80°C hasta su posterior análisis molecular. Para análisis histológicos se introducía una pequeña muestra del tejido de interés en paraformaldehído 10% para su posterior inclusión en parafina.

3 CULTIVOS CELULARES

3.1 HEPG2, HUMAN CAUCASIAN HEPATOCYTE CARCINOMA

Esta línea celular fue aislada de la biopsia de hígado de un hombre de 15 años con un carcinoma hepatocelular bien diferenciado. Se obtuvo de la ECACC (*The European Collection of Authenticated Cell Cultures*) a través de Sigma-Aldrich. El medio utilizado para el cultivo de estas células fue Eagle's Minimum Essential Medium, Earle Balanced Salt Solution (ENEM), (EBSS) cuya referencia es M2279 de Sigma-Aldrich. Este medio se suplementó con un 10% v/v de suero bovino fetal (FBS, *Fetal Bovine Serum*) y con un 1% GPS (200Mm L-Glutamina, 200 U/mL de penicilina y 10mg/mL de estreptomycin) de Sigma-Aldrich (G6784). Estas células se mantuvieron en condiciones de 5% de CO₂ a 37°C. Se pasaban cuando alcanzaban la subconfluencia (70-80%) y se diluían 1:4, lo que equivale a 5×10000 células/cm² usando tripsina/EDTA al 0,25% de Fisher Scientific.

3.2 THLE2, TRANSFORMED HUMAN LIVER EPITHELIAL-2

Se trata de una línea celular con morfología epitelial que procede de un cultivo primario de hepatocitos procedente del lóbulo izquierdo de un adulto en el que no se encontraron evidencias de tumor. Esta línea celular se immortalizó mediante la infección de un virus que contiene fragmentos del antígeno SV40 T. El medio de cultivo empleado fue BEGM de la casa comercial Lonza; además es necesario suplementar este medio basal con unos aditivos (BPE (Bovine pituitary extract), insulina, hidrocortisona, ácido retinoico, transferrina, triyodotironina, epinefrina y hEGF (Human epitelial growth factor)), 70ng/mL de fosfoetanolamina (Sigma-Aldrich P0503), un 10% de suero bovino fetal (FBS, *Fetal bovine serum*) y un 1% de GPS (200Mm L-Glutamina, 200 U/mL de penicilina y 10mg/mL de estreptomycin) de Sigma-Aldrich (G6784). Estas células se mantuvieron en condiciones de 5% de CO₂ a 37°C. Se pasaban cuando alcanzaban la subconfluencia (70-80%) y se diluían 1:4, lo que equivale a 5×10000 células/cm² usando tripsina/EDTA al 0,25%. Para sembrar estas células necesitamos hacer un tratamiento previo en las placas para conseguir una mejor adherencia. Se trata de aplicar un *precoat* formado por una mezcla de 0,01 mg/mL de fibronectina (Gibco, 33010-018), 0,03 mg/mL de *collagen* type I (Santa Cruz biotechnology sc-136157) y 0,01 mg/mL *bovine serum albumin* (Sigma-Aldrich A4503) disuelto en medio basal.

El mantenimiento, congelación/descongelación y contaje se hicieron según procedimientos estándar de cultivo celular.

3.3 TRATAMIENTOS CELULARES

3.3.1 Transfecciones transitorias

Para el estudio del efecto metabólico de p63 en hepatocitos utilizamos dos tipos de aproximaciones: sobreexpresión con plásmidos e inhibición con un ARN interferente (siRNA, *small interfering RNA*).

Plásmido/siRNA	Casa comercial y número de referencia	µg/pocillo
pTAp63	27008, Addgene	2,5
ΔNp63	26979, Addgene	2,5
pControl	pcDNA 3.1 (+/-); Juan Zalvide	2,5
siTAp63 ON-TARGETplus	C7-000112, Dharmacon	5µM
siIKKβ ON-TARGETplus-SMARTpool	L-003503-00-0005, Dharmacon	5µM
siControl	D-001810-10-05, Dharmacon	5µM

Tabla 11. Lista de plásmidos y siRNAs utilizados en las transfecciones transitorias.

En el caso de la sobreexpresión de p63, utilizamos Lipofectamina 2000 (LifeTechnologies, 11668-019) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Sembramos 1.5×10^5 células en placas de 6 pocillos y a las 24 horas se lipofectaron con los plásmidos correspondientes, un plásmido vacío como control y los plásmidos para las isoformas de p63 TAp63 y ΔNp63. 24 horas después de la transfección se recogieron los extractos para el estudio de la expresión génica, proteica o bien para realizar inmunofluorescencias.

En el caso de la inhibición de p63, adquirimos un único siRNA de la casa comercial Dharmacon cuya referencia se indica en la tabla 11. La secuencia de nucleótidos de la cadena “sense” es la siguiente: GAGGUUUUCCAGCAUAUCUUU. En el caso del silenciamiento de IKKβ, se adquirió un siRNA también de la casa comercial Dharmacon (tabla 11); en este caso se obtuvo una mezcla de 4 secuencias diferente: AUGAAUGCCUCUCGACUUA; GAAGAGGUGGUGAGCUUAA; GAGCUGUACAGGAGACUAA y CCGAUAAGCCUGCCACUCA. Para la transfección utilizamos DharmaFECT (Dharmacon, T-2001-03) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se sembraron 1.5×10^5 células en placas de 6 pocillos y tras 24 horas en cultivo se transfectaron con los correspondientes ARNs de interferencia. Tras 8 horas, cambiamos el medio de cultivo y al cabo de otras 8 horas recogemos los extractos para el estudio de la expresión génica, proteica o bien para realizar inmunofluorescencias.

Amplificación y purificación de plásmidos:

- **Cultivo bacteriano:** Para la amplificación de estos plásmidos se transformaron bacterias de la cepa Escherichia coli (Subcloning efficiency DH5α: F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ Invitrogen). Para el crecimiento de las bacterias se utilizó el medio LB (Luria-

Broth) (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, cloruro sódico 1% en agua destilada). Para la selección de las bacterias transformantes, el medio se suplementó con antibiótico según la resistencia conferida por el plásmido (Ampicilina 100 µg/mL, Sigma-Aldrich). Las condiciones de crecimiento fueron 18h a 37°C y 225 revoluciones por minuto (rpm). Para la preparación de placas con medio sólido se utilizó el medio LB suplementado con agar bacteriológico a una concentración de 1,5%. En estas placas, que se utilizaron para la selección de transformantes, también se añadió el antibiótico correspondiente, después de esterilizar el medio y previamente a su solidificación. Tanto el medio líquido como las placas se prepararon en condiciones de esterilidad.

➤ **Obtención del ADN plasmídico:** la purificación de los plásmidos a partir del cultivo bacteriano en primer lugar se picaron colonias aisladas de las placas de LB, que se crecieron en un mini cultivo y luego se purificaron mediante la técnica denominada miniprep para comprobar en primer lugar su correcta secuencia.

1. Minipreps: Para la recuperación del DNA plasmídico a pequeña escala (minipreps) se utilizó el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir del midi cultivo se obtuvo un cultivo a mayor escala o midi cultivo que posteriormente se purificó mediante la técnica de midiprep:

2. Midipreps: El midi cultivo se realiza en 150 mL de LB suplementado con el antibiótico correspondiente durante 18 h a 37°C y 225 rpm. Para la recuperación del DNA plasmídico se utilizó el kit NucleoBond Xtra Midi EF (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

➤ **Cuantificación del ADN plasmídico:** Para cuantificar la concentración de los ácidos nucleicos se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), midiendo la absorbancia a 260 nm. La relación D.O. 260 nm /D.O. 280 nm permite estimar el grado de pureza de las muestras, siendo 1,8 el valor óptimo. También se comprobó la integridad del DNA plasmídico mediante gel de agarosa.

3.3.2 Tratamiento con ácido oleico:

Con el fin de inducir la acumulación de triglicéridos, una vez sembradas las células para iniciar el experimento, las tratamos con una disolución de ácido oleico (Sigma-Aldrich, O1383) 1mM unido a BSA libre de ácidos grasos (Capricorn, BSA-FAF-1U) en una proporción molar 2:1. En el caso de los controles tan solo tratamos con BSA. Para asegurarnos de obtener una acumulación adecuada de lípidos, mantuvimos a las células con el tratamiento en un incubador a 37°C con una concentración de CO₂ del 5% durante 12 horas. Para comprobar que las células acumularon lípidos, realizamos una inmunofluorescencia con BODIPY (493/503) (Invitrogen, D3922), un fluoróforo que por su naturaleza no polar, fluorescencia y absorción de longitud de onda larga, se puede utilizar para la tinción de lípidos.

3.3.3 Inmunofluorescencia con Bodipy:

Se sembraron 1.5x10⁴ células en placas de 24 pocillos en la que previamente hemos colocado cubreobjetos de 12mm de diámetro. Para la realización de la inmunofluorescencia realizamos el siguiente protocolo:

- ✓ Aspiramos el medio de cultivo y lavamos 3 veces con PBS $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$.
- ✓ Fijamos las células con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT, Room Temperature). Al cabo de ese tiempo lavamos tres veces con PBS.
- ✓ Incubamos durante 40 minutos las células con BODIPY 2mg/mL en un volumen final de 300 μL de medio de cultivo basal. Lavamos 3 veces con PBS.
- ✓ Para el montaje de los cubreobjetos utilizamos un medio acuoso con agentes para evitar la pérdida de fluorescencia, Fluoroshield Mounting Medium (Abcam, ab104135) con una dilución de DAPI (Sigma- Aldrich, D-9542) 1:1000.

3.3.4 Obtención de imágenes mediante microscopía confocal:

Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal (Confocal Microscopy Leica TCS SP5), con un objetivo APO 63X/1.32, utilizando como medio de transmisión aceite de inmersión (Immersol™ 518, Zeiss). Las imágenes se procesaron con el software LAS AR Lite (Leica). Las imágenes son combinaciones de secciones tomadas en el eje z con intervalos de 0,5 μm . Por último, utilizamos el Adobe Photoshop para cortar y montar las imágenes finales.

3.3.5 Estudio morfológico del del retículo endoplásmico²:

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de p63, hicimos un estudio de la fragmentación del retículo endoplasmático en células HepG2. Tras la transfección con el plásmido, se realizó una doble inmunofluorescencia con un marcador rojo de retículo endoplasmático, ER-Tracker™(587/615) (Invitrogen, E34250) y un anticuerpo anti-FLAG TAp63 para identificar las células transfectadas con TAp63. ER-Tracker penetra en la célula y es altamente selectivo para el retículo endoplasmático (RE); consta de glibenclamida que se une a los receptores de sulfonilurea de canales K^+ sensibles al ATP que son prominentes en el RE. Las imágenes se tomaron con microscopio confocal (explicado anteriormente). La cuantificación del número y áreas positivas para la tinción del retículo endoplasmático se realizó con el Image J 1.36 (National Institutes of Health, Bethesda, MD) del siguiente modo: se aplicó un umbral para los niveles de gris (40-225) de las imágenes proyectadas en z (mapa de píxeles que ofrece el programa); para cuantificar el número de áreas inmunoreactivas se eligió un tamaño superior a 5 pixel utilizando la función Analyze Particles de dicho software.

3.4 ESTUDIO DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS THLE2³

3.4.1 Estudio de la lipogenesis de novo:

Tras sembrar las células THLE2 para el experimento, se incubaron toda la noche (Overnight) en Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) suplementado con un 0,5% w/v BSA libre de ácidos grasos. Luego, se incubaron durante 4 horas con medio fresco suplementado con insulina 84nM y acetato 20 μM con una cantidad de 20 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de acetato [H^3] (Perkin Elmer)²⁵³. Tras la incubación, se hicieron dos lavados con PBS frío (pH 7,4) y se

² Estudio realizado en colaboración con el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba de la Dra. María del Mar Malagón.

³ Estudio realizado en colaboración con el grupo de investigación Liver and Lipids perteneciente al Departamento de Fisiología de la Universidad del País Vasco dirigido por la Dra. Patricia Aspichueta.

recogieron las células. Se separan los lípidos tanto de las células como del medio y se separan mediante cromatografía de capa fina²⁵⁴. Los diferentes tipos de lípidos se visualizaron mediante exposición al vapor de yodo, se seleccionaron las bandas correspondientes y se contabilizó la cantidad de marcaje radiactivo incorporado en los lípidos con un contador de centelleo. Los resultados se expresan en relación a la cantidad de proteína celular.

3.4.2 Estudio del recambio y secreción de triglicéridos:

Este estudio se realiza mediante un experimento denominado pulso-caza. Se incubaron las células durante 6 horas con EMEM bajo en glucosa y suplementado con un 0,5% (w/v) de BSA libre de ácidos grasos. Luego, se incubaron durante 4 horas con 0,4mM de oleico [H^3] ($5\mu Ci/placa$) y glicerol [C^{14}] ($0,55\mu Ci/placa$); esta incubación corresponde al pulso²⁵⁴. Tras esta incubación, lavamos durante 1 hora con DEMEM y las células se incubaron durante otras 4 horas; esta incubación corresponde a la caza. Se extrajeron los lípidos tanto de las células como del medio tras el pulso-caza y se separaron mediante cromatografía en capa fina. Se visualizaron mediante exposición a vapor de yodo y se seleccionaron las bandas correspondientes a los triglicéridos. Por último, se cuantificó la cantidad de radiactividad correspondiente al H^3 y C^{14} con un contador por centelleo. Los resultados se presentan como porcentaje del total de triglicéridos marcados (TG- H^3 y TG- C^{14}) secretados al medio.

3.4.3 Estudio de la oxidación de los ácidos grasos:

La tasa de oxidación se determinó mediante la medición de la cantidad de CO_2^{14} (oxidación completa) y la cantidad de C^{14} unido a metabolitos ácido-solubles (ASM) (oxidación incompleta) liberados al medio. Para ello, se incubaron las células overnight en medio bajo en glucosa; luego, se incubaron durante 4 horas con palmitato 0,2mM con $0,5\mu Ci/mL$ [^{14}C] (Perkin Elmer). El medio se recogió en un tubo con un filtro Whatman empapado con 0,1M NaOH en la tapa. Luego se añaden 500 μl de ácido perclórico 3M para liberar el CO_2 capturado en el papel de filtro. El medio acidificado se centrifugó a 21000g durante 10 minutos para eliminar posibles partículas. La radiactividad del CO_2 capturado por los filtros de papel y la radiactividad de los metabolitos ácido-solubles del medio, se midió mediante un contador de centelleo.

4 MUESTRAS HUMANAS

La población de estudio incluye a un grupo de pacientes adultos y obesos, $IMC \geq 35 Kg/m^2$ y en los que las biopsias hepáticas revelaron NAFLD. Los pacientes fueron sometidos a cirugía bariátrica en el Hospital Universitario de Salamanca. Como controles, incluimos a individuos con un $IMC < 35 Kg/m^2$ que se sometieron a colecistectomía laparoscópica para el tratamiento de cálculos biliares. Se excluyeron del estudio pacientes que hayan padecido enfermedades hepáticas relacionadas con el consumo de alcohol ($> 30g/ día$ en hombres y $> 20g/ día$ en mujeres), hepatitis C o B crónicas o si en laboratorio los datos histopatológicos revelan otras

causas de enfermedad hepática distinta a NAFLD. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca y todos los pacientes presentaron un informe de consentimiento escrito para someterse a una biopsia hepática bajo supervisión durante la cirugía.

Los datos recopilados incluyen información demográfica (edad, sexo y etnia), medidas antropométricas (IMC), historial sobre alcoholismo y tabaquismo y otras condiciones médicas o fármacos utilizados. Antes de la cirugía, se tomaron muestras de sangre del paciente en ayuno para realizar un análisis completo: bilirrubina total, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), colesterol total, HDL, LDL, TG, creatinina, glucosa y albúmina.

5 TÉCNICAS ANALÍTICAS

5.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL TEJIDO HEPÁTICO

Para entender la progresión de la enfermedad y el estado metabólico del animal, es crucial determinar el nivel de acumulación de lípidos en el hígado. Para ello realizamos tinciones histológicas que permiten visualizar la morfología y la distribución intracelular de las gotas lipídicas dentro de los tejidos. Una vez obtenidas las tinciones, se observaron y fotografiaron los cortes con un microscopio (Zeiss) utilizando los objetivos de 10, 20 y 40 aumentos.

✓ Oil red O: se trata de un colorante tipo diazol soluble en grasa que tiñe lípidos neutrales y colesterol ésteres, pero no membranas biológicas. Para ello, se cortaron en un criostato secciones de hígado congelados (8 μ m) y se colocaron en portaobjetos. Los portaobjetos se sumergieron en tinción Oil red O durante 10 minutos. Después se lavaron con H₂O destilada y se contratiñeron con hematoxilina Meyers durante 3 minutos.

✓ Hematoxilina/eosina: para esta tinción, el tejido fijado con la formalina se incluyó en parafina para ser seccionado en un micrótomo. Los cortes de parafina se trataron con xilol para eliminar los excesos de la misma. Después se pasaron los cortes por un proceso de rehidratación, consistente en alcoholes de concentración decreciente (100, 95 y 70°C). Tras un lavado con H₂O destilada, se sumergieron en hematoxilina (Bio Óptica) durante 10 minutos, se lavaron e inmediatamente se pasaron por un alcohol ácido. Tras el lavado, se sumergieron 30 segundos en eosina (Bio Óptica). Para deshidratar la muestra, se pasaron los cortes por los mismos alcoholes en graduación creciente y, antes de montar, se dejaron sumergidos 10 minutos en xilol. Los portaobjetos se montaron en medio de montaje acuoso. Esta técnica tiñe las estructuras celulares mostrando, de forma general, la estructura del tejido. La hematoxilina es de naturaleza catiónica (básica) por lo que tiñe de azul estructuras basófilas (ácidas) como los núcleos celulares. Por otro lado, la eosina es de naturaleza ácida, tiñendo de rosa estructuras de naturaleza básica, como el citoplasma.

- ✓ **Inmunohistoquímica (IHQ):** con esta técnica se pretende detectar en el propio tejido la presencia y localización de determinadas proteínas. En esta tesis se realizó la detección de TAp63 en muestras de hígado de pacientes. Las muestras de hígado de los pacientes en parafina se cortaron en secciones, se desparafinaron y se hidrataron. Posteriormente, el antígeno se desenmascaró usando tampón citrato pH 6.0 durante 20 minutos a 97°C. Después, las muestras se incubaron con el anticuerpo anti p63 (TA) purificado de BioLegend con una dilución 1:100 a 4°C durante la noche. A continuación, el procedimiento se realizó de acuerdo con los protocolos estándar con EnVision+ System HRP (Dako). Finalmente, las muestras se incubaron con sustrato Vector Vip (Vectorlabs).

5.2 DETECCIÓN DE METABOLITOS EN TEJIDO

5.2.1 Extracción de grasa hepática

Para la extracción de grasa hepática se pesaron 0,5g de hígado y se llevaron a un tubo de polipropileno de 2ml con una bola de acero y 500µL de una mezcla cloroformo/metanol (2:1 v/v). El tejido se homogenizó por acción mecánica en el *Tissue Lyser* (Quiagen) durante 3 minutos a 25 rpm. Tras homogenizar se mantuvieron en rotación orbital durante tres horas para facilitar la disolución de la grasa en el disolvente orgánico. Al finalizar la rotación, se añadieron 300µL de agua destilada y se centrifugaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez separadas las fases, descartamos la fase inorgánica superior y se pasó la fase orgánica a un nuevo tubo de polipropileno de 1,5mL para dejar que se evapore durante toda la noche en una campana de extracción de gases. El precipitado que se obtuvo tras la evaporación corresponde a la grasa extraída del tejido.

5.2.2 Determinación de triglicéridos en muestras de grasa hepáticas

La cuantificación de TG se realiza con un kit comercial (Spinreact). Se determina la concentración tras la evaporación de una parte de la fase orgánica, añadiendo el reactivo al precipitado e incubando 5 minutos a 37°C; durante ese tiempo se produce una reacción enzimática que produce una coloración roja. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra ensayada. La lectura de las muestras y de la recta patrón se realiza un espectrofotómetro a 505nm y se calcula la concentración de TG teniendo en cuenta el paso de tejido.

5.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo en extractos grasos y hepáticos, homogenizados en el *Tissue Lyser* (0,1 g en 1 mL tampón lisis) con un tampón de lisado específico para mediciones de actividad enzimática (Tabla 12). A continuación, se cuantificó la concentración proteica del extracto obtenido.

Tampón de lisis para actividad enzimática	
Tris-HCl pH 7,5	20 mM
EDTA	1 mM
Fluoruro Sódico	100 mM
Ditioneitol (DTT)	100 mM
Sacarosa	250 mM
Cocktail inhibidor proteasas (ROCHE)	1 pastilla/50 mL

Tabla 12. Composición del tampón de lisis para medir la actividad enzimática, en agua destinalda.

En esta tesis se midió la actividad enzimática de la ácido graso sintasa (FAS) en extractos de hígado de ratón. Consiste en la medición de la desaparición NADPH durante la reacción enzimática. El NADPH es el sustrato consumido en la reacción:



En una placa de 96 pocillos, se añaden 100 μL de proteína a una concentración de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por muestra y por duplicado. Se incorpora a cada muestra 200 μL de la solución NADPH/acetil-CoA (tabla 13) y se deja incubar durante 10 a 37 oC. Para comenzar la reacción se añaden 30 μL la solución malonil-CoA (tabla 14). La absorbancia se mide a 340 nm durante 20 minutos y se calcula el gradiente de la absorbancia a 340 nm (A340). La conversión del NADPH (en pmol) es $A_{340} \text{ nm} / (6,22 * 103) * 0,857$; siendo 0,857 la longitud de paso de la reacción en cm.

Solución de reacción NADPH/Acetil-CoA	
NAPDH	200 μM
Acetil-CoA	100 μM
Fosfato dipotásico	33 mM
Fosfato monopotásico	67 mM

Tabla 13. Composición solución de reacción NADPH/Acetil-CoA, en agua destinalda.

Solución de reacción malonil-CoA	
Malonil-CoA	600 μM
Fosfato dipotásico	33 mM
Fosfato monopotásico	67 mM

Tabla 14. Composición solución de reacción malonil-CoA, en agua destinalda.

5.4 DETECCIÓN DE METABOLITOS EN SUERO

Para la detección en suero de triglicéridos, colesterol, glucosa, transaminasas AST y ALT (Spinreact) y ácidos grasos libres (WAKO) se utilizaron kits comerciales específicos siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

5.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

El proceso para la determinación de los niveles de expresión génica se realiza a través de la medición de los niveles de ARNm presentes en una muestra de tejido congelado (-80°C). Se utiliza un método de extracción basado en el Trizol (Invitrogen), compuesto que contiene tiocinato de guanidinio para la degradación proteica y fenol-cloroformo para el aislamiento de ácidos nucleicos.

Es importante destacar que el H₂O que se utiliza en este protocolo debe ser pretratada a 37°C en agitación durante una hora con dietilpircarbonato 0,1% (DEPC). Posteriormente, para desactivar los restos del DEPC se autoclava la mezcla.

5.5.1 Extracción del ARN

Todo el proceso se realizó manteniendo las muestras en hielo con el fin de evitar la degradación de ARN.

Un pequeño fragmento de cada muestra de tejido congelado (-80°C) se homogenizó mecánicamente con 650µl de Trizol durante 3 minutos en un homogenizador (Tissue Lyser, Quiagen) con ayuda de una bola de acero añadida a cada tubo de polipropileno de 2ml. A continuación, se centrifuga 10 minutos a 13200 rpm y se pasa todo el homogenizado a un nuevo tubo de 2ml. A continuación, se procedió al aislamiento del ARN para lo cual se siguieron los siguientes pasos:

- ✓ Añadir 250 µl cloroformo y agitar vigorosamente.
- ✓ Dejar reposar las muestras 5 minutos a temperatura ambiente.
- ✓ Centrifugar a 4°C durante 15 minutos. Durante esta centrifuga se separará una interfase acuosa (ARN), una fase orgánica (lípidos y proteínas) y una fase donde se queda el ADN. Se separa cuidadosamente el ARN a un nuevo tubo.
- ✓ Añadir 3 volúmenes más de isopropanol para favorecer la precipitación del ARN, agitar vigorosamente y dejar 10 minutos a -20°C.
- ✓ Centrifugar durante 10 minutos a 4°C a 13200 rpm.

Una vez eliminado el sobrenadante, se lava el precipitado de ARN añadiendo 1ml de etanol al 70% (utilizando para la dilución agua DEPC), se agita y se vuelve a centrifugar durante 5 minutos a 13200 rpm a 4°C. Se descarta el etanol. Es necesario eliminar completamente el etanol, para lo cual, realizamos una última centrifuga de 1 minuto a la máxima velocidad para luego eliminar por completo el etanol con ayuda de una pipeta. Para finalizar, se resuspende el precipitado en agua DEPC (ARN de grasa: 40µl; ARN de hígado: 300 µl y ARN de hipotálamo: 30 µl) y se calienta a 60°C durante 3 minutos para facilitar su disolución con el agua DEPC.

5.5.2 Cuantificación del ARN

Para determinar la concentración y la pureza del ARN utilizamos un espectrofotómetro (NanoDrop 2000) que determina el cociente de la absorbancia del ARN (260 nm) y la de las proteínas (280 nm). Se considera una pureza aceptable la relación 260/280 entre 1,8 y 2.

Una vez determinada la concentración, se normalizan todas las muestras a una misma concentración: 0,01µg/ul en el caso de hígado e hipotálamo y 0,05µg/ul en el caso de la grasa. A partir de estas muestras realizaremos la retrotranscripción.

5.5.3 Retrotranscripción

La retrotranscripción consiste en una amplificación del ARN extraído en forma de ADN complementario. La reacción se realiza en un volumen final de 30µl con las siguientes proporciones:

Reactivo	Casa comercial	Volumen (μ l)
H ₂ O DEPC	--	3,58
Tampón de reversotranscripción (5X first strand buffer)	Invitrogen	6
Mezcla de dNTPs 100mM (dTTp, dCTp, dGTp, dATp)	Invitrogen	6
MgCl ₂ 50mM	Invitrogen	1,5
Cebadores aleatorios (Random primers 3 μ g/ μ l)	Invitrogen	0,17
Inhibidor de ARNasas (RNAsa OUT™ 40U/ μ l)	Invitrogen	0,25
Reverso transcriptasa (M-MLV 200U/ μ l)	Invitrogen	1
Muestra de ARN 10 μ l		

Tabla 15. Cantidad de reactivos para la reacción de reversotranscripción (RT).

La mezcla se incubaba en un termociclador con las siguientes condiciones: 25°C (10 minutos); 37°C (50 minutos) y 70°C (15 minutos).

5.5.4 PCR en tiempo real

Una vez obtenido el ADN complementario, se determinaron los niveles de ARNm de los genes de interés mediante PCR a tiempo real, en el equipo 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Los resultados se expresaron en términos relativos comparando nuestro gen de interés con un gen control.

La RT-PCR se basa en la habilidad de detectar el producto de PCR (amplicón) en cada ciclo, utilizando la fluorescencia. En esta tesis, se utilizaron distintos enfoques para detectar los productos de PCR:

✓ **SYBR Green:** esta técnica se basa en el empleo de un fluorocromo inespecífico capaz de unirse a la molécula de ADN de doble cadena. El complejo fluorocromo-ADN se excita con luz azul y emite luz verde. En cada ciclo de la PCR se generan más moléculas de ADN de doble cadena, generando más fluorescencia por lo que ésta aumenta de forma proporcional al producto de PCR. La mezcla de PCR para SYBR Green se muestra en la siguiente tabla; se calcula para un volumen final de 12 por cada pocillo.

Reactivo (casa comercial)	Cantidad (μ l)
H ₂ O	3,1
Master mix (Agilent)	6
Dye (1:500) (Agilent)	0,18
Cebador directo 10 μ M (EurofinsDNA)	0,36
Cebador inverso 10 μ M (EurofinsDNA)	0,36
Muestra ADNc 0,01 μ g/ μ l	2

Tabla 16. Cantidad de reactivos para la PCR tiempo real utilizando el método SYBR green.

El protocolo utilizado para la amplificación consistió en un paso inicial de 3 minutos a 95°C; 4 ciclos de 5 segundos a 95°C y 32 segundos a 60°C; a continuación, se añade la fase de disociación que consiste en 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C y 15

segundos a 95°C. Este proceso se realiza en un sistema de PCR tiempo real (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems).

✓ **Sondas Taqman:** esta técnica se basa en el empleo de sondas específicas unidas a dos fluorocromos: uno, denominado reporter, se encuentra unido de forma covalente en el extremo 5' de un oligonucleótido y el otro, un desactivador de fluorescencia (quencher) en el extremo 3'. El quencher inhibe la fluorescencia del reporter cuando es excitado por la fuente de luz del termociclador. Cada sonda específica hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo y el inverso. A medida que la Taq polimerasa sintetiza en sentido 5'-3', la actividad exonucleasa 5'-3' de esta misma enzima degrada la sonda quedando separado el fluoróforo del quencher y permitiendo así la emisión de la fluorescencia. La fluorescencia detectada es directamente proporcional a la cantidad de fluoróforo liberado y, por lo tanto, a la cantidad de ADN complementario de interés presente en el producto de PCR. La mezcla de PCR para este método se muestra en la siguiente tabla; se calcula para un volumen final de 12 por cada pocillo.

Reactivo (casa comercial)	Cantidad (µl)
H ₂ O	2,82
Master mix (Applied Biosystems)	6
Sonda Taqman® (EurofinsDNA)	0,36
Cebador directo 10µM (EurofinsDNA)	0,36
Cebado inverso 10µM (EurofinsDNA)	0,36
Muestra ADNc 0,01 µg/µl	2

Tabla 17. Cantidad de reactivos para la PCR tiempo real utilizando el método de sondas *Taqman*.

El protocolo utilizado para la amplificación consistió en 40 ciclos de 2 minutos a 50°C; 10 minutos a 95°C; 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C en un sistema de PCR tiempo real (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems).

Todas las muestras se analizaron por duplicado incluyendo un control negativo (sin muestra). En la tabla 16 se muestran las secuencias de los genes utilizados a lo largo de esta tesis.

Para determinar la concentración de ADN complementario en cada muestra se analiza el valor CT (número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente supere el umbral definido por los niveles de fondo o background). El valor CT es inversamente proporcional a la cantidad de ADN complementario.

NAME	5'3'	CEBADORES Y SONDAS
18S	Directo Reverso Sonda	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA GCT GGA ATT ACC GCG GCT GAC GGC AAG TCT GGT GCC AGC A
hHPRT	Directo Reverso	TTATGGACAGGACTGAACGTCTTG CCAGCAGGTCAGCAAAGAATT
mHPRT		Cebador comercial adquirido de la casa comercial Applied biosystems (Ref. Mm01545399_m1)
Arginase	Directo Reverso Sonda	TCC ACC CTG ACC TAT GTG TCA TT CCT GGT ACA TCT GGG AAC TTT CC ACA TCA ACA CTC CCC TGA CAA CCA GCT CT
F480		Cebador comercial adquirido de la casa comercial Applied biosystems (Ref. Mm00802529m1)
HsIKKβ	Directo Reverso Sonda	GAC ATT GCC TCT GCG CTT AGA TA CTT GCT GCA GGA CGA TGT TTT AAC AGA ATC ATC CAT CGG GAT CTA AAG CCA
MmIKKβ	Directo Reverso	TGCAGGACACTGTGAAGGAG CTGGCAGAGTGAGATGTCCA
IL6		Cebador comercial adquirido de la casa comercial Applied biosystems (Ref.Mm00446190m1)
LPL	Directo Reverso Sonda	GGGAAATGATGTGGCCAGATT CCCTAAGAGGTGGACGTTGTCT ACTGGATGGAGGAGGAGTTTAACTACCCCC
MAC2	Directo Reverso Sonda	CCA ACG CAA ACA GGA TTG TTC T CCT GCT TCG TGT TAC ACA CAA TG ATG TTG CCT TCC ACT TTA ACC CCC GC
MTTP1	Directo Reverso Sonda	CACCTGGCCACCACTGTTCT GGTGGTATATCCTGTTCAAGGTCTTC ATGTCTCCTTCATCACAGATGAGGTG
NOS2	Directo Reverso Sonda	TGA CGC TCG GAA CTG TAG CA TGA AGT CAT GTT TGC CGT CAC T CAA TGG CAA CAT CAG GTC GGC CA
p53		Cebador comercial adquirido de la casa comercial Applied biosystems (Ref.Mm01731287_m1)
p63		Cebador comercial adquirido de la casa comercial Applied biosystems (Ref.Hs00978343_m1)
PGC1α	Directo Reverso Sonda	CGATCACCATATTCAGGTCAAG CGATGTGTGCGGTGTCTGTAGT AGGTCCCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAAGA
PPARγ	Directo Reverso Sonda	CGTGCTGCGGTACAGCC CGCCAACAGCTTCTCCTTCTC ATGTCTCACAATGCCATCAGGTTTGGGC
SCARB1	Directo Reverso Sonda	CCG ACC CTG TGT TGT CAG AAG ATC CCA GTG ACC GGA TGG AT TGG TCT GAA CCC TAA CCC AAA GGA GCA T
TNFα		Cebador comercial adquirido de la casa comercial Applied biosystems (Ref. Mm99999068m1)
XBP1S		Cebador comercial adquirido de la casa comercial Applied biosystems (Ref. Mm99999068m1)
CPT1	Directo Reverso	ATC ATG TAT CGC CGC AAA CT ATC TGG TAG GAG CAC ATG GGC
ACADM	Directo Reverso	AGGTTTCAAGATCGCAATGG CTCCTTGGTGCTCCACTAGC
ACADL	Directo Reverso	GCATCAACATCGCAGAGAAA GGCTATGGCACCGATACT
FATP2	Directo Reverso	ATGCCGTGTCCGTCTTTTAC GACCTGTGGTTCCCGAAGTA

Tabla 18. Lista de cebadores y sondas utilizados para el análisis de expresión mediante PCR tiempo real.

5.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN MEDIANTE WESTERN BLOT

5.6.1 Extracción de proteína a partir de tejido y células

De las muestras de tejido conservadas a -80°C , se obtuvo una pequeña porción para su procesamiento. Durante todo el proceso las muestras se deben mantener en hielo para evitar la degradación de las proteínas. El tejido y el tampón de lisis se colocan junto con una bolita de acero en un tubo de polipropileno de 2 mL y se homogeniza en el Tissue Lyser durante 4 minutos a 25 rpm. El tampón de lisis (tabla 19) facilita, junto con la homogenización mecánica, la rotura del tejido y los componentes celulares disolviéndose las proteínas del tejido en el mismo.

Tampón de lisis	
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
EGTA	1 mM
EDTA	1 mM
Tritón X-100	1% vol/vol
Ortovanadato Sódico	1 mM
Fluoruro Sódico	50 mM
Pirofosfato Sódico	5 mM
Sacarosa	0,27 M
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	1 mM
Cocktail inhibidor proteasas (ROCHE)	1 pastilla/50 mL

Tabla 19. Componentes del tampón de lisis disuelto en agua destilada.

Tras la homogenización de las muestras, se centrifugan a 13200 rpm a 4°C durante 20 minutos. A continuación, el sobrenadante (extracto proteico) se pasa a un nuevo tubo descartando el precipitado (núcleos y restos celulares) y la posible capa superior de grasa. En el caso de las muestras de tejido adiposo e hígado graso, se deben realizar varias centrifugaciones sobre el extracto inicial para descartar la grasa.

Para la extracción de proteína a partir de un cultivo celular se realizó el siguiente protocolo:

- 1) Retirar el medio de cultivo de las células y lavar con PBS frío (4°C).
- 2) Situar las placas de cultivo en hielo y añadir tampón de lisis. Despegar las células mediante el uso de un scraper o rascador (BD Falcon) y recoger en un tubo de polipropileno de 1,5 mL.
- 3) Mantener en hielo 10 minutos, agitando cada 5 minutos.
- 4) Centrifugar durante 10 minutos a 13000 rpm a 4°C y llevar el sobrenadante a un nuevo tubo. Almacenar los extractos a -80°C o llevar a análisis.

5.6.2 Cuantificación de los extractos proteicos

Para cuantificar la cantidad de proteína contenida en el extracto, realizamos un método colorimétrico con la solución Bradford (Bio-rad Protein Assay Kit). Este método se basa en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos y aromáticos por lo que la unión de este colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm. La forma roja de este compuesto se

convierte en azul cuando se une con la proteína. Experimentalmente, realizamos una curva patrón de sero-albúmina bovina (BSA) con diluciones seriadas a partir de la máxima concentración (1 mg/mL). En el caso de las muestras, realizamos una dilución para poder realizar la cuantificación, 1:50 en el caso de hígado, 1:25 para la grasa e hipotálamo y en el caso de la proteína extraída a partir del cultivo celular de HepG2, 1:5 para la proteína extraída a partir del cultivo celular de THLE2. Todas las muestras se miden por duplicado junto con la recta patrón en un espectrofotómetro a 550 nm. Previamente, la mezcla de las muestras con el Bradford se incubaba durante 5 minutos a 37°C.

5.6.3 Preparación de las muestras para la electroforesis SDS-PAGE

Tras la cuantificación, debemos preparar las muestras junto con el tampón de carga (tampón de Laemmli, tabla 20). Este tampón permite dotar a todas las proteínas de carga negativa en proporción a su tamaño, gracias al dodecil-sulfato sódico (SDS) y además permite su desnaturalización gracias al β -mercaptoetanol, el cual elimina los puentes disulfuro. Todas las muestras deben tener la misma concentración final para que en el volumen de carga en la electroforesis (16 μ l) haya 20 μ g de proteína de hígado, 30 μ g de proteína de grasa, 12 μ g de proteína de hipotálamo y 5 μ g de proteína en los extractos proteicos obtenidos a partir de cultivo celular. Tras añadir el tampón de carga y siempre previamente a realizar la electroforesis, las muestras se deben calentar a 95°C durante 5 minutos para su completa desnaturalización.

Tampón Laemmli	
Tris-HCl pH 6,7	250 mM
Glicerol	50% vol/vol
SDS	10% peso/vol
β -Mercaptoetanol	5% vol/vol
Azul de bromofenol	0,0005 % peso/vol

Tabla 20. Componentes del tampón de Laemmli disuelto en agua destilada.

5.6.4 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis SDS-PAGE consiste en la separación de las proteínas por su peso molecular. Se incluyen las proteínas desnaturalizadas y con carga negativa en un gel de acrilamida-bisacrilamida (30% Acrilamida/ Bis 29:1, Bio-Rad). Al aplicar una corriente eléctrica, las proteínas migran a través del gel hacia el polo positivo, separándose en gradiente por su peso molecular de mayor a menor. La concentración de acrilamida-bisacrilamida determina el tamaño del poro de la malla formada por el gel y, por tanto, el grado de separación de las proteínas. El gel está formado por dos fracciones:

✓ Gel concentrador: se localiza en la parte superior sobre el que se incluye el peine para formar los pocillos y poder introducir la muestra. Este gel tiene un porcentaje de acrilamida-bisacrilamida del 5% y permite homogenizar la entrada de las proteínas en el gel separador (tabla 21).

✓ Gel separador: permite la separación de las proteínas por su peso molecular. El porcentaje de acrilamida-bisacrilamida varía en función del tamaño de las proteínas

que queramos estudiar. En nuestro caso, los porcentajes se encuentran entre el 8% y el 12% (tabla 22).

Gel concentrador 5%	
H ₂ O destilada	4,1 mL
30% Acrilamida/Bis	1 mL
Tris-HCl 1 M pH 6.8	0,75 mL
10% SDS	0,06 mL
10% persulfato amónico	0,06 mL
TEMED	0,006 mL

Tabla 21. Composición del gel SDS PAGE

Gel separador	8%	10%	12%
H ₂ O destilada	11,5 mL	9,9 mL	8,2 mL
30% Acrilamida/Bis	6,7 mL	8,3 mL	10 mL
Tris-HCl 1 M pH 6.8	6,3 mL	6,3 mL	6,3 mL
10% SDS	0,25 mL	0,25 mL	0,25 mL
10% persulfato amónico	0,25 mL	0,25 mL	0,25 mL
TEMED	0,015 mL	0,01 mL	0,01 mL

Tabla 22. Composición del gel SDS PAGE separador a porcentajes 8, 10 y 12.

Los geles se montan en una cubeta de electroforesis junto con el tampón de electroforesis (tabla 23) que permite la transmisión del voltaje. Se añaden las muestras y un marcador de peso molecular conocido (Bio-rad). Se conecta a una fuente de alimentación a un voltaje de entre 80-120 V.

Tampón de electroforesis	
Tris-HCl	200 mM
Glicina	20 mM
SDS	1% peso/vol

Tabla 23. Composición del tampón de electroforesis disuelto en agua destilada.

5.6.5 Transferencia semi-húmeda

Una vez que las proteínas se separaron en el SDS-PAGE, las proteínas contenidas en el gel se transfieren a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Bio-Rad) permitiendo que las proteínas queden fijadas e inmovilizadas. El proceso de transferencia del gel a la membrana es también dependiente de voltaje. Se realiza en un soporte horizontal donde se ponen en contacto gel y membrana acotados por papel absorbente empapado en tampón de transferencia (tabla 24) que favorece la transmisión de la corriente durante el proceso. Se realiza a amperaje constante $0,8 \text{ mA/cm}^2$ durante una hora y 40 minutos.

Tampón de transferencia	
Tris-HCl	40 mM
Glicina	40 mM
SDS	0,36% peso/vol
Metanol	20% vol/vol

Tabla 24. Composición del tampón de transferencia disuelto en agua destilada

Tampón de lavado (TBS-T)	
Tris-HCl	20 mM
NaCl	146 mM
Tween-20	0,1% vol/vol

Tabla 25. Composición del tampón de lavado disuelto en agua destilada

5.6.6 Inmunodetección

✓ *Bloqueo de la membrana*: este proceso consiste en incubar la membrana durante una hora a temperatura ambiente en agitación con una solución de BSA o leche en polvo al 5% disuelto en tampón de lavado (TBS-T, tabla 23). Se trata de impedir la unión de proteínas a la membrana en lugares que hayan quedado libres tras la transferencia. De no realizarse este paso, el anticuerpo, podrá unirse a dichos lugares y dificultar así la detección del complejo antígeno-anticuerpo deseada dando lugar a inespecificidades y ruido de fondo. Con dichas soluciones proteicas, se rellenan los sitios libres y los anticuerpos específicos no se unirán a ellos ya que no encontrará la proteína que busca.

✓ *Anticuerpo primario*: tras el bloqueo de la membrana se incuba con el anticuerpo específico contra la proteína de estudio (tabla 26). El anticuerpo se diluye según las instrucciones del fabricante (1:5000/1:1000) en TBS-T al 3% y se deja incubar en agitación una hora a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C. Tras la incubación, se retira el anticuerpo y se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS-T.

✓ *Anticuerpo secundario*: para detectar la presencia de la proteína y amplificar la señal del anticuerpo primario, se incuba la membrana con un anticuerpo secundario asociado a peroxidasa que reconoce la parte constante del primario. Se diluye en una solución de incubación a una concentración 1:5000. El tipo de secundario utilizado vendrá determinado por el tipo de huésped en el que se generó el anticuerpo primario.

✓ *Quimioluminiscencia*: para detectar el anticuerpo secundario, se incuba la membrana con el sustrato de la peroxidasa y un potenciador de la quimioluminiscencia (Pierce® ECL western blot substrate, Thermo Scientific) incubándose 1 minuto en oscuridad. Inmediatamente después, para detectar la luz emitida resultante de la reacción del sustrato con la peroxidasa, se coloca la membrana en un casete de autorradiografía y se expone a una película fotográfica (Fujifilm). Tras el revelado a distintos tiempos utilizando líquidos de revelado y fijado en una sala oscura, se observa el resultado de la interacción de los anticuerpos con la proteína de la muestra.

✓ *Análisis de resultados*: para analizar los datos, se digitalizan las imágenes de las placas fotográficas mediante un escáner de alta resolución. Para determinar la cantidad relativa de proteína de cada muestra, se utiliza el programa informático ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>; National Institutes of Health), que detecta la cantidad de píxeles de la imagen de la proteína en todas las muestras de una misma placa radiográfica. El área de medición debe ser igual para todas las muestras. Estos valores se relativizan respecto al control constitutivo (β -actina, GAPDH), que debe ser detectada por cada gel de electroforesis. El valor final es relativo respecto al grupo control de cada experimento.

Proteína diana	Nombre del anticuerpo	Casa comercial/número de catálogo	Monoclonal/ polyclonal	Dilución
Fatty acid synthase	FAS (H-300)	Santa Cruz Biotechnology; sc-20140	Rabbit polyclonal	1:1000
Apolipoproteina B	ApoB	Abcam; ab2037	Rabbit polyclonal	1:5000
BAX	BAX	Cell Signaling; 2772	Rabbit polyclonal	1:1000
c-Jun N terminal kinases 1/3	JNK 1/3 (C-17)	Santa Cruz Biotechnology; sc-474	Rabbit polyclonal	1:1000
phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (81E11)	phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (81E11)	Cell Signaling; 4668	Rabbit monoclonal	1:1000
Anti-IRE 1	IRE 1	Abcam; ab-37073	Rabbit polyclonal	1:1000
IRE 1 alpha phospho-specific [ser 724]	phospho-IRE 1-alpha [ser 724]	Novus Biologicals; NB100-2323	Rabbit polyclonal	1:1000
X-box binding protein-1	XBP1	Santa Cruz Biotechnology; sc-7160	Rabbit polyclonal	1:1000
Phospho-PERK (Thr 981)	phospho-PERK	Santa Cruz Biotechnology; sc-32577	Rabbit polyclonal	1:1000
Eucariotic initiation complex subunit alpha	eiF2 α (FL-315)	Santa Cruz Biotechnology; sc-11386	Rabbit polyclonal	1:1000
phospho-eiF2 α	phospho-eiF2 α (Ser 52)	Santa Cruz Biotechnology; sc-101670	Rabbit polyclonal	1:1000
Caspase-3	Caspase-3 (8G10)	Cell Signaling; 9665	Rabbit monoclonal	1:1000
Cleaved caspase 3	Cleaved caspase-3 (Asp 175) (5A1E)	Cell Signaling; 9664	Rabbit monoclonal	1:1000
Caspase 7	Caspase 7	Cell Signaling; 9492	Rabbit polyclonal	1:1000
Cleaved caspase 7	Cleaved caspase 7 (Asp 198)	Cell Signaling; 9491	Rabbit polyclonal	1:1000
TAp63 α	p63 (TA) clone 6189	Biologend; 618902	Rabbit polyclona.	1:1000
Δ Np63 α	p63 (Δ N) clone 6190	Biologend; 619002	Rabbit polyclona.	1:1000
p63 (H-129)	p63	Santa Cruz Biotechnology; sc-11386	Rabbit polyclonal.	1:1000
Anti-p73 [EP436Y]	P73	Abcam; ab-40658	Rabbit monoclonal	1:1000
Anti-SHC (phosphor S36) [6E10]	p66shc	Abcam; ab-54518	Mouse monoclonal	1:1000
p21 (C19)	p21	Santa Cruz Biotechnology; sc-397	Rabbit polyclonal	1:1000
I κ B kinases α and β	Phosphor-IK α / β (Ser180/Ser181)-R	Santa Cruz Biotechnology; sc-23470-R	Rabbit polyclonal	1:1000
Anti IKK β (phosphor Y188)	Phospho IKK β	Abcam; ab-194519	Rabbit polyclonal	1:1000

Anti-IKK β [EPR6043]	IKK β	Abcam; ab-124957	Rabbit monoclonal	1:1000
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	GAPDH (6C5)	Merck Millipore; CB1001	Mouse monoclonal	1:5000
Transferrin (I-20)	Transferrin	Santa Cruz, CA, USA; sc-22597	Rabbit polyclonal	1:5000
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Anticuerpo secundario	DAKO; P0260	monoclonal	1:5000
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Anticuerpo secundario	DAKO; P0448	monoclonal	1:5000
GFP	GFP	Living Colors 632381	Rabbit monoclonal	1:10000

Tabla 26. Lista de anticuerpos utilizados para la inmunodetección por *western blot*.

6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos tras los procedimientos experimentales in vivo e in vitro, se presentan como la media de los grupos \pm la desviación típica. El tamaño muestral de las poblaciones de cada experimento se detalla en los pies de figura de los resultados. Para el análisis, se excluyeron muestras y/o animales cuyo valor se desviaba ± 2 veces la desviación estándar²⁵⁵, o cuando se observa un comportamiento inadecuado durante el procedimiento experimental. En todos los análisis, se considera una diferencia estadísticamente significativa a partir de la probabilidad $p \leq 0,05$.

Antes de realizar el análisis estadístico, se realiza un test de normalidad. Se utiliza el test Shapiro-Wilks para un conjunto de muestras de $n \leq 20$ y ≥ 7 , y el test Kolmogorov-Smirnov cuando el $n \leq 6$ ^{256,257}. Cuando las poblaciones analizadas muestran una distribución normal se realizan test estadísticos paramétricos y cuando no pasan el test de normalidad, se realizan test estadísticos no paramétricos.

Test paramétricos

Se realizan sobre aquellos experimentos cuyos grupos experimentales sigan una distribución Gaussiana (normal).

- A.** Anova de una vía: determina si hay diferencia entre las medias de tres o más poblaciones que siguen una distribución normal y son independientes entre sí. Una vez realizado el test, en caso de aceptar la hipótesis alternativa que indica que sí hay diferencias entre las medias, es necesario realizar un test a posteriori para comprobar qué medias son las que causan significación. Existen varios test que se pueden realizar: uno de ellos es el Tukey test que compara dos medias simples cada vez y ejecuta todas las posibles comparaciones; el Dunnett test se realiza cuando se comparan todas las medias con el grupo control, por lo que no es un procedimiento tan exhaustivo y por último, la corrección o test de Bonferroni que es el procedimiento más potente; se recomienda su uso cuando se realizan comparaciones entre más de tres grupos experimentales²⁵⁸. A lo largo de esta tesis realizamos test a posteriori de Bonferroni y Tukey.

- B.** T-test: compara las medias de dos poblaciones desapareadas asumiendo que siguen una distribución normal. Es un test robusto, puesto que es capaz de comparar poblaciones con un $n \leq 5$ ^{259,260}. En un contraste de hipótesis bilateral (2 colas), se estudia la desigualdad entre las medias, siendo la región crítica del estadístico ambas regiones correspondientes a la cola inferior y superior de la distribución. En un contraste unilateral (1 cola) la desigualdad en la hipótesis señala una sola dirección. A lo largo de esta tesis se utilizó t-test de una y de dos colas. Cuando estudiamos variables de las cuales no conocemos su efecto o no existe una evidencia previa, realizamos t-test de dos colas; sin embargo, en el momento en el que trabajamos sobre una premisa ya evaluada, realizamos t-test de una cola. El uso de una cola ofrece un test estadístico más robusto ya que aumenta la sensibilidad para detectar efectos fisiológicos²⁶¹.

Test no paramétricos

Se realian sobre aquellos experimentos cuyos grupos experimentales no siguen una distribución Gaussiana (normal).

- A.** Test Kruskal-Wallis: se utiliza para realizar comparaciones entre múltiples poblaciones que no siguen una distribución normal. Como test a posteriori se utiliza el test de Dunn para determinar entre qué poblaciones existe la significancia^{262,263}.
- B.** Test Mann-Whitney: compara dos poblaciones, de las cuales alguna no sigue una distribución normal²⁶⁴.

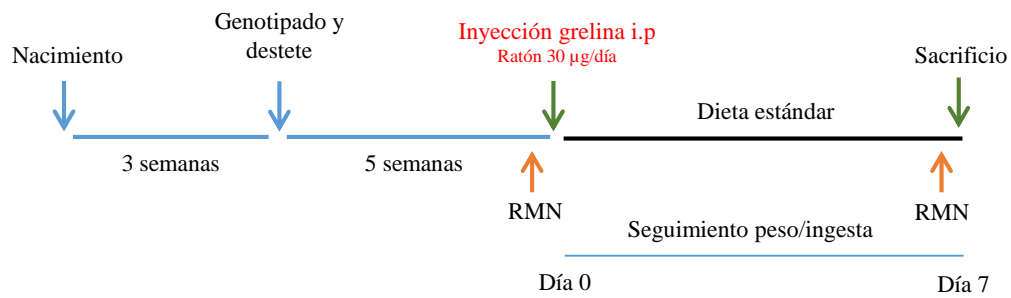
Correlaciones entre variables

En los estudios de humanos se analizaron las correlaciones entre los niveles de TAp63 y diferentes variables mediante el coeficiente de correlación de Pearson (si los datos siguen una distribución normal) o el coeficiente de correlación de Spearman (si los datos no siguen una distribución normal) (r). Para evaluar el grado de asociación entre ambas variables se realizó un test chi-cuadrado (χ^2). Este test contrasta dos hipótesis, una hipótesis nula o hipótesis de independencia de las variables (H_0) y una hipótesis alternativa o hipótesis de asociación de las variables (H_1). A mayor valor del estadístico χ^2 , mayor es la diferencia entre los valores observados y teóricos, en consecuencia, mayor es el grado de asociación entre las variables (H_1 verdadera).

7 DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1 ADMINISTRACIÓN CRÓNICA PERIFÉRICA DE GHRELINA

Con el fin de estudiar los efectos periféricos de la administración crónica de ghrelina, se inyectó de forma intraperitoneal ghrelina a ratones WT y KO para el gen p53.

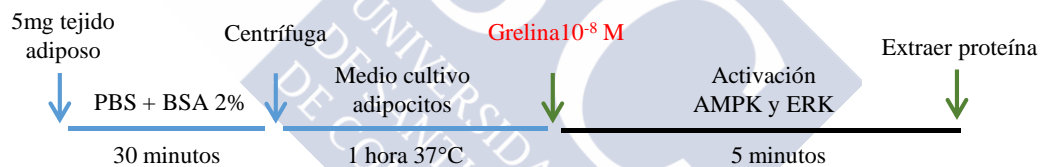


Los grupos experimentales fueron los siguientes:

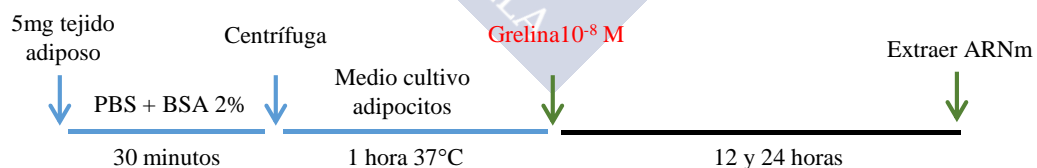
- ✓ Ratones p53 WT + vehículo (suero salino) intraperitoneal
- ✓ Ratones p53 WT + ghrelina (30µg/día) intraperitoneal
- ✓ Ratones p53 KO + vehículo (suero salino) intraperitoneal
- ✓ Ratones p53 KO + ghrelina (30µg/día) intraperitoneal

7.2 EFECTOS DE LA GHRELINA SOBRE EXPLANTES DE TEJIDO ADIPOSO

Para comprobar si la ghrelina tiene un efecto directo sobre el tejido adiposo, realizamos un experimento con explantes de tejido adiposo gonadal. Este experimento fue realizado en colaboración con el departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba de la Dra. María del Mar Malagón. Se llevaron a cabo dos experimentos. En primer lugar, quisimos ver la activación de las proteínas AMPK y ERK:

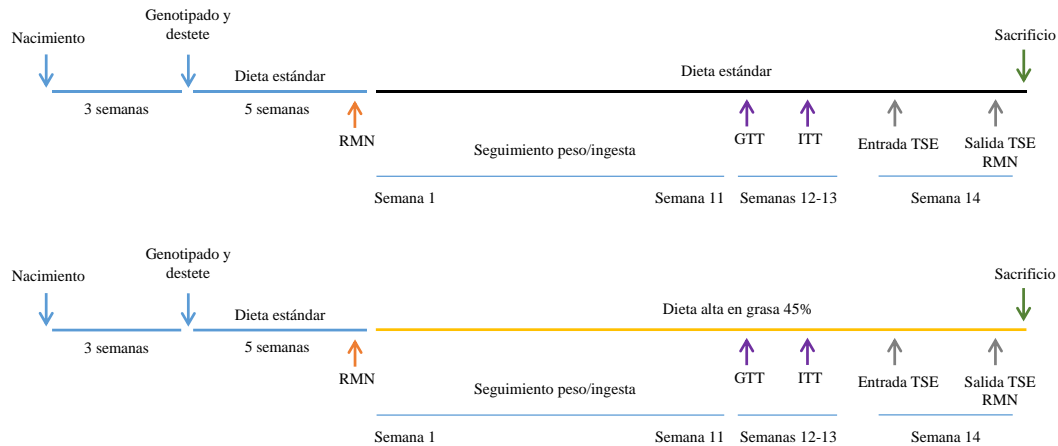


En una segunda aproximación, quisimos estudiar la expresión génica, para lo cual se incubaron durante más tiempo los adipocitos con la ghrelina;



7.3 FENOTIPADO METABÓLICO DE RATONES p53 KO EN DIETA ESTÁNDAR Y ALTA EN GRASA

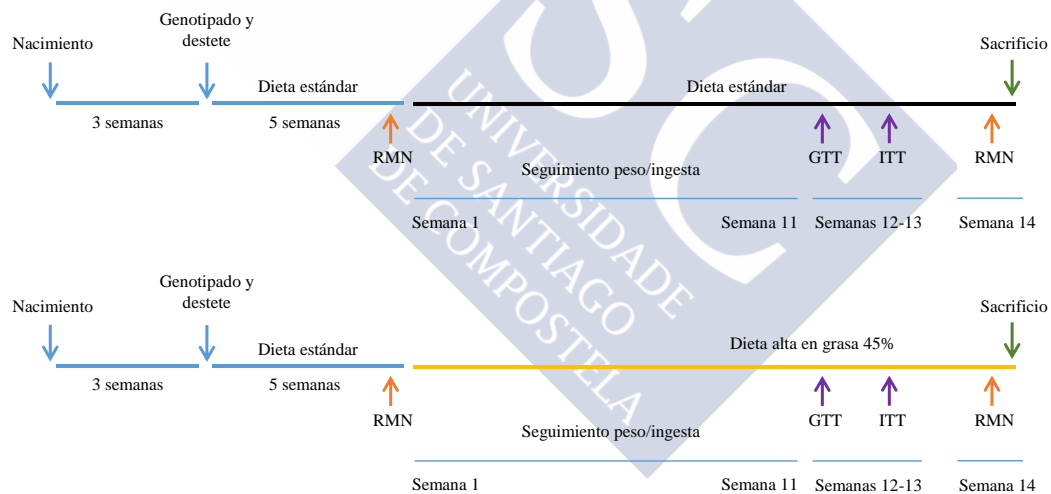
Para estudiar si la ausencia de p53 en ratones tiene efectos en el metabolismo, realizamos un seguimiento de peso e ingesta, test de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a insulina. Para su fenotipado metabólico, los ratones se metieron en un sistema de calorimetría indirecta (TSE) durante dos días. La medida de composición corporal se realizó al inicio del experimento y al finalizar, al salir del TSE. Realizamos el mismo estudio en ratones macho alimentados con dieta estándar y con dieta alta en grasa (HFD):



Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- ✓ Ratones machos p53 WT dieta estándar
- ✓ Ratones machos p53 KO dieta estándar
- ✓ Ratones machos p53 WT dieta (HFD 45% grasa)
- ✓ Ratones machos p53 ko dieta (HFD45% grasa)

También quisimos comprobar si la falta de p53 afectaba al metabolismo de las hembras:



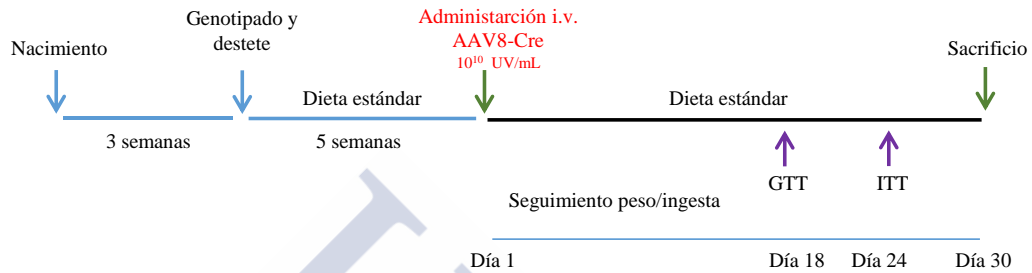
Grupos experimentales:

- ✓ Ratones hembra p53 WT dieta estándar
- ✓ Ratones hembra p53 KO dieta estándar
- ✓ Ratones hembra p53 WT dieta (HFD 45% grasa)
- ✓ Ratones hembra p53 ko dieta (HFD45% grasa).

7.4 DISMINUCIÓN HEPÁTICA DE LOS NIVELES DE P53

Para estudiar de forma más específica los efectos de la falta de p53 exclusivamente en el hígado, utilizamos ratones flox para el gen p53. Administramos a través de la vena de la cola un virus adenoasociado que codifica para la recombinasa Cre (AAV8-Cre, Signagen) (10^{10}

UV/mL) y su control AAV8-GFP. De esta manera, al aumentar la expresión de la recombinasa Cre, se reducirán los niveles de p53 en el hígado. La especificidad de la técnica se demuestra por una mayor infección en el hígado con respecto a otros órganos²⁶⁵⁻²⁶⁷ Se sabe que, por su naturaleza, su efecto es permanente en el tiempo (años) y tal y como hemos comprobado en esta tesis, los virus adenoasociados necesitan al menos dos semanas para infectar de manera significativa. Por lo tanto, en el siguiente experimento, esperamos un mes desde la inyección del virus para asegurar infección suficiente y además realizar pruebas de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina antes de sacrificar a los ratones. Este experimento se realiza en machos p53 flox de cría propia.

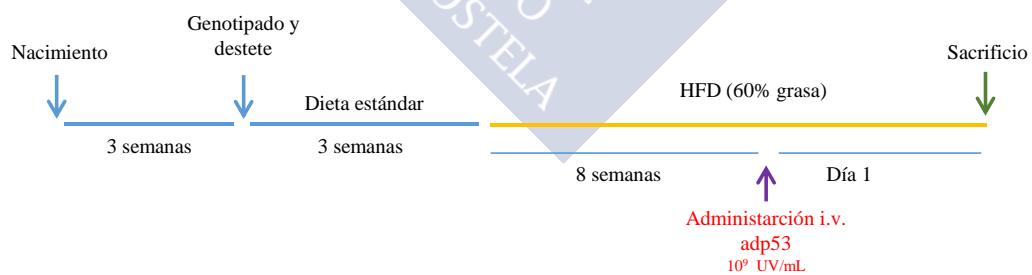


Grupos experimentales:

- ✓ Ratón p53 flox AAV8-GFP
- ✓ Ratón p53 flox AAV8-Cre

7.5 SOBREENPRESIÓN DE P53 EN RATONES P53 KO OBESOS

Para rescatar los niveles de p53 en ratones deficientes, inyectamos a través de la vena de la cola un vector adenoviral que sobreexpresa dicha proteína en el hígado (10^9 UV/mL, Signagen). Debido a las características biológicas del adenovirus, la infección y la sobreexpresión del gen que porta es de acción inmediata y su efecto transitorio (7 días). Realizamos este experimento en ratones macho p53 WT y KO de cría propia.

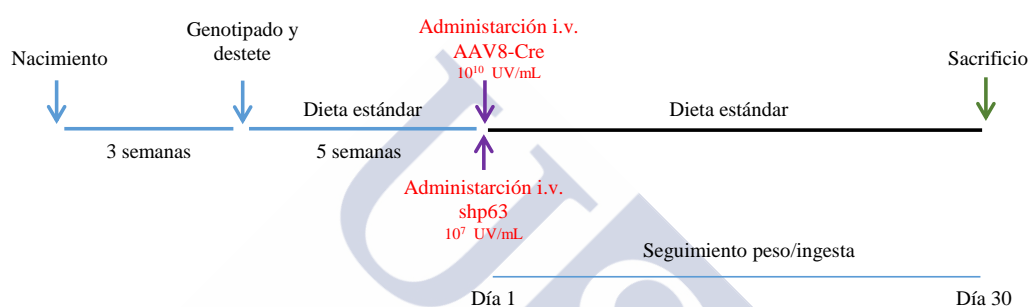


Grupos experimentales:

- ✓ Ratón p53 WT + adGFP
- ✓ Ratón p53 WT + adp53
- ✓ Ratón p53 KO + adGFP
- ✓ Ratón p53 KO + adp53

7.6 INHIBICIÓN DE P63 EN RATONES P53 FLOX

A lo largo de la tesis comprobamos que en ratones obesos los niveles de p63 se encuentran elevados y además, en los modelos donde manipulamos genéticamente p53, p63 varía de forma paralela. Diseñamos un experimento donde modificamos simultáneamente los niveles hepáticos de ambos genes. Como ya hemos visto, para disminuir p53, inyectamos a través de la vena de la cola un virus adenoasociado (AAV8-Cre). Para el silenciamiento de p63 inyectamos a través de la vena de la cola un vector lentiviral (10^7 UV/mL, Dharmacon) con un shRNA para inhibir la traducción del ARNm de p63. En el grupo control se administra la misma cantidad de un lentivirus turbo-GFP. Debido a la naturaleza del virus, el efecto de la inhibición no aparece hasta 3 semanas después de la inyección, pero su efecto es permanente en el tiempo. Con el fin de unificar tiempos, dejamos actuar tanto al AAV como al lentivirus durante un mes. Realizamos este experimento en ratones macho p53 flox de cría propia.

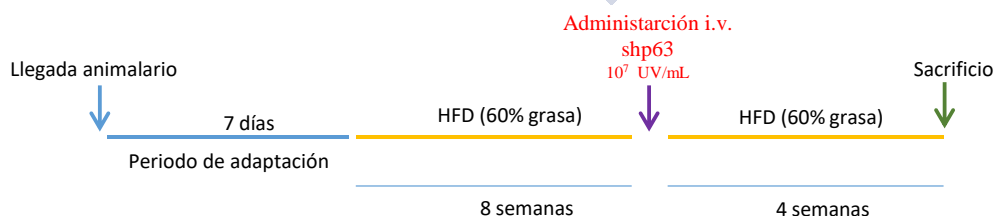


Grupos experimentales:

- ✓ Ratón p53 flox AAV8 – Cre + turbo-GFP
- ✓ Ratón p53 flox AAV8 – Cre + shp63

7.7 SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE P63 EN RATONES OBESOS

Como en el experimento anterior, para el silenciamiento de p63 utilizamos un vector lentiviral con un shRNA para inhibir la síntesis de ARNm de p63. Como control utilizamos turbo-GFP. Inyectamos los lentivirus a través de la vena de la cola (10^7 UV/mL, Dharmacon). Realizamos este experimento en ratones macho de la cepa C57BL6 (6 semanas de edad) procedentes del animalario central de la Universidad de Santiago de Compostela.

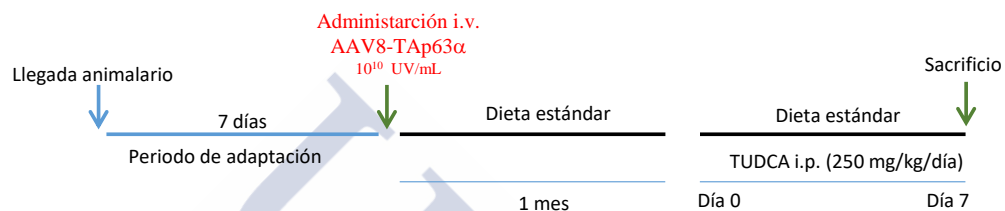


Grupos experimentales:

- ✓ Ratón obeso + turbo-GFP
- ✓ Ratón obeso + shp63

7.8 SOBREEXPRESIÓN DE TAp63 α E INHIBICIÓN DEL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

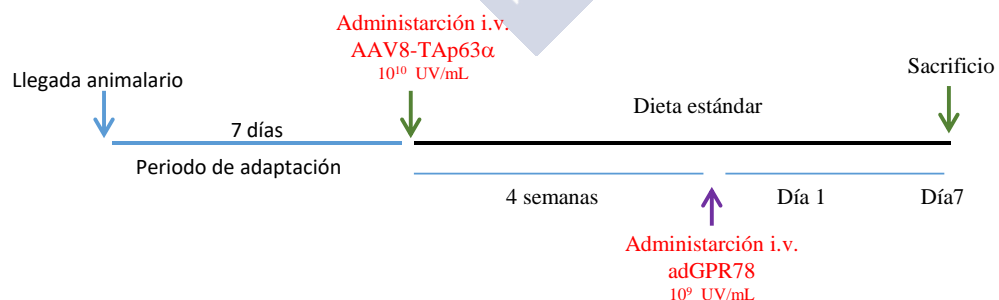
Para la sobreexpresión de TAp63 α , utilizamos un virus adenoasociado (AAV8 - TAp63 α) (10^{10} UV/mL, Signagen) inyectado a través de la vena de la cola, junto con su control (AAV8-GFP). Tras un mes de infección, iniciamos un tratamiento con una chaperona química, el ácido tauroso-deoxicólico (TUDCA, Millipore) con el fin de reducir el estrés de retículo endoplasmático. Este tratamiento se administra de forma intraperitoneal diariamente durante 7 días cada 12 horas con una dosis de 250mg/Kg/día. El vehículo administrado al grupo control del TUDCA, es suero salino. Este experimento se realiza en ratones macho de la cepa C57BL6 (8 semanas de edad) procedentes del animalario central de la Universidad de Santiago de Compostela.



Grupos experimentales:

- ✓ AAV8 - GFP + vehículo
- ✓ AAV8 - GFP + TUDCA
- ✓ AAV8 - TAp63 α + vehículo
- ✓ AAV8 - TAp63 α + TUDCA

Realizamos una segunda aproximación para reducir el estrés de retículo endoplasmático tras realizar la sobreexpresión de TAp63 α . En esta ocasión, a través de la manipulación genética, inyectando a través de la vena de la cola un adenovirus que sobreexpresa la chaperona GPR78 (10^8 UV/ML, ViraQuest) y su control GFP. Este experimento se llevó a cabo en ratones macho de la cepa C57BL6 (8 semanas de edad) procedentes del animalario central de la Universidad de Santiago de Compostela.

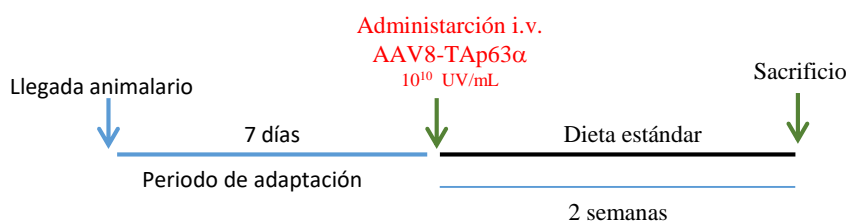


Se generan los siguientes grupos experimentales:

- ✓ AAV8 - GFP + adGFP
- ✓ AAV8 - GFP + adGPR78
- ✓ AAV8 - TAp63 α + adGFP
- ✓ AAV8 - TAp63 α + adGPR78

7.9 SOBREEXPRESIÓN DE TAp63 α DURANTE 2 SEMANAS

Para sobreexpresar TAp63 α utilizamos un virus adenoasociado serotipo 8 junto con el control GFP. Inyectamos los AAV a través de la vena de la cola para y esperamos dos semanas de infección. Realizamos este experimento en ratones macho de la cepa C57BL6.

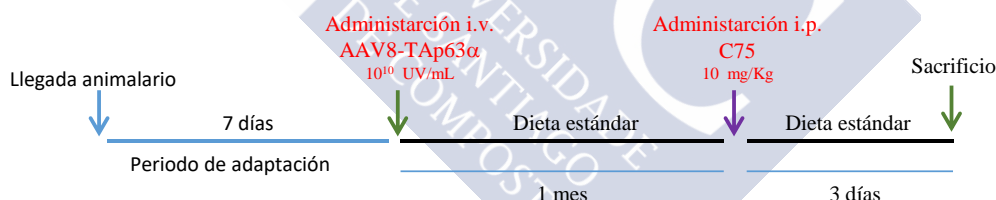


Grupos experimentales

- ✓ AA8-GFP
- ✓ AAV8-TAp63 α

7.10 ADMINISTRACIÓN DE C75 EN RATONES EN LOS QUE SE SOBREEXPRESA TAp63 α

En primer lugar, administramos un virus adenoasociado para incrementar la expresión de TAp63 α en el hígado de los ratones. Para ello, administramos los AAV8 a través de la vena de la cola y tras un mes de infección, administramos vía intraperitoneal C75. Este compuesto inhibe de forma específica la actividad de la proteína ácido graso sintasa (FAS). Se administró durante tres días con una dosis de 10 mg/Kg de peso de ratón. El vehículo que inyectamos como control de este compuesto es una mezcla de suero salino con DMSO (1:50).



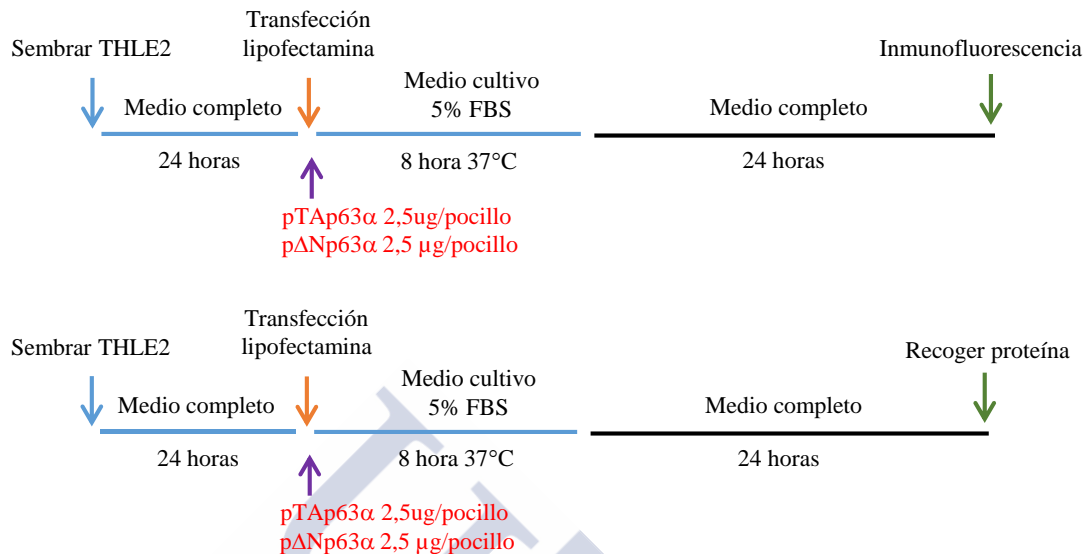
Grupos experimentales:

- ✓ AAV8-GFP + Vehículo
- ✓ AAV8-GFP + C75
- ✓ AAV8-TAp63 α + Vehículo
- ✓ AAV8-TAp63 α + C75

7.11 SOBREEXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS TAp63 α Y Δ Np63 α EN HEPATOCITOS HUMANOS

Realizamos este experimento en una línea comercial de hepatocitos humanos (THLE2, ATCC). Vamos a modificar la expresión TAp63 α y Δ Np63 α utilizando vectores de ADN contenidos en plásmidos (addgene). Para la transfección transitoria utilizamos Lipofectamina 2000 (Life Technologies) siguiendo los protocolos indicados por la casa comercial (2,5 μ g ADN/pocillo, utilizando placas de 6 pocillos) sembrando $1,5 \times 10^5$ células /pocillo. En el grupo control, transfectamos con un plásmido vacío. Como prueba de que la transfección ha sido

exitosa, realizaremos un western blot comprobando el aumento de la expresión de las proteínas TAp63 α y Δ Np63 α utilizando anticuerpos específicos. Realizamos dos experimentos en paralelo: uno para realizar una inmunofluorescencia y otro para recoger proteína.

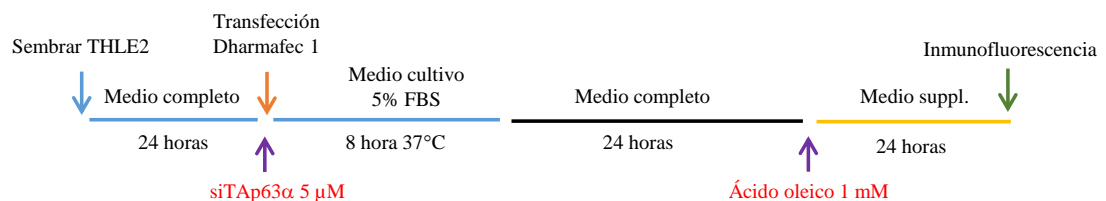


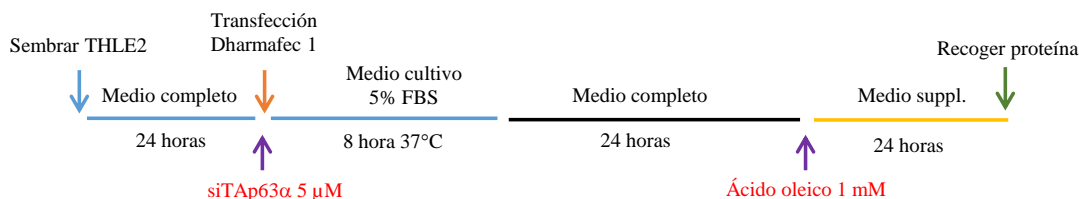
Los grupos experimentales son los siguientes:

- ✓ THLE2 pControl
- ✓ THLE2 pTAp63 α
- ✓ THLE2 p Δ Np63 α

7.12 SILENCIAMIENTO DE TAP63 α EN THLE2 TRATADAS CON ÁCIDO OLEICO

Para disminuir la expresión de TAp63 α en las células THLE2 utilizamos un pequeño ARN interferente (small interfering RNA, siRNA) y su control, un siRNA vacío. Para llevar a cabo la transfección, utilizamos DharmaFect 1 (Dharmacon) siguiendo las recomendaciones del fabricante (10 μ l siRNA a 5 μ M). Sembramos $1,5 \times 10^5$ células /pocillo en placas de 6 pocillos y, tras 24 horas de silenciamiento procedemos a tratar las células con ácido oleico (Sigma-Aldrich). Añadimos al medio de cultivo una dilución 1 mM de ácido oleico unido a albúmina bovina libre de ácidos grasos (Capricorn) en una proporción molar 2:1 durante 24 horas. El control para el ácido oleico se trata de células en las que el medio se suplementa tan solo con albúmina bovina (bovine serum albumin, BSA). En este caso, también realizamos dos experimentos en paralelo ya que, al cabo de las 24 horas, por un lado, vamos a realizar una inmunofluorescencia y por otro lado, recogeremos proteína.



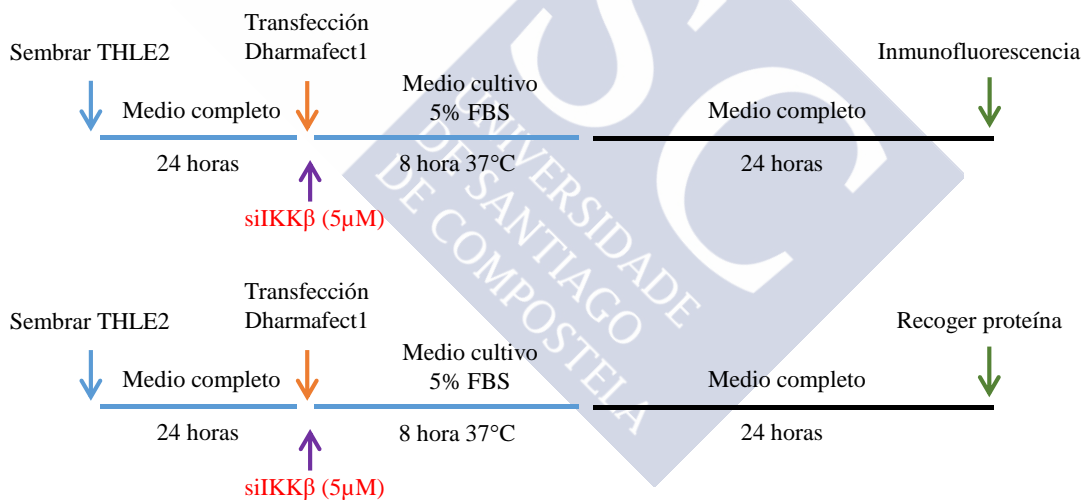


Se generan los siguientes grupos experimentales:

- ✓ siControl + BSA
- ✓ siControl + Ácido oleico
- ✓ siTAp63α + BSA
- ✓ siTAp63α + Ácido oleico

7.13 SILENCIAMIENTO DE IKKβ

Utilizamos un pequeño ARN interferente (siRNA) para reducir la expresión de IKKβ (Dharmacon) en células THLE2. Para llevar a cabo la transfección utilizamos el reactivo Daharmafect 1 (Dharmacon) siguiendo sus recomendaciones (10 μl de siRNA a 5 μM). Sembramos $1,5 \times 10^5$ células / pocillo en placas de 6 pocillos y, tras 24 horas de silenciamiento procedemos a recoger el extracto proteico.



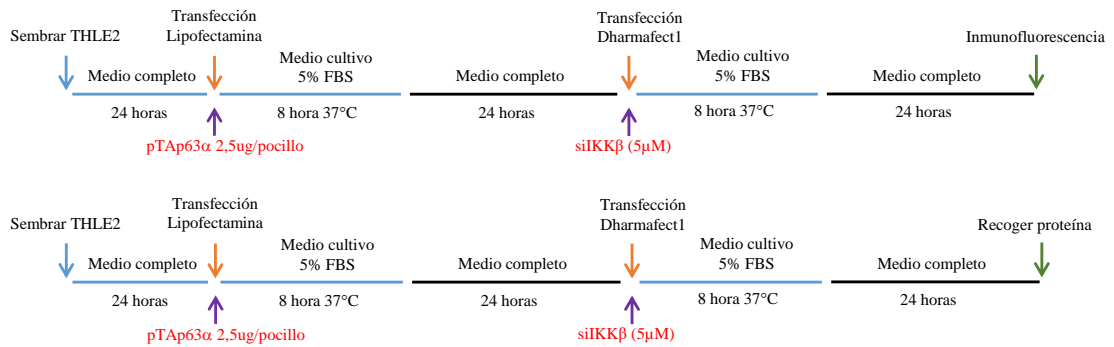
Se generan los siguientes grupos experimentales:

- ✓ siControl
- ✓ siIKKβ

7.14 SOBREENPRESIÓN DE TAP63α Y SILENCIAMIENTO DE IKKβ

En primer lugar, se llevó a cabo la transfección con el plásmido para aumentar la expresión de TAp63α. Como indicamos anteriormente utilizamos el reactivo Lipofectamina 2000 siguiendo las recomendaciones del fabricante (2,5 μg ADN/pocillo, utilizando placas de 6 pocillos), sembrando $1,5 \times 10^5$ células / pocillo. Tras 24 horas de transfección, silenciamos con

un siRNA con una secuencia específica para IKK β . Transfectamos con el reactivo Dharmafect (10 μ l de siRNA a 5 μ M). Tras 24 horas de infección realizamos la inmunofluorescencia y procedemos a recoger el extracto proteico.



Grupos experimentales:

- ✓ pControl
- ✓ pTAp63 α + siControl
- ✓ pTAp63 α + siIKK β





RESULTADOS



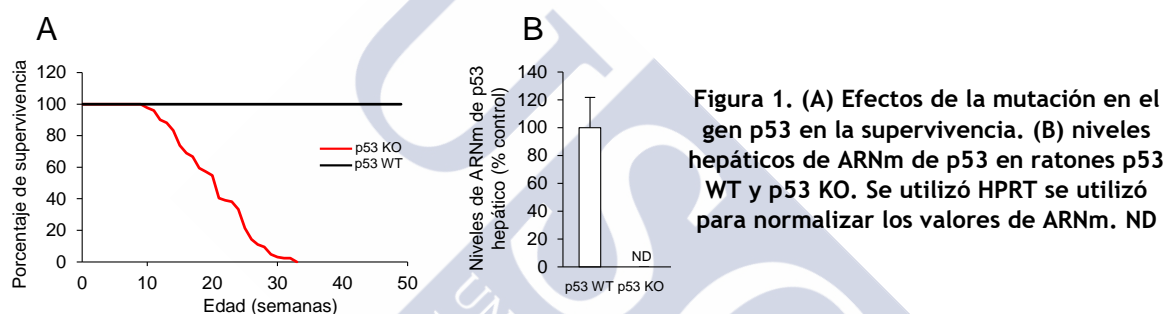


1 CARACTERIZACIÓN DEL ESPECTRO TUMORAL DE LOS RATONES p53 KO.

Para estudiar la posible función de p53 en el metabolismo elegimos, en primer lugar, un ratón con una deficiencia global en este gen.

Los ratones deficientes en p53 tienen menor esperanza de vida que los ratones WT. Se realizó un seguimiento de la supervivencia (Figura 1A) de estos ratones, así como de la aparición de tumores a lo largo de su vida (Tabla 27).

Para realizar los experimentos seleccionamos ratones macho homocigotos deficientes para el gen p53 y ratones macho homocigotos WT como controles. Para ello, cuando las crías tuvieron 3 semanas de edad, realizamos su genotipado. Además, también se comprobó la ausencia de la expresión de p53 mediante una PCR en tiempo real comparando la expresión de dicho gen en el hígado entre los ratones p53 WT y p53 KO (Figura 1 B).



Tipo de tumor	p53 WT (6 meses)	p53 KO (< 6 meses)
Linfoma tímico	0/20	15/44
Linfoma multicéntrico	0/20	4/44
Linfoma esplénico	0/20	6/4

Tabla 27. Aparición de tumores en los ratones

2 FENOTIPADO METABÓLICO DE RATONES p53 KO ALIMENTADOS CON DIETA ESTÁNDAR Y DIETA ALTA EN GRASA

Tras el destete, los ratones se mantuvieron en dieta estándar hasta las 6 semanas de edad. Se hizo una medida de composición corporal mediante resonancia magnética y posteriormente se alimentaron con dieta estándar y con HFD 45% durante 11 semanas. Durante este tiempo se

hizo un seguimiento semanal del peso. Al finalizar, se realizó de nuevo una medida de composición corporal y se hicieron test de tolerancia a glucosa e insulina.

Durante las once semanas de seguimiento de peso y composición corporal, se pudo observar que los ratones p53 KO ganaron menos peso (Figura 2A) y menos masa grasa (Figura 2C) que los controles WT. Por el contrario, en los ratones alimentados con dieta estándar, la falta de p53 no afectó a la ganancia de peso ni de masa grasa. Los test de tolerancia a glucosa e insulina mostraron que tan solo en los ratones alimentados con HFD la ausencia de p53 produjo una mejora en la resistencia a insulina (Figura E, F).

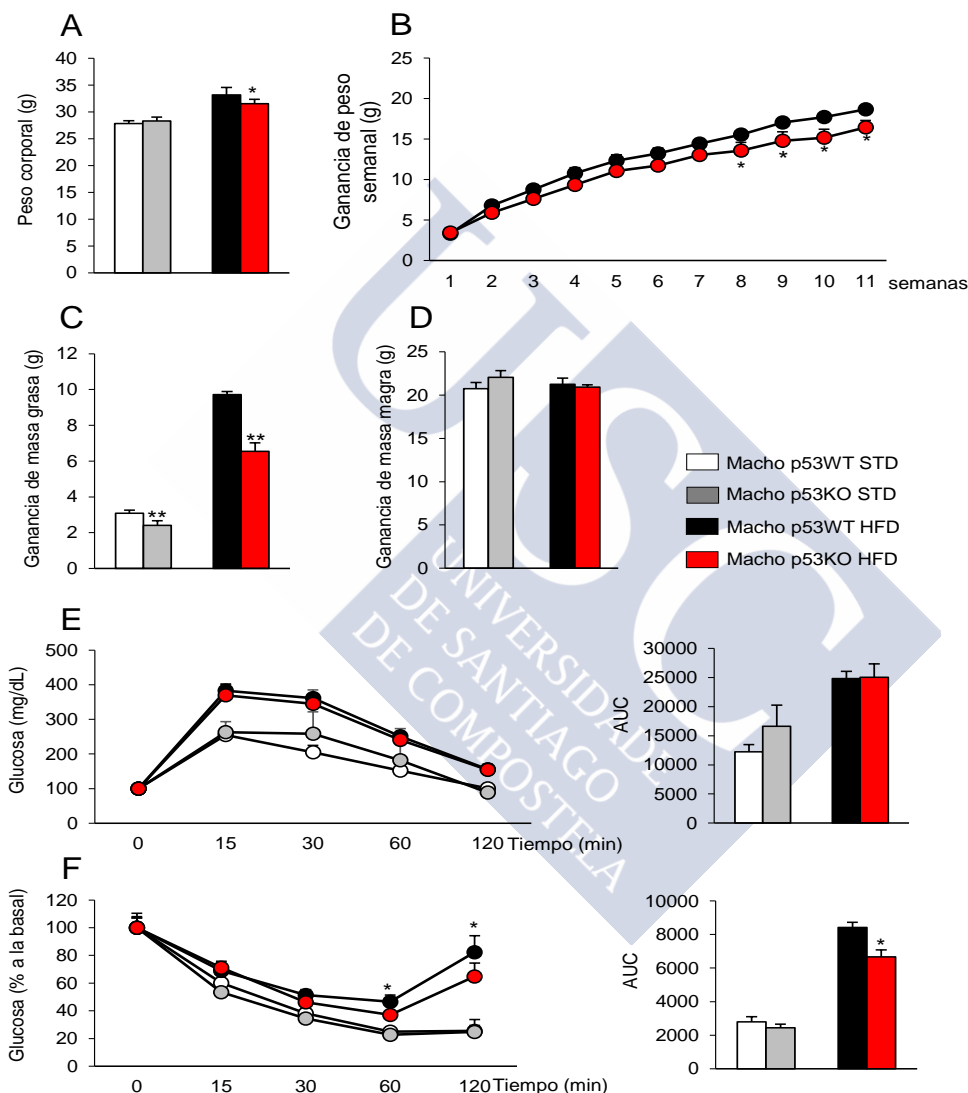


Figura 2. Fenotipo metabólico de los ratones macho p53 KO: efecto de la ausencia de p53 en peso corporal de los ratones después de libre acceso a deita estándar y dieta alta en grasa durante 11 semanas (A, B), en ganancia de masa grasa (C) y ganancia de masa magra (D). Test de tolerancia a la glucosa y área bajo la curva (AUC) y test de tolerancia a la insulina y área bajo la curva (E). Los valores indican la media ± el error estándar de p53 WT SD (n=9), p53 KO SD (n=5), p53 WT HFD (n=8) y p53 KO HFD (n=11). Test t-student comparando deita estándar y dieta alta en grasa como experimentos por separado *p<0,05; **p<0,01.

Repetimos el mismo procedimiento en hembras, pero los resultados encontrados en machos debido a la ausencia de p53 en la ganancia de peso y de masa grasa, no se encontraron en las hembras ya que no se observaron diferencias en peso bajo ninguna de las dos dietas, pero sí una tendencia en la acumulación de masa grasa en las hembra p53 KO alimentadas con HFD. En los test de tolerancia a glucosa e insulina no se encontró ninguna diferencia significativa entre hembras p53 KO y sus controles ni en dieta estándar ni en dieta alta en grasa.

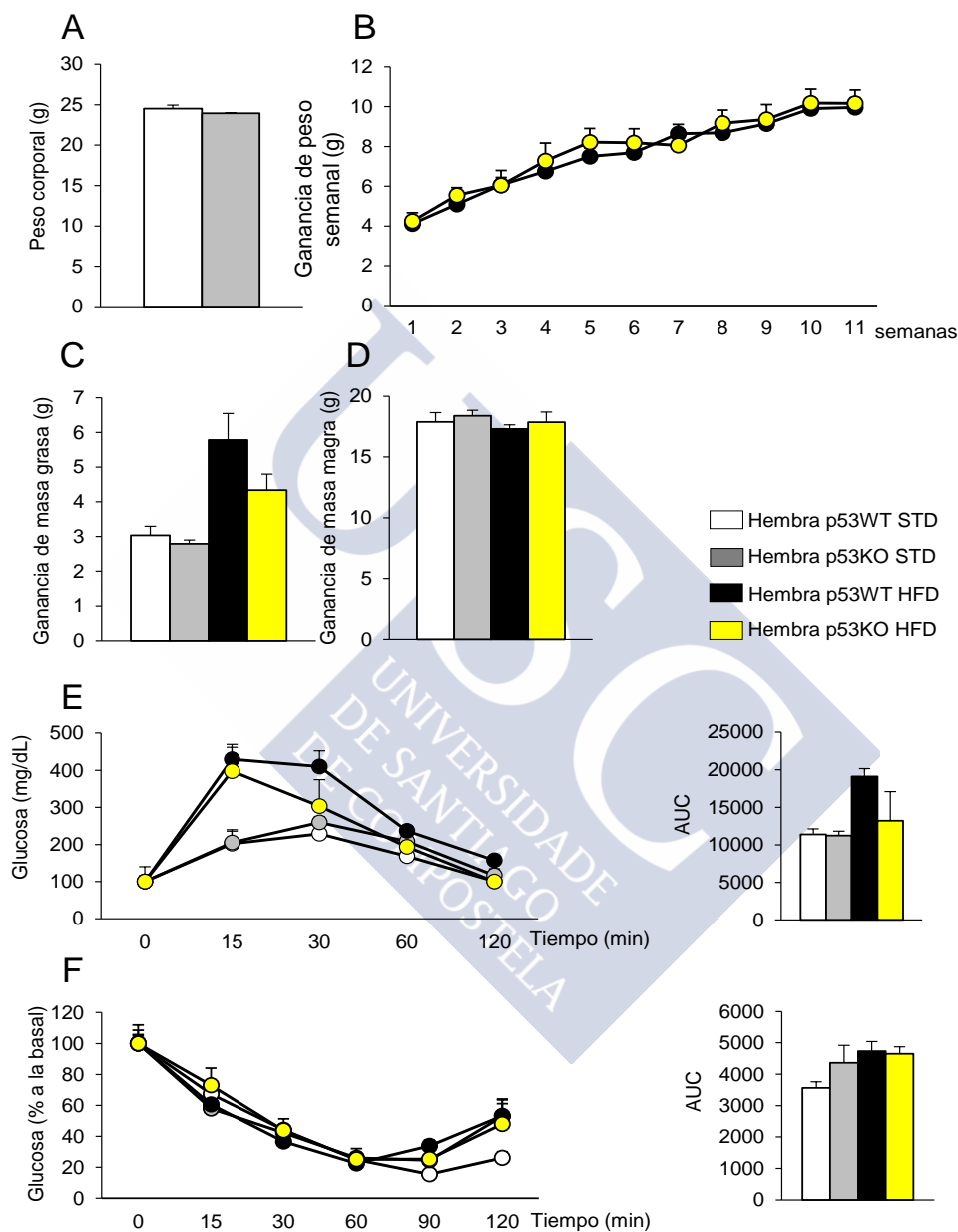


Figura 3. Fenotipo metabólico de los ratones hembra p53 KO. (A, B) Peso corporal de los ratones después de libre acceso a dieta estándar y dieta alta en grasa durante 11 semanas. (C) Ganancia de masa grasa y (D) ganancia de masa magra. (E) Test de tolerancia a la glucosa y área bajo la curva (AUC) y (F) test de tolerancia a la insulina y área bajo la curva. Los valores indican la media \pm el error estándar de p53 WT SD (n=8), p53 KO SD (n=7), p53 WT HFD (n=9) y p53 KO HFD (n=9). Test t-student comparando dieta estándar y dieta alta en grasa como experimentos por separado.

Volviendo a los ratones macho, quisimos indagar acerca de la causa de la pérdida de peso de los ratones p53 KO cuando se alimentaron con dieta alta en grasa. Para ello se realizó un fenotipado metabólico más amplio introduciendo a los ratones, tras las once semanas en dieta, en jaulas metabólicas durante 48 horas. Los resultados que obtuvimos en cuanto a ganancia de peso no se pueden explicar debido a un aumento de ingesta ya que no encontramos diferencias en la misma durante la monitorización (Figura 4E). Sin embargo, sí se observó un incremento del gasto energético de los ratones p53 KO tanto durante la fase de luz como durante la fase oscura (Figura 4A).

A pesar de este incremento en el gasto energético, la actividad locomotora no se vio incrementada lo que nos indica que son otros mecanismos, y no la actividad física, los que provocan ese incremento del gasto energético. La tasa de respiración tampoco se vio afectada por la ausencia de p53, por lo que este gen, no modula la partición nutricional.

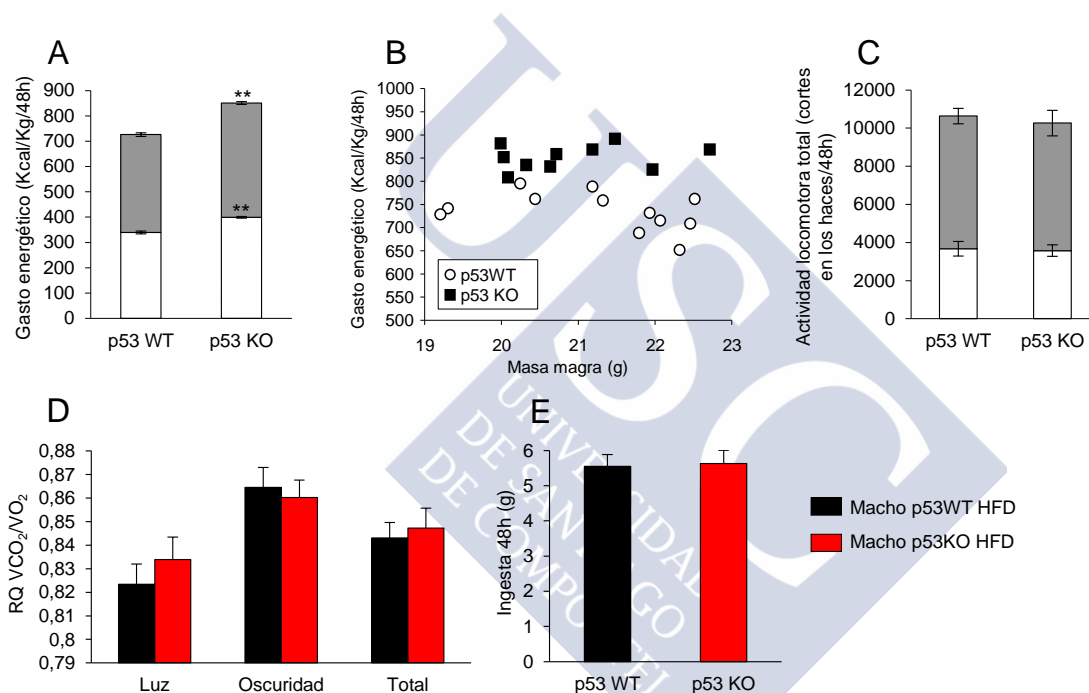


Figura 4. Fenotipo metabólico de los ratones macho p53 KO. Efectos de la ausencia de p53 en el gasto energético total (A) y respecto a la masa magra (B); en la actividad locomotora (C), sobre la tasa de respiración (RQ, Respiratory quotient) (D) y sobre la ingesta (E). Los valores indican la media \pm el error estándar de p53 WT HFD (n=14) y p53 KO HFD (n=11). Test t-student, *P<0,05 con respecto al control p53 WT.

2.1 LA AUSENCIA DE P53 ACTIVA LA TERMOGÉNESIS EN EL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN (BAT, BROWN ADIPOSE TISSUE).

Nos propusimos investigar el mecanismo por el cual el gasto energético se encuentra elevado en los ratones p53 KO alimentados con dieta alta en grasa. Para ello, se analizó en detalle el estado del BAT que juega un papel crucial en la termogénesis. En primer lugar, se encontró que los ratones deficientes para p53 tienen una mayor temperatura en el BAT que los WT alimentados con HFD (figura 5A). Se analizaron secciones histológicas de dicho tejido teñidas con eosina/hematoxilina y se observó que las gotas lipídicas tienen un menor tamaño en los ratones p53 KO (Figura 5B). Esto nos sugirió que el BAT está más activo en estos ratones. De acuerdo con esto, se encontraron niveles elevados de forma significativa de la proteína UCP1 mediante western blot (Figura 5C). Por otro lado, se analizaron varios genes relacionados con la termogénesis y se observó un incremento significativo en UCP3 y PRDM16 en el BAT de los ratones p53 KO en comparación con los WT. De forma consistente con la activación del BAT, el receptor adrenérgico $\beta 2$ tiene una expresión mucho más elevada en los ratones p53 KO (Figura 5D).

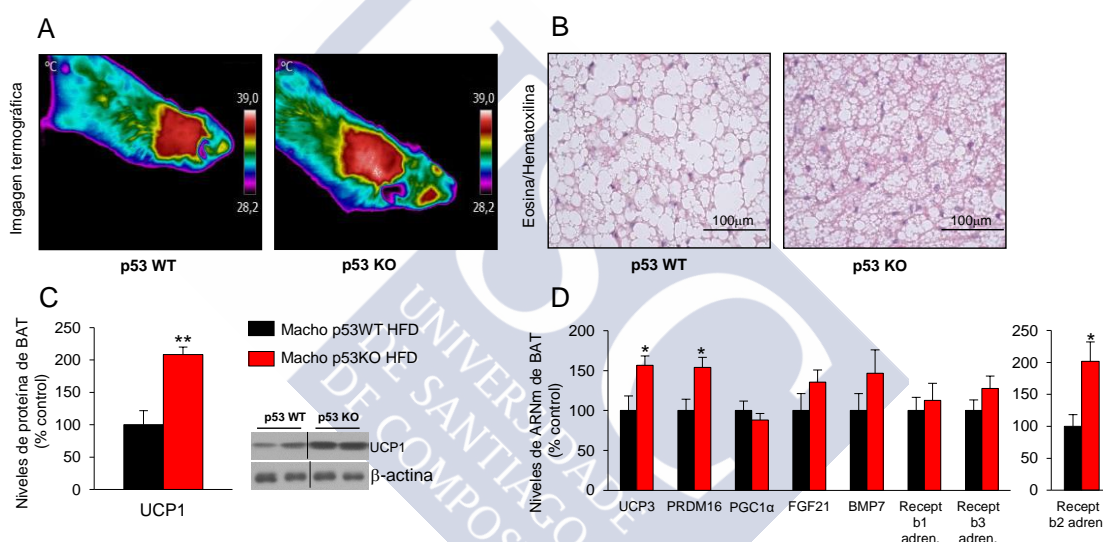


Figura 5. Metabolismo del BAT en ratones p53 KO. Efectos de la ausencia de p53 en la temperatura interescapular (imagen térmica representativa) (A), histología del BAT (B), niveles de expresión proteica de UCP1 (C) y niveles de ARNm de genes termogénicos (D). Los valores indican la media \pm el error estándar de p53 WT HFD (n=7-8) y p53 KO HFD (n=7-8). El HPRT se utilizó para normalizar los valores de ARNm. Test t-student, *P<0,05; **p<0,01 con respecto al control p53 WT.

2.2 LA AUSENCIA DE P53 ACTIVA LA LIPOGÉNESIS Y LA OXIDACIÓN EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO (WAT, WHITE ADIPOSE TISSUE).

La menor cantidad de masa grasa en los ratones deficientes en p53 alimentados HFD nos condujo a investigar qué ruta metabólica media el metabolismo de los adipocitos en WAT. Se observó un incremento significativo en los genes SREBP1, INSIG-2 y receptor $\beta 1$ adrenérgico en los ratones p53 KO (Figura 6A). Además, se encontró una disminución significativa en la expresión de la proteína fosforilada AMPK y, acorde a ello, niveles elevados de ACC α y FAS en el WAT de ratones p53 KO (Figura 6B). Como marcador de oxidación, se estudiaron los niveles de CPT1 observando un incremento en los ratones p53 KO (Figura 6B).

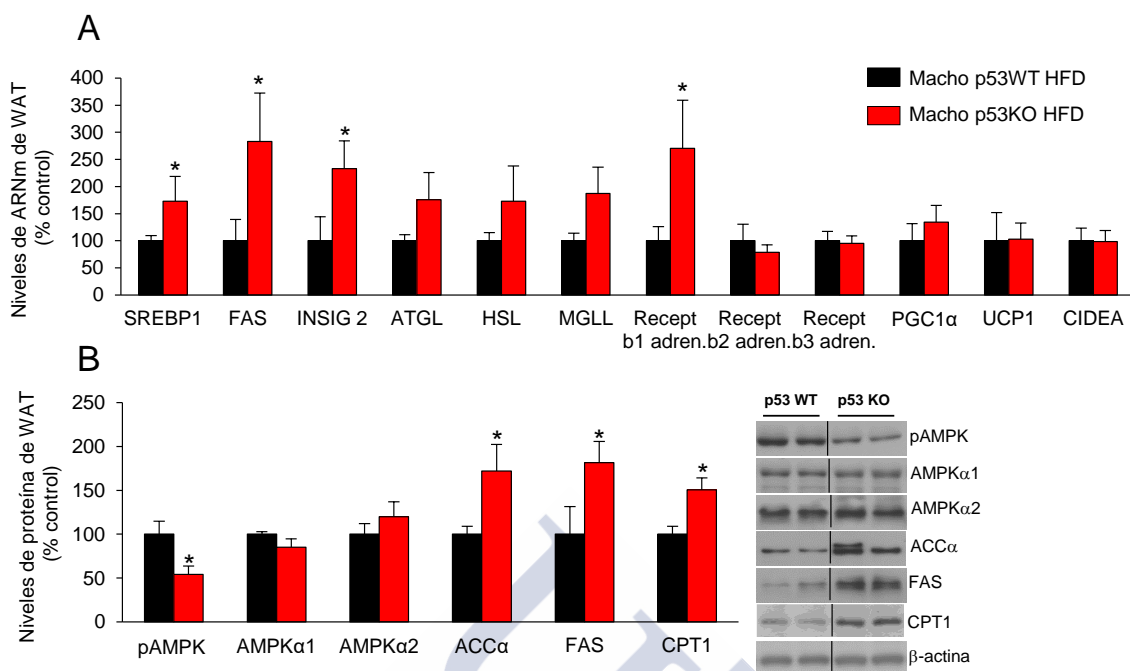


Figura 6. Metabolismo del WAT de los ratones p53 KO. Efectos de la ausencia de p53 en la expresión de genes (A) y proteína (B) relacionadas con el metabolismo lipídico. Los valores indican la media \pm el error estándar de p53 WT HFD (n=7-8) y p53 KO HFD (n=7-8). El HPRT se utilizó para normalizar los valores de ARNm. Test t-student, *P<0,05 con respecto al control p53 WT.

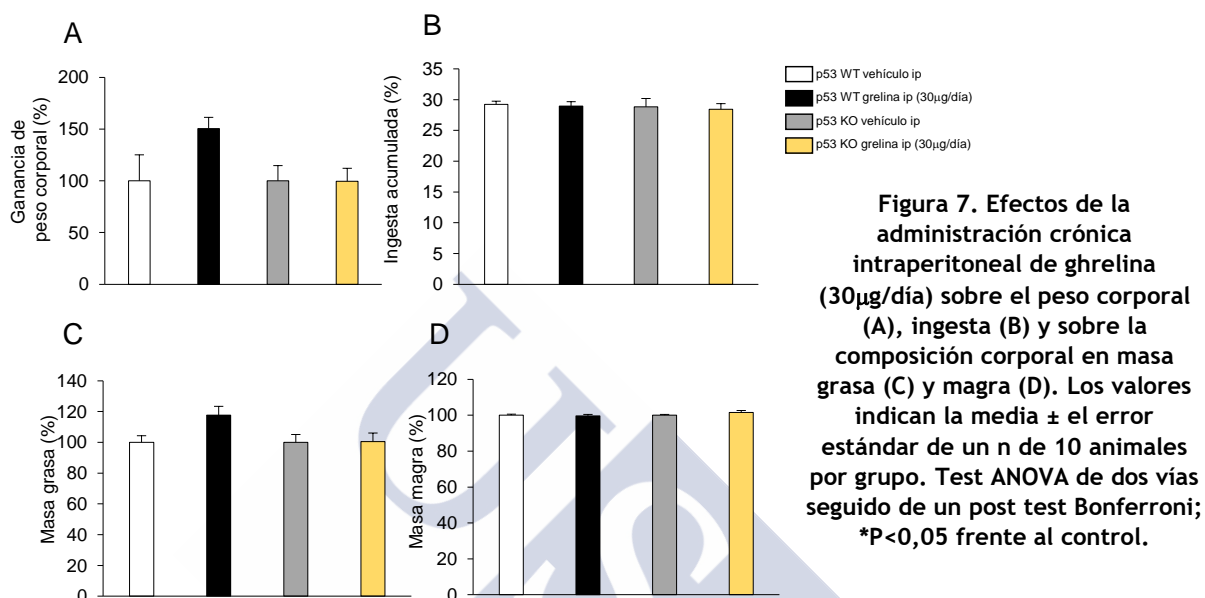
3 ACCIONES DE LA GHRELINA EN METABOLISMO DE RATONES p53 KO

3.1 LA FALTA DE P53 BLOQUEA LA GANANCIA DE PESO Y DE MASA GRASA PROVOCADA POR LA ADMINISTRACIÓN PERIFÉRICA CRÓNICA DE GHRELINA.

Una vez estudiadas las rutas metabólicas en el WAT de los ratones p53 KO, quisimos investigar si la ghrelina, hormona conocida por su acción adipogénica, tiene algún papel relacionado con la acción de p53 en dicho tejido.

Para comprobar la importancia de la acción periférica de la ghrelina en el peso corporal y en la adiposidad, se diseñó un experimento en el que se inyectó ghrelina (30 μ g/día) vía intraperitoneal y de forma crónica durante una semana a ratones p53 WT y p53 KO. Este tratamiento provocó un aumento de la media del peso corporal en ratones p53 WT (Figura 7A), aunque con el análisis estadístico ANOVA de dos vías no se obtuvo una interacción significativa entre la acción de la ghrelina y p53 (P = 0,25, F = 1,31, df = 1). Este aumento en la media del peso corporal se acompañó de un aumento en la media del porcentaje de masa grasa (Figura 7C), aunque de nuevo, tras el análisis estadístico con el ANOVA de dos vías no se encontró interacción entre la ghrelina y p53 (P = 0,7, F = 3,38, df = 1). Si analizamos los

datos con un test estadístico (t-student) comparando solo las medias de los ratones p53 WT, sí obtenemos diferencias significativas con el tratamiento con ghrelina. En los ratones p53 KO, la acción de la ghrelina no tiene efecto ni en peso corporal (Figura 7A) ni en el porcentaje de masa grasa (Figura 7C). No se observaron cambios en el porcentaje de masa no grasa en los ratones p53 WT ni en los ratones p53 KO (Figura 7D) así como tampoco cambios en la ingesta acumulada tras el tratamiento con la ghrelina (Figura 7B).



Es importante destacar que el peso corporal, la ingesta y la composición corporal fue similar entre los grupos p53 WT y p53 KO antes de iniciar el tratamiento con ghrelina (Tabla 28).

	p53WT	p53KO
Peso corporal (g)	22.11±1.18	20.59±0.98
Ingesta (g)	3.68±0.2	3.87±0.27
Masa grasa (%)	8.5±0.34	9.67±0.47
Masa magra (%)	85.16±1.4	85.11±0.77

Tabla 28. Peso corporal, ingesta y composición corporal (masa grasa y masa magra) de ratones p53 WT y p53 KO antes de iniciar el tratamiento con ghrelina. Los datos se presentan como la media y ± el error estándar de un n de 23 y 19 ratones por grupo. Test ANOVA de dos vías seguido de un post test Bonferroni; *P<0,05 frente al control.

El tratamiento crónico con ghrelina se asocia con un balance energético positivo, pero no encontramos ningún efecto en parámetros séricos como la glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres y corticosterona (Tabla 29).

	p53WT Vehicle	p53WT Ghrelina	p53KO Vehicle	p53KO Ghrelina
Ácidos grasos libres (mg/dl)	39.42 ± 5.66	31.37 ± 2.59	31.37 ± 2.59	25.78 ± 2.65
TG (mg/dl)	7.00 ± 0.77	6.5 ± 0.37	5.1 ± 0.40	5.67 ± 0.73
Colesterol (mg/dl)	16.81 ± 0.86	20.68 ± 1.53	16.77 ± 0.83	18.50 ± 1.16
Glucosa (mg/dl)	14.85 ± 1.32	12.52 ± 1.08	13.08 ± 0.57	14.03 ± 0.49
Insulina (ng/ml)	0.66 ± 0.15	0.73 ± 0.11	0.46 ± 0.08	0.56 ± 0.05
Corticoesterona (ng/ml)	5.51 ± 1.12	5.76 ± 1.35	5.27 ± 1.49	5.36 ± 0.75

Tabla 29. Niveles circulantes de ácidos grasos libres, TG, colesterol, glucosa, insulina corticoesterona en ratones p53 WT y p53 KO tras el tratamiento crónico intraperitoneal con ghrelina (30µg/día). Test ANOVA de dos vías seguido de un post test Bonferroni; *P<0,05 frente al control.

3.2 LA FALTA DE p53 BLOQUEA EL EFECTO LIPOGÉNICO DE LA GHRELINA EN EL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO (WAT).

Tras finalizar el tratamiento crónico con la ghrelina y observar un incremento en la masa grasa de ratones p53 WT y no en los p53 KO, se decidió analizar la expresión algunos genes clave relacionados con el metabolismo lipídico en el WAT (Figura 8A). Tras el tratamiento estadístico con el ANOVA de dos vías se encontraron interacción entre la ghrelina y la falta de p53 en los siguientes genes: SREBP1 (P = 0,0014; F = 13,54; df = 1), ácido graso sintasa, FAS (P = 0,016; F = 7,80; df = 1), LPL (P = 0,002; F = 11,46; df = 1) y en CEPB α (P = 0,033; F = 5,16; df = 1). En estos genes, se realizó un post-test Bonferroni en el que se vieron reflejadas las diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (Figura 8A). El tratamiento crónico con ghrelina en ratones p53 WT provocó un aumento en la expresión de genes involucrados en la síntesis de novo de ácidos grasos como SREBP1 y FAS (Figura 8A); un incremento en la expresión de LPL, gen involucrado en la captación de lípidos y además, se encontró un incremento significativo en los niveles de ARNm de CEPB α , el cual activa la adipogénesis (Figura 8A). Por el contrario, no se encontró ningún cambio significativo en la expresión de dichos genes en los ratones p53 KO tras el tratamiento (Figura 8A). Estos resultados nos indican que p53 juega un papel esencial en la acción adipogénica de la ghrelina WAT. Hay que destacar también el incremento significativo que se encontró en la expresión de los genes LPL y SREBP1 entre los grupos p53 WT y p53 KO tratados con vehículo. Esto nos indicó que la falta de p53 provoca una mayor captación y síntesis de novo en el tejido adiposo blanco que en los ratones con niveles normales de p53.

Para comprobar si la ghrelina modula directamente el metabolismo de los adipocitos, se realizaron explantes de tejido adiposo de ratones p53 WT incubando con vehículo (PBS) y ghrelina (10⁻⁸ M). Para comprobar la eficiencia de la hormona, se midió la activación de ERK y AMPK a tiempos cortos. Como era de esperar, se observó un incremento de la ratio de las formas fosforiladas (activas) de ERK y de AMPK y de sus formas no fosforiladas (inactivas) en las muestras analizadas (Figura 8B). Se analizaron genes relacionados con el metabolismo lipídico en estos explantes a 12 y 24 horas y se encontró una disminución significativa de ACC α tras 24 horas de tratamiento con ghrelina.

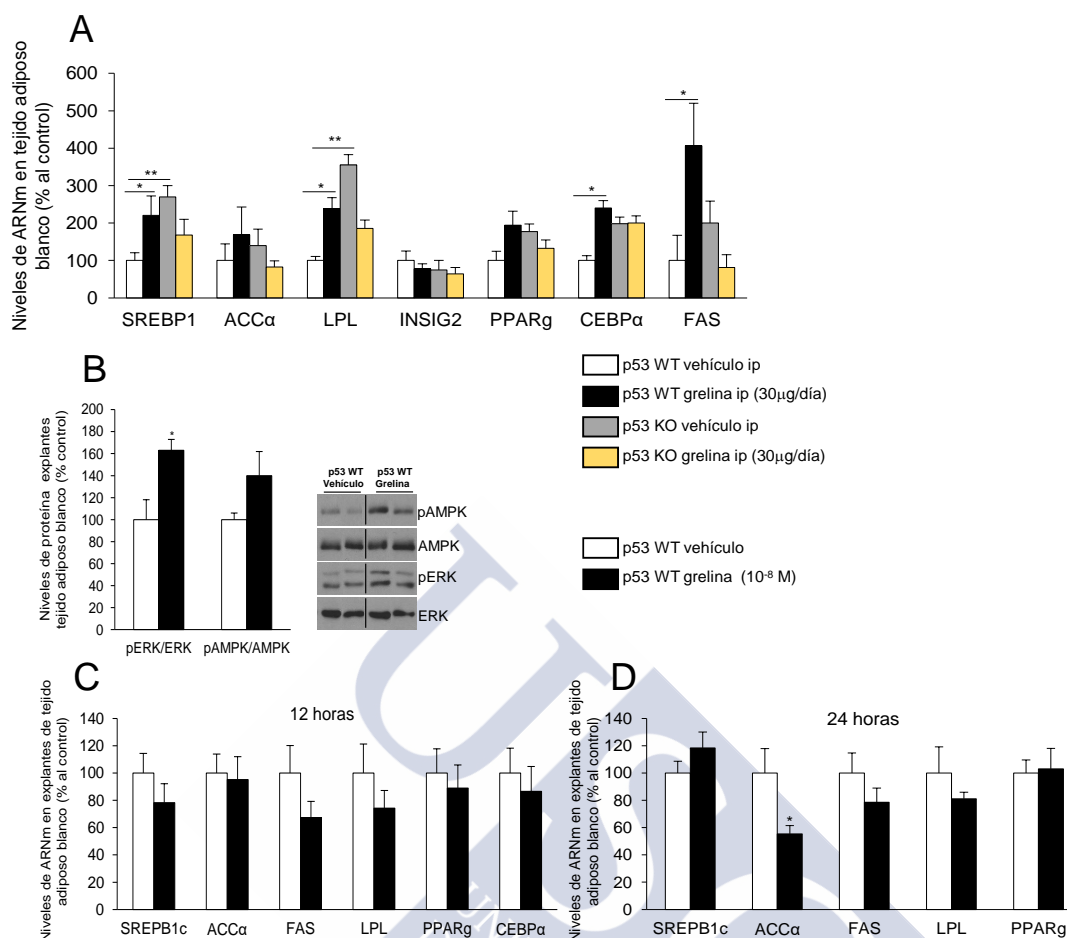


Figura 8. Efectos de la inyección crónica intraperitoneal de ghrelina (30µg/día) en la expresión de genes lipogénicos en WAT: SREBP1c, ACCα, FAS, LPL, PPARγ y CEBPα (A). Los valores indican la media ± el error estándar de un n de 7-8 animales por grupo. Test ANOVA de dos vías seguido de un post test Bonferroni. Efectos de la ghrelina (10⁻⁸ M) en explantes de ratones p53 WT en los niveles de las proteínas pAMPK, AMPK, pERK, ERK (B) y sobre los niveles de ARNm de SREBP1c, ACCα, FAS, LPL, PPARγ y CEBPα tras 12 horas (C) y 24 horas (D) de tratamiento. Los valores se presentan como la media ± el error estándar de un n de 3 explantes por grupo. Test t-student de una cola; *p<0,05; ; **p<0,01 frente al control

3.3 LA FALTA DE P53 BLOQUEA EL EFECTO LIPOGÉNICO DE LA GHRELINA EN EL HÍGADO

Por otro lado, también se investigó si la falta de p53 modula los efectos de la ghrelina no solo de forma específica en el WAT, sino también en otro tejido metabólico como el hígado. Se encontró que la administración periférica y crónica de ghrelina incrementó el contenido hepático de triglicéridos en ratones p53 WT pero no en los p53 KO (Figura 9A). Para conocer los mecanismos moleculares subyacentes al incremento del contenido de triglicéridos, se analizó en el hígado la expresión proteica de varios enzimas clave en el metabolismo lipídico (Figura 9B). En primer lugar, se halló una interacción significativa entre el tratamiento con la ghrelina y la falta de p53 en los niveles hepáticos de ACCα ($P = 0,0005$; $F = 17$; $df = 1$) y FAS ($P = 0,017$; $F = 6,53$; $df = 1$). Estas dos proteínas fueron analizadas más tarde con un post test Bonferroni, como se muestra en la figura 9B. Estos resultados indicaron que la ghrelina aumenta

la expresión de enzimas que favorecen la síntesis de lípidos en ratones p53 WT. Por otro lado, no se encontraron diferencias en proteínas relacionadas con la oxidación de lípidos (CPT1A) ni con la captación de lípidos (LPL). No se observaron diferencias entre los ratones p53 KO tratados con vehículo y con ghrelina en ninguna de las proteínas estudiadas. Todos estos resultados nos llevaron a la conclusión de que p53 juega un papel relevante en la acción lipogénica de la ghrelina en el hígado. Además, este papel fundamental de p53 también se demostró observando el incremento significativo de los niveles de TG hepáticos y en la mayor expresión de las proteínas FAS y ACC α en los ratones p53 KO comparados con los ratones p53 WT sin tratar (Figura 9A). La falta del gen p53 provoca alteraciones en el metabolismo lipídico hepático.

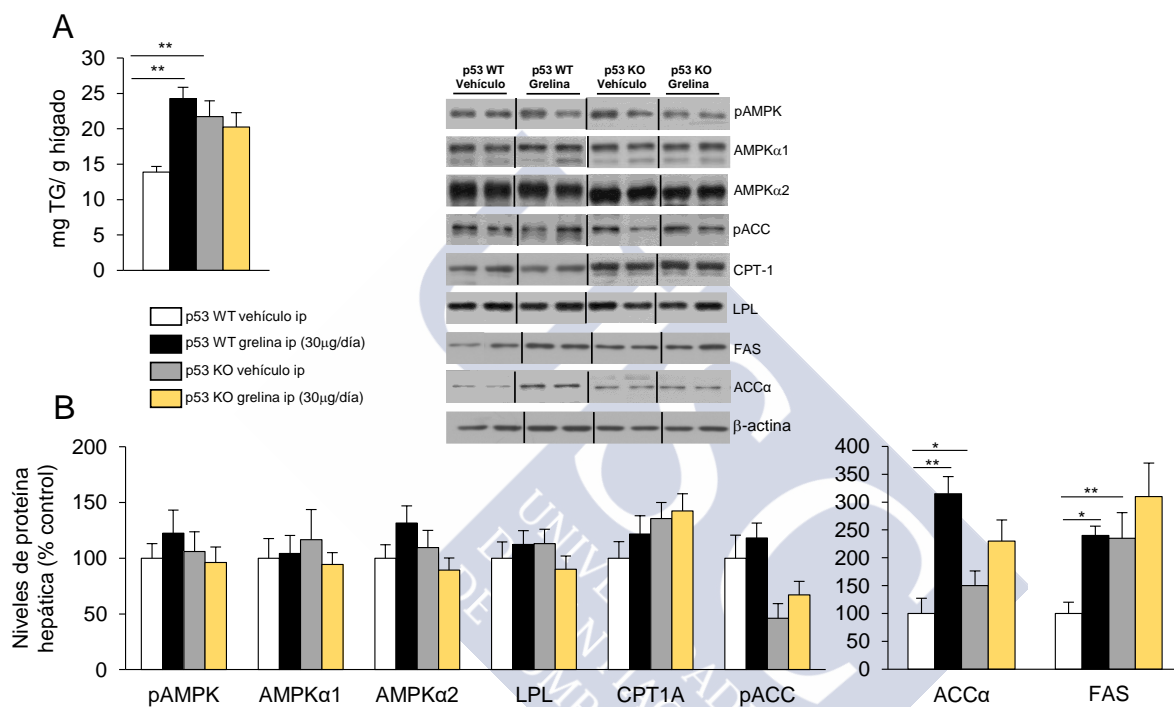


Figura 9. Efectos de la inyección crónica intraperitoneal de ghrelina (30µg/día) en el contenido hepático de TG (A) y en los niveles de expresión de las proteínas pAMPK, AMPK α 1, AMPK α 2, LPL, CPT1A, pACC, ACC α y FAS (B). Los valores se presentan como \pm la media de un n de 7 animales por grupo. Test ANOVA de dos vías seguido de un post test Bonferroni; *p<0,05 y ; **p<0,01 frente al control

3.4 LA FALTA DE P53 BLOQUEA LA ACCIÓN HIPOTALÁMICA DE LA GHRELINA EN EL METABOLISMO LIPÍDICO.

Estudios previos han demostrado que la acción fisiológica orexigénica de la ghrelina, a tiempos cortos (2-6 horas), en el hipotálamo se debe a un incremento en los niveles de la proteína fosforilada AMPK²⁶⁸ vía SIRT1-p53²⁶⁹. Por lo tanto, quisimos estudiar si la administración periférica de la ghrelina afecta al metabolismo lipídico en el hipotálamo. Tras el análisis estadístico con un ANOVA de dos vías, se encontró una interacción significativa entre el tratamiento con ghrelina y la falta de p53 en los niveles de las proteínas ACC α (P = 0,02; F = 6,30; df = 1) y FAS (P = 0,03; F = 5,11; df = 1) en el hipotálamo. En dichas proteínas se realizó un post test Bonferroni como aparece en la figura 10A. El tratamiento crónico con la ghrelina provocó una disminución en la expresión de las proteínas hipotalámicas ACC α y

FAS en ratones p53 WT, pero no en los p53 KO (Figura 10A). Aunque está publicado que la administración aguda y central de ghrelina provoca un incremento en los niveles hipotalámicos de la proteína fosforilada AMPK^{270,271}, con el tratamiento crónico y periférico no fuimos capaces de reproducir dicho resultado²⁷². Esto nos indicó, por tanto, que la fosforilación de AMPK es tiempo-dependiente.

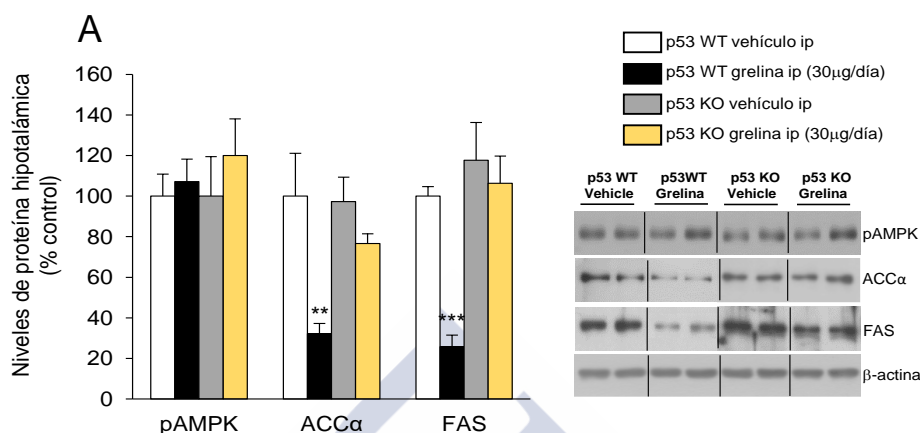


Figura 10. Efectos de la inyección crónica intraperitoneal de ghrelina (30µg/día) en el hipotálamo sobre los niveles de la proteína fosforilada AMPK, en ACCα y en FAS. Los valores se presentan como \pm la media de un n de 7 animales por grupo. Test ANOVA de dos vías seguido de un post test Bonferroni; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ frente al control.

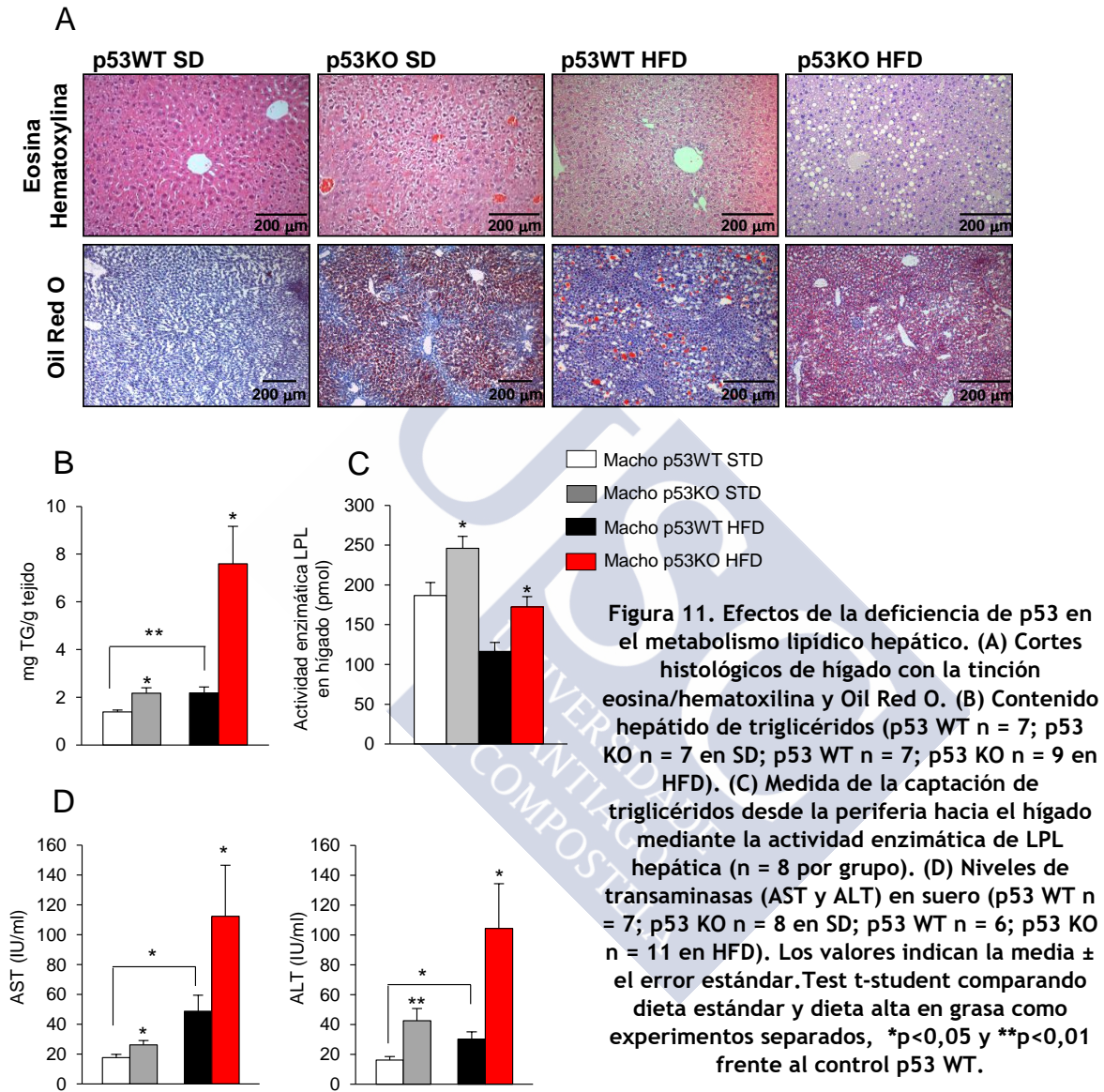
4 EFECTOS HEPÁTICOS DE LA AUSENCIA DE p53

4.1 LOS RATONES p53 KO ALIMENTADOS CON DIETA ESTÁNDAR Y DIETA ALTA EN GRASA MUESTRAN MAYOR CONTENIDO DE GRASA HEPÁTICA.

Como se pudo observar en los cortes histológicos, los ratones p53 KO mostraron una mayor acumulación de lípidos en los hepatocitos, independientemente del tipo de dieta (Figura 11A). Este resultado se confirmó con la medida de triglicéridos hepáticos (Figura 11B) y de transaminasas (AST y ALT) (Figura 11D) que son marcadores séricos de daño hepático. Se realizó un análisis de genes y proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico. Se encontró que los ratones p53 KO muestran niveles elevados de los genes PPAR γ y FAS que también mostraron elevada su expresión proteica. Todo esto nos indica que los ratones p53 KO tiene incrementada la lipogénesis de novo independientemente de la dieta con la que se alimenten (Figura 12A,B). También se estudiaron marcadores de inflamación, pero no se observó ningún cambio (Figura 12B).

Se estudió el daño en el retículo endoplásmico ya que se sabe que en hígados dañados por dietas altas en grasa se activan las respuestas celulares de la UPR para aliviar el estrés del retículo endoplásmico²⁷³. De forma consecuente al daño hepático que tienen los ratones p53 KO, independientemente del tipo de dieta, se encontraron elevados diversos marcadores

relacionados con el estrés de RE como la ratio pIRE/IRE, XBP1s, pPERK y la ratio p $\text{eIF2}\alpha$ / $\text{eIF2}\alpha$ (Figura 12B). Por último, quisimos estudiar cómo afecta la deficiencia de p53 a la apoptosis^{274,275}. Las caspasas cleaved 3 y 7 mostraron niveles elevados de forma significativa en ambos casos, dieta estándar y HFD (Figura 12B).



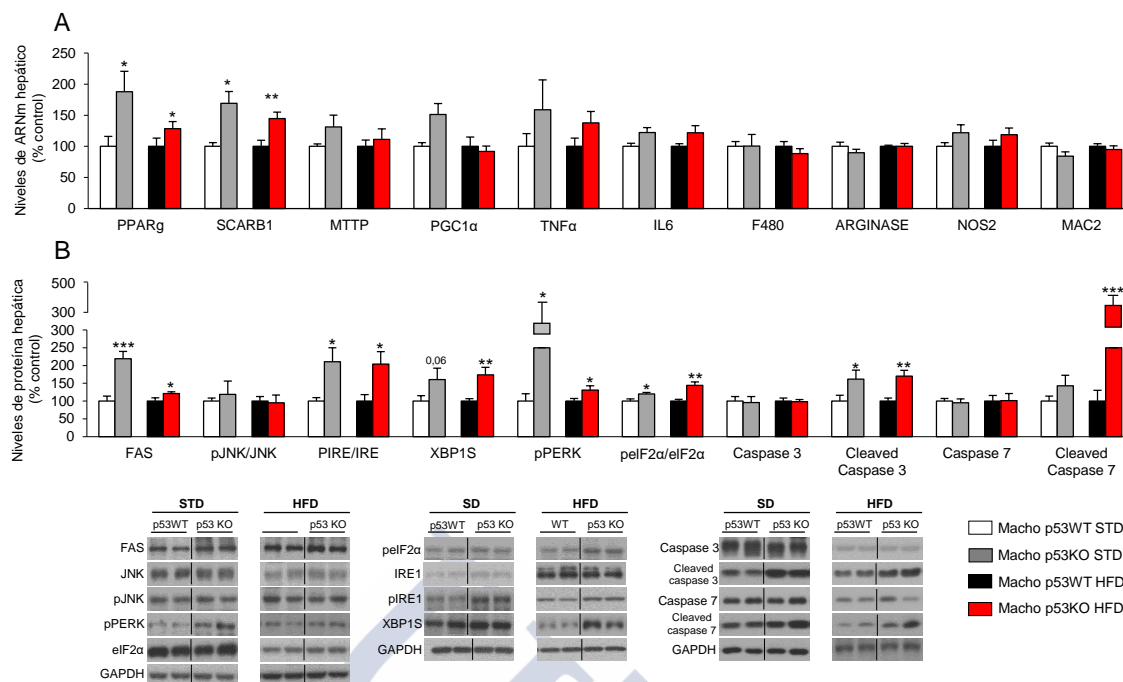


Figura 12. Efectos de la deficiencia de p53 en el metabolismo lipídico hepático. Cuantificación de los niveles de expresión de genes (A) (p53 WT n = 7; p53 KO n = 7 en SD; p53 WT n = 7; p53 KO n = 9 en HFD) y proteína (B) (n = 7 por grupo) implicadas en el metabolismo lipídico. Se utilizó HPRT para normalizar los niveles de ARNm y GAPDH para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar. Test t-student comparando dieta estándar y dieta alta en grasa como experimentos separados, *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001 frente al control p53 WT.

4.2 LA DISMINUCIÓN SELECTIVA HEPÁTICA DE p53 PROVOCA ESTEATOSIS Y ESTEATOHEPATITIS.

Después de obtener los resultados en los ratones KO globales para p53, quisimos investigar el efecto de una disminución específica de los niveles de p53 en el hígado. Para ello, se utilizaron ratones p53 flox y la tecnología Cre-lox. Tras seleccionar ratones machos p53 flox, se les inyectó a través de la vena de la cola un virus adenoasociado que expresa la recombinasa Cre en el hígado de nuestros ratones. Un mes después de la infección, se encontró una reducción significativa de los niveles de la proteína p53 (Figura 13A). Se reprodujeron los resultados obtenidos en hígado en los ratones p53 KO globales, es decir, aumento de gotas lipídicas en las tinciones *Oil Red O* y eosina hematoxilina de cortes histológicos de hígado, en los niveles de triglicéridos y en los niveles de transaminasas medidas en suero (Figura 13B, C).

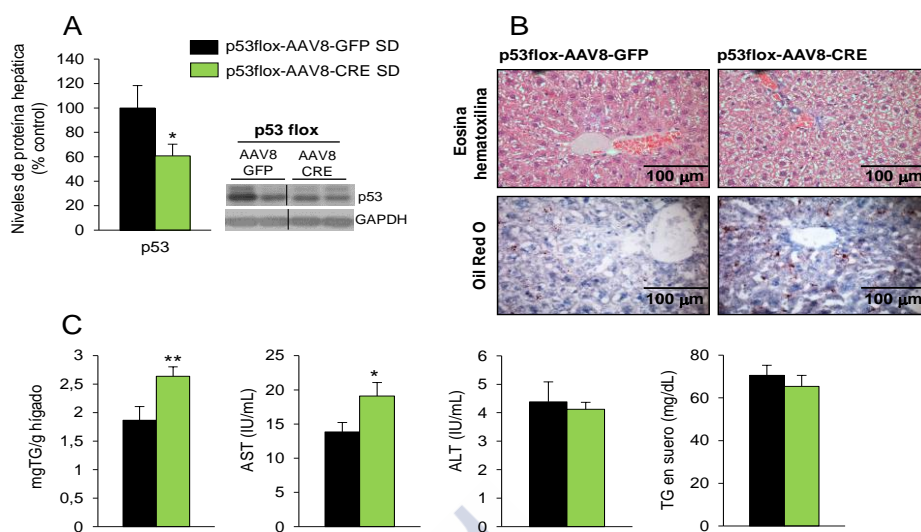


Figura 13. Efectos de la disminución de p53 en la esteatosis hepática. . Niveles de la expresión de p53 en el hígado de ratones p53 flox inyectados con el AAV8-Cre y AAV8-GFP en la vena de la cola (n = 7 por grupo) (A). Cortes histológicos de hígado con la tinción eosina/hematoxilina y Oil Red O (B). Niveles de triglicéridos en hígado y medidas de transaminasas y triglicéridos en suero (C) (n = 8 AAV8-GFP y n = 11 AAV8). Se utilizó GAPDH para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar. Test t-student, *p<0,05 y **p<0,01 frente al control p53 flox AAV-GFP.

Centrándonos en el metabolismo lipídico, se observó un aumento en la expresión de proteínas implicadas en la síntesis de novo con los niveles elevados de FAS. También analizamos marcadores de oxidación: CPT1, ACADM, ACADL y FATP2 que permanecen sin cambios tras la reducción de los niveles de p53. De acuerdo con este daño hepático también hallamos incrementos significativos en los marcadores de respuesta al estrés del retículo endoplasmático (pIRE/IRE, XBP1s, pPERK y pelf2α/eif2α) y en la apoptosis (cleaved caspasa 3 y 7) (Figura 14).

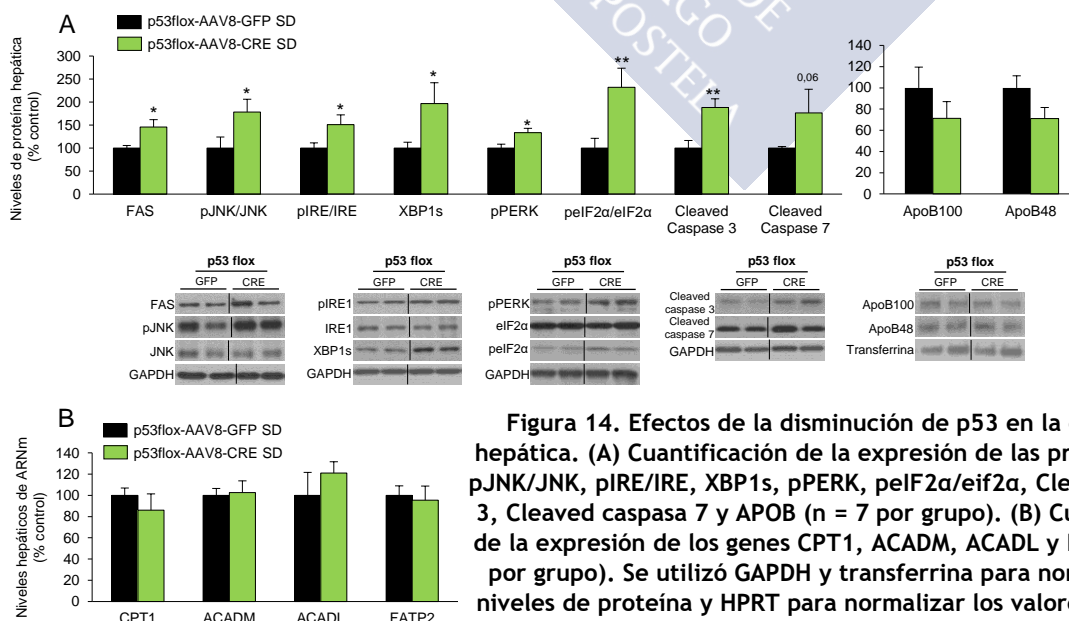


Figura 14. Efectos de la disminución de p53 en la esteatosis hepática. (A) Cuantificación de la expresión de las proteínas FAS, pJNK/JNK, pIRE/IRE, XBP1s, pPERK, pelf2α/eif2α, Cleaved caspasa 3, Cleaved caspasa 7 y APOB (n = 7 por grupo). (B) Cuantificación de la expresión de los genes CPT1, ACADM, ACADL y FATP2 (n = 8 por grupo). Se utilizó GAPDH y transferrina para normalizar los niveles de proteína y HPRT para normalizar los valores de ARNm. Los valores indican la media ± el error estándar. Test t-student, *p<0,05 y **p<0,01 frente al control p53 flox AAV-GFP.

Quisimos comprobar si además de la esteatosis hepática, la disminución de p53 de forma específica en el hígado producía cambios el metabolismo de la glucosa. Para ello se realizó un test de tolerancia a la glucosa y a la insulina y, como se puede observar en la figura 15 no se observaron cambios.

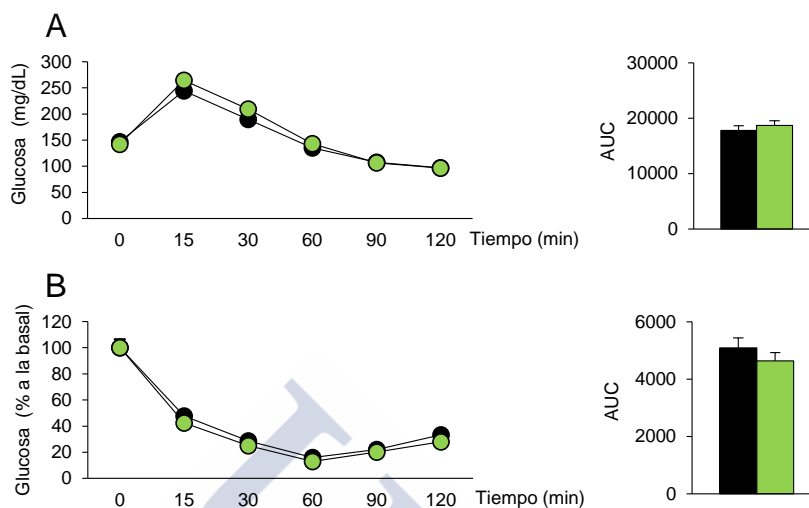


Figura 15. Efectos de la disminución de p53 en el metabolismo de la glucosa. (A) Test de tolerancia a la glucosa y área bajo la curva. (B) Test de tolerancia a la insulina y área bajo la curva (n = 8 AAV8-GFP y n = 11 AAV8). Los valores indican la media \pm el error estándar. Test t-student, *p<0,05 frente al control p53 flox AAV-GFP.

4.3 LA SOBREENPRESIÓN DE P53 MEJORA LA ESTEATOSIS Y LA ESTEATOHEPATITIS EN RATONES P53 KO Y EN RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN GRASA.

Hasta ahora comprobamos que tanto la deficiencia parcial como global de p53 en el hígado provoca esteatosis y esteatohepatitis independientemente del tipo de dieta. El siguiente experimento consistió en comprobar si la recuperación de la expresión de p53 es suficiente para mejorar el estado hepático de los ratones p53 KO alimentados con dieta alta en grasa. Para ello, se inyectó a través de la vena de la cola un adenovirus que codifica para p53 y su control GFP. Una semana después de la inyección, se sacrificaron los ratones y se comprobó la especificidad de la infección en el hígado. Para ello se realizó un western blot para comprobar la expresión de GFP en distintos tejidos (Figura 16A). Además, los niveles de p53 en el hígado aumentaron tras la inyección del adenovirus como se puede comprobar en la figura 16B.

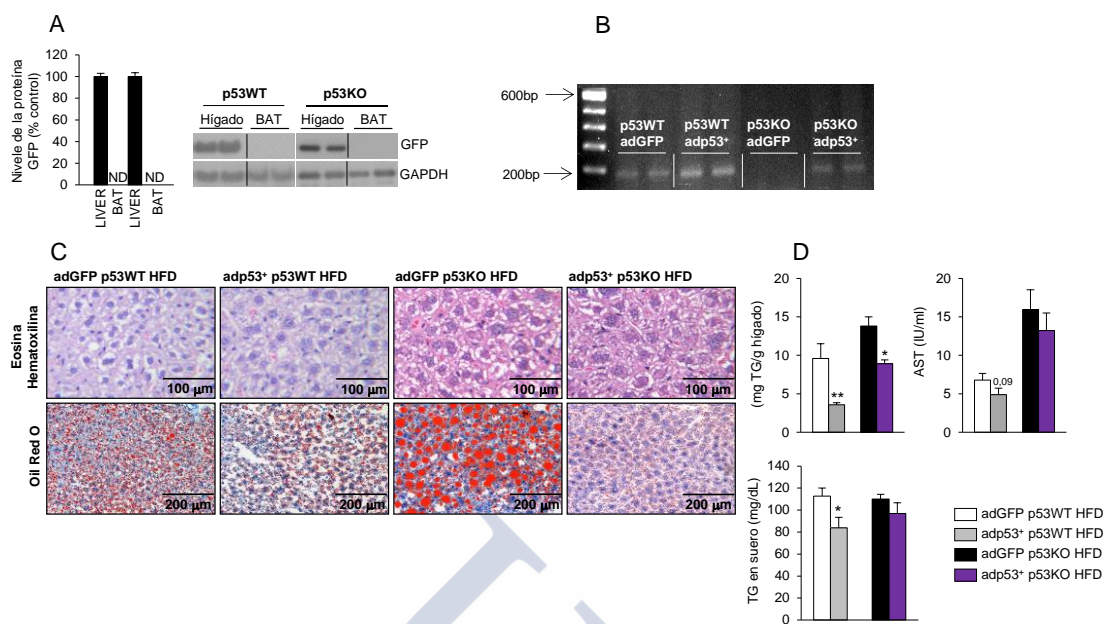


Figura 16. La recuperación de los niveles de p53 en el hígado de los ratones p53 KO en HFD mejora la esteatosis y la esteatohepatitis. (A) Comprobación de los niveles de GFP en distintos tejidos (n = 4 por grupo). (B) Expresión de p53 en el hígado de ratones p53 WT y p53 KO tras una semana de infección del adenovirus (n = 4 por grupo). (C) Tinción eosina-hematoxilina y Oil Red O de cortes histológicos de hígado (n= 3 por grupo). (D) Niveles de triglicéridos en hígado y suero y de AST en suero (n = 6 GFP y n = 5 adp53⁺ en los p53 WT y n = 5 GFP y n = 4 adp53⁺). Los valores indican la media ± el error estándar. Test t-student, *p<0,05 y **p<0,01 con respecto a p53 WT GFP y p53 KO GFP respectivamente.

Después de una semana de infección con el adenovirus de p53, tanto los ratones p53 KO como los p53 WT mostraron una menor cantidad de gotas lipídicas, menor cantidad de triglicéridos y una tendencia no significativa a una menor concentración de AST en suero. (Figura 16C, D). Esta mejora del contenido hepático de grasa vino acompañada de la inhibición las proteínas FAS, pJNK/JNK, de marcadores de estrés de retículo endoplasmático y de apoptosis (Cleaved caspasa 3) (Figura 17A,B).

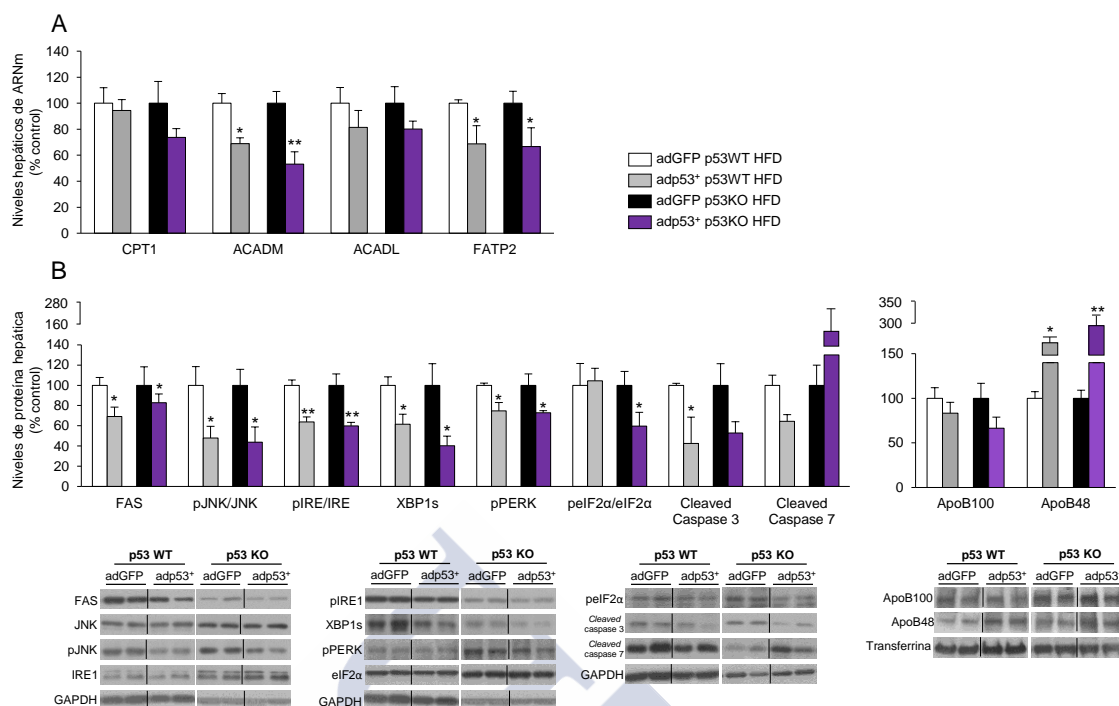


Figura 17. La recuperación de los niveles de p53 en el hígado de los ratones p53 KO en HFD mejora la esteatosis y la esteatohepatitis. (A) Cuantificación de la expresión de genes de oxidación en el hígado (CPT1, (n = 6 GFP y n = 5 adp53+ en los p53 WT y n = 5 GFP y n = 4 adp53+). (B) Cuantificación de la expresión de las proteínas FAS, pJNK/JNK, pIRE/IRE, XBP1s, pPERK, pelf2α/eif2α, Cleaved caspasa 3, Cleaved caspasa 7 y APOB (n = 6 GFP y n = 5 adp53+ en los p53 WT y n = 5 GFP y n = 4 adp53+). Se utilizó GAPDH y transferrina para normalizar los niveles de proteína y HPRT para normalizar los valores de ARNm. Los valores indican la media ± el error estándar. Test t-student, *p<0,05 y **p<0,01 con respecto a p53 WT GFP y p53 KO GFP respectivamente.

5 p53 regula la expresión de p63 en el hígado.

Una vez que estudiamos los efectos que tiene la falta de p53 en el metabolismo de lípidico hepático, intentamos averiguar qué mecanismos regulan estos efectos. Existen varias dianas *downstream* de p53 relacionados con la regulación del metabolismo lipídico en el hígado como Bax, p66 shc y p21^{239,276}. Tras comprobar su expresión en ratones p53 KO no se encontró ningún cambio significativo (figura 18A). Por tanto, se estudiaron otros miembros de la familia p53 que median la apoptosis dependiente de p53²⁷⁷; de nuevo, mediante el estudio de la expresión proteica, no se encontraron cambios en los niveles de p73 en el hígado de ratones p53 KO, pero sí un incremento significativo en los niveles de p63. Esto nos llevó a estudiar en nuestros modelos la expresión de p63 (Figura 18B-D).

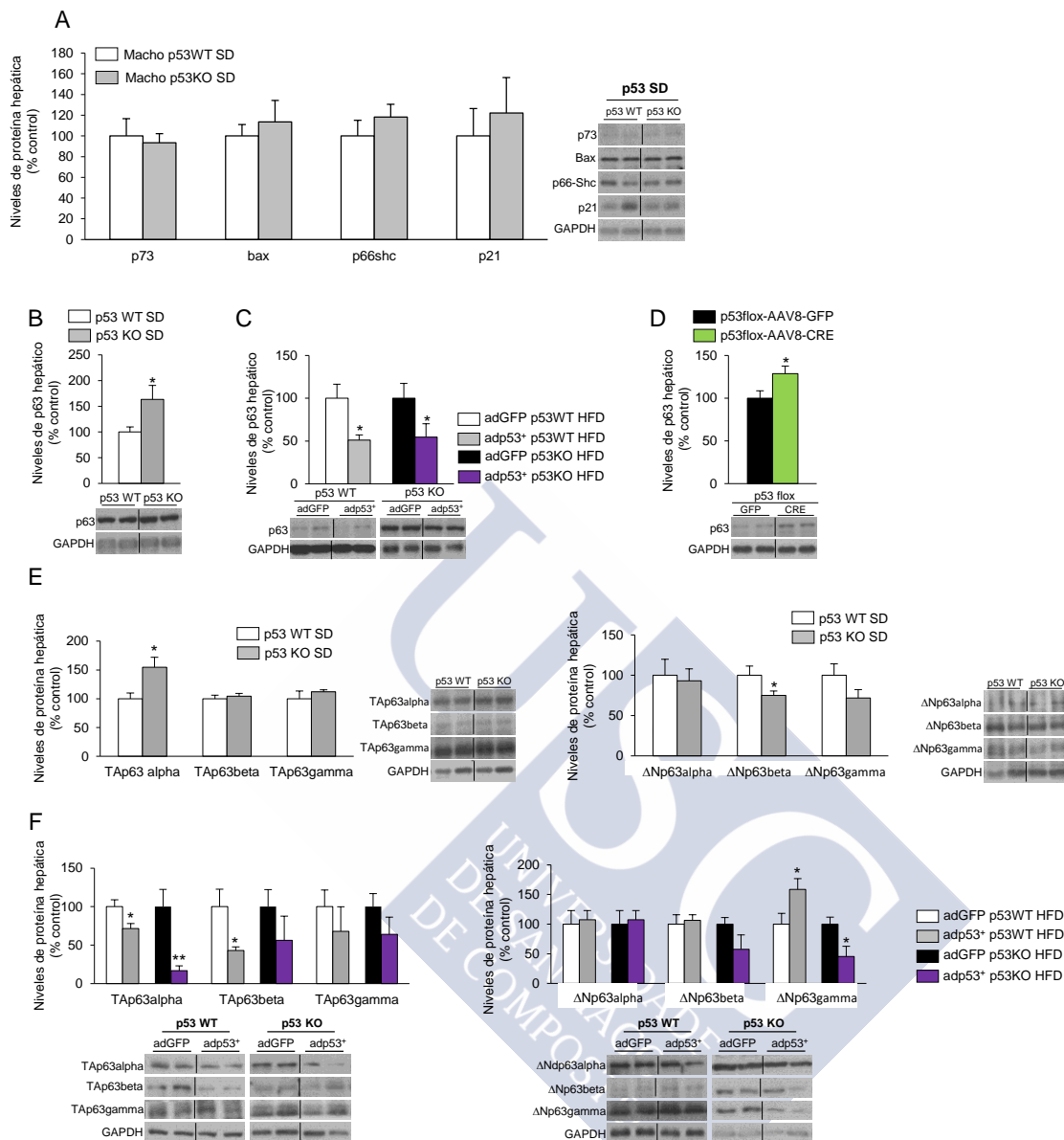


Figura 18. p53 regula la expresión de p63 en el hígado. (A) Cuantificación de la expresión de dianas por debajo de p53 (p73, bax, p66shc y p21) en ratones p53 KO SD (n = 7 por grupo). **(B)** Cuantificación de la expresión de p63 en el hígado de ratones p53 KO SD (n = 7 por grupo). **(C)** Niveles de expresión de p63 en ratones p53 WT y KO HFD con inyección de adenovirus p53 dominante positivo y GFP (n = 6 GFP y n = 5 adp53+ en los p53 WT y n = 5 GFP y n = 4 adp53+). **(D)** Cuantificación de la expresión de p63 en ratones p53 flox-Cre y p53 flox-GFP (n = 7 por grupo). **(E)** Cuantificación de la expresión de las isoformas de TAp63 y ΔNp63 en p53 KO SD (n = 7 por grupo). **(F)** Cuantificación de las distintas isoformas de TAp63 y ΔNp63 en p53 KO HFD. Se utilizó GAPDH para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar. Test t-student, *p<0,05 y **p<0,01 con respecto al control.

p63 pertenece a una familia de factores de transcripción, como p53 y p73; se sintetiza a partir de dos promotores distintos dando lugar a dos proteínas: TAp63 que contiene un dominio de transactivación completo y ΔNp63 con el extremo N-terminal truncado, es decir, le falta parte de ese dominio de transactivación pero mantiene la capacidad para actuar como factor de transcripción²⁰¹. Como hemos explicado anteriormente, en ambas proteínas, un *splicing*

alternativo en el extremo C-terminal, da lugar a distintas isoformas. Quisimos estudiar en nuestros modelos animales la expresión de dichas isoformas cuantificando los niveles de proteína en el hígado de los ratones p53 KO en dieta estándar. Los resultados nos indicaron que la isoforma TAp63 α aumentó de forma significativa, reproduciendo así, los resultados encontrados midiendo p63 total; mientras que la expresión de TAp63 β y TAp63 γ disminuyó. Las isoformas de la proteína Δ Np63 no presentan cambios (Figura 18E). Luego, se midió la expresión de estas proteínas en nuestro modelo de ratones p53 KO y p53 WT en HFD donde se recuperó la expresión de p53 mediante un adenovirus que sobreexpres p53 y su control GFP. Se encontró que TAp63 α disminuye significativamente en los ratones en los que se recuperó la expresión de p53, tanto en los ratones WT como en los KO (Figura 14F). TAp63 β disminuye en los ratones WT donde se sobreexpresó p53, pero no en los ratones p53 KO; TAp63 γ no presentó ningún cambio. Los niveles de las isoformas Δ Np63 α y Δ Np63 β no cambian, pero los niveles de Δ Np63 γ aumentan en los ratones p53 WT inyectados con el adenovirus p53 dominante positivo; no vimos este efecto en los ratones p53 KO (Figura 18F). En resumen, todos estos resultados indican que TAp63 α es la única isoforma que se regula de una manera homogénea en el hígado, incrementando sus niveles cuando no hay p53 mientras que disminuye cuando sobre-expresamos p53.

5.1 LOS NIVELES HEPÁTICOS DE TAP63 AUMENTAN CON DIETA ALTA EN GRASA.

Se sabe que las dietas altas en grasa provocan esteatosis hepática e incrementan el estrés del RE por lo que diseñamos un experimento en el que alimentamos a ratones de la cepa C57BL6 con dieta estándar y HFD (60% de grasa) durante 2 y cuatro semanas. Tras finalizar este tiempo, medimos los niveles de las isoformas de TAp63 y Δ Np63 en el hígado. Se observó el incremento de peso corporal (Figura 19A) y la disminución en la ingesta (Figura 19B) esperados. En cuanto a p63, encontramos que TAp63 α es la única isoforma que aumenta de forma consistente tanto a 2 como a 4 semanas de dieta alta en grasa; por otro lado, TAp63 β disminuye y TAp63 γ solo aumenta tras 4 semanas de dieta (Figura 19C). Cuando estudiamos las isoformas de Δ Np63, los resultados no fueron consistentes ya que detectamos niveles elevados de Δ Np63 α y Δ Np63 γ solo a 2 semanas de dieta; mientras a 4 semanas de dieta, las tres isoformas disminuyen (Figura 19C). Además, se observó que el aumento de los niveles de TAp63 α precede a los cambios en la respuesta al estrés del RE y a la lipogénesis ya que dichos marcadores permanecen sin cambios a las 2 semanas de dieta y FAS se encontraba disminuido de forma significativa (Figura 19D).

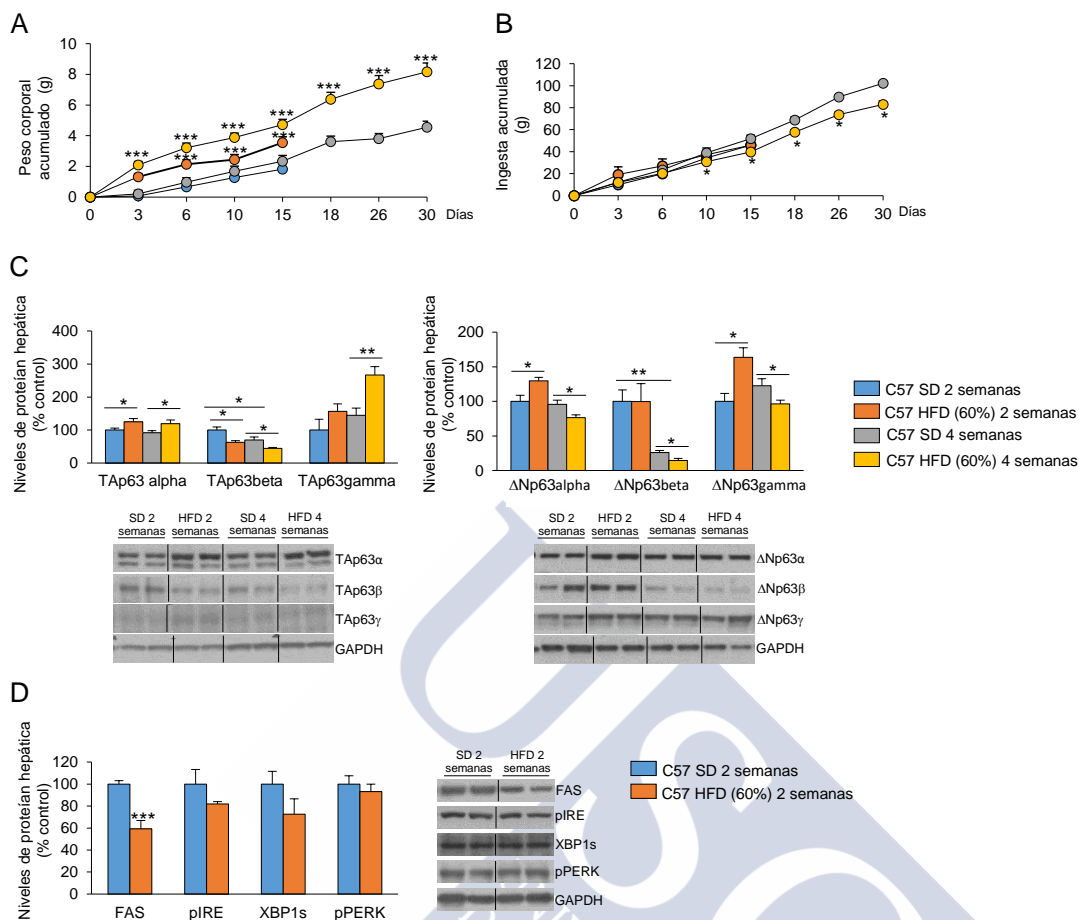


Figura 19. TAp63 α aumenta en dieta alta en grasa. (A) Cambios en el peso corporal (n = 10 por grupo). (B) Cambios en la ingesta (n = 10 por grupo). (C) Cuantificación de la expresión de las isoformas de TAp63 y Δ Np63 tras 2 y 4 semanas en dieta alta en grasa (n = 6 por grupo). (D) Cuantificación de la expresión de FAS, pIRE, XBP1s y pPERK en el hígado de ratones alimentados con dieta estándar y alta en grasa durante 2 semanas (n = 7 por grupo). Se utilizó GAPDH para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media \pm el error estándar. Test t-student, *p<0,05; **p<0,01 y *p<0,001 con respecto al control.**

5.2 LA INHIBICIÓN DE P63 MEJORA LA ESTEATOSIS HEPÁTICA PROVOCADA POR LA INACTIVACIÓN DE P53.

Dados los efectos que provoca en la expresión de p63 la manipulación de p53, nos propusimos realizar un experimento para investigar si la inhibición hepática de p63 puede revertir el daño creado por la falta de p53. Para ello utilizamos ratones p53 flox a los que se le inyectó el virus adenoasociado Cre junto con un lentivirus que codifica un RNA horquilla (shRNA) contra el ARNm de p63 y su control GFP. La administración de los virus se realizó a través de la vena de la cola para que ambos virus infecten de forma específica el hígado. La eficiencia de la infección con el lentivirus se confirmó mediante una disminución significativa de los niveles de la proteína p63 (Figura 20A). Un mes después de la infección con el shRNA para p63, los ratones mostraron una menor cantidad de gotas lipídicas en los hepatocitos comparados con sus controles, ratones p53flox-Cre y lentivirus para GFP (Figura 20B). También se halló una disminución de los niveles hepáticos de triglicéridos y de transaminasas

en suero; sin cambios en los niveles de triglicéridos en suero (Figura 20C). La disminución de la esteatosis hepática en los ratones que expresan niveles bajos tanto de p53 como de p63 es consistente con una disminución de la expresión de proteínas como FAS, pJNK y marcadores de estrés de RE como pPERK y XBP1s (Figura 20D). En este caso no encontramos diferencias en la proteína ApoB (Figura 16D) ni tampoco cambios en los genes marcadores de oxidación, CPT1, ACADM, ACADL y FATP2 (Figura 20E).

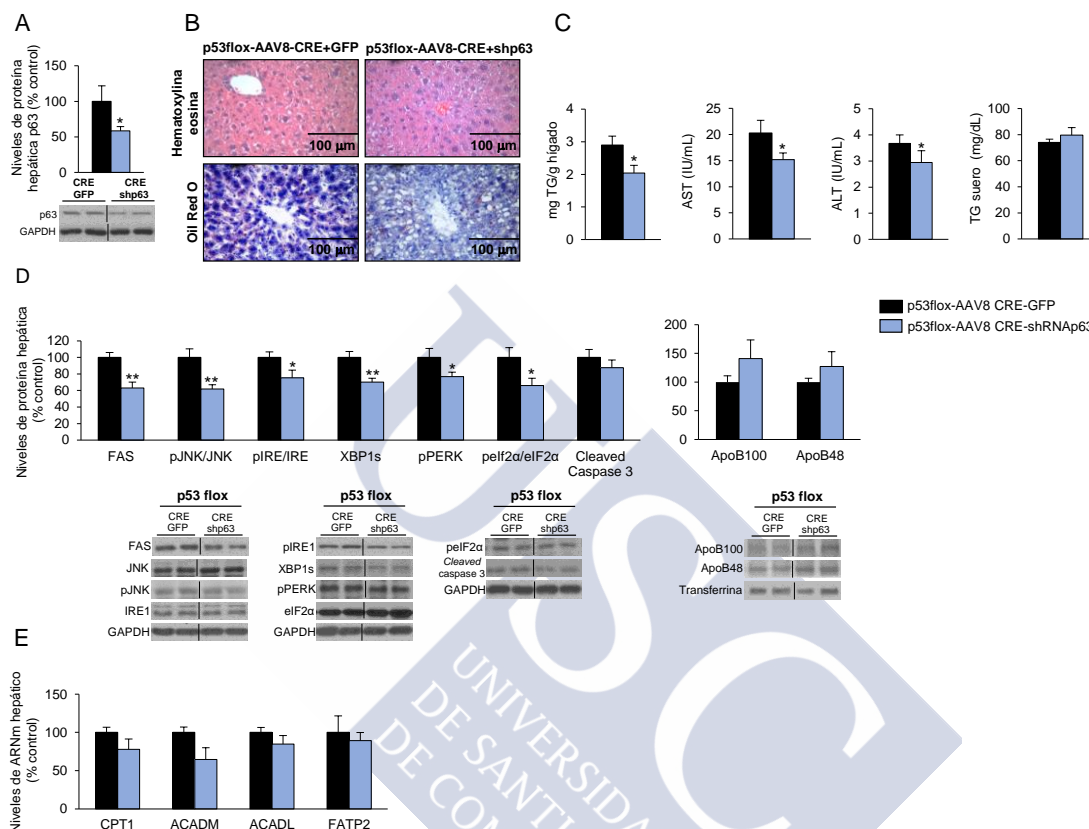


Figura 20. Efectos de la inhibición hepática simultánea de p63 y p53 en dieta estándar (A) Cuantificación de los niveles de p63 total tras un mes de la inyección de lentivirus (n = 7 por grupo). (B) Tinción eosina hematoxilina y Oil Red O en cortes histológicos de hígado de ratones (n = 3 por grupo). (C) Contenido hepático de triglicéridos y niveles en suero de transaminasas y triglicéridos (n = 8 por grupo). (D) Cuantificación de la expresión de FAS, pJNK/JNK, pIRE/IRE, XBP1s, pPERK, pelf2α/eIF2α, cleaved caspasa 3 y ApoB (n = 5 por grupo). (E) Niveles de expresión de los genes CPT1, ACADM, ACADL y FATP2. Se utilizó GAPDH para normalizar los niveles de proteína y HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los valores indican la media ± el error estándar. Test t-student, *p<0,05 y **p<0,01 con respecto al control p53 flox-Cre con lentivirus GFP.

5.3 LA INHIBICIÓN DE P63 MEJORA LA ESTEATOSIS HEPÁTICA PROVOCADA POR UNA DIETA ALTA EN GRASA.

El siguiente experimento que nos propusimos fue comprobar la eficiencia del silenciamiento de p63 en ratones obesos. Un mes después de la inyección a través de la vena de la cola del lentivirus que codifica un shRNA para p63 y su respectivo control, GFP, se encontró una mejora del estado hepático. Comprobamos de nuevo la eficiencia del silenciamiento mediante western blot (Figura 21A). Se observaron menos gotas lipídicas en los cortes histológicos (Figura 21B), menor contenido hepático de TG y de transaminasas en suero sin

cambios en niveles de TG circulantes (Figura 21C). De acuerdo con esta mejora del estado hepático, se observó una menor expresión de las proteínas FAS, pJNK/JNK, XBP1s, pPERK, peIF2 α /eiF2 α . En este experimento ApoB100 se redujo de forma significativa tras el silenciamiento de p63; no fue así con ApoB48 (Figura 21D). Tampoco se encontraron cambios en los niveles de los genes de oxidación CPT1, ACADM, ACADL y FATP2 (Figura 21E).

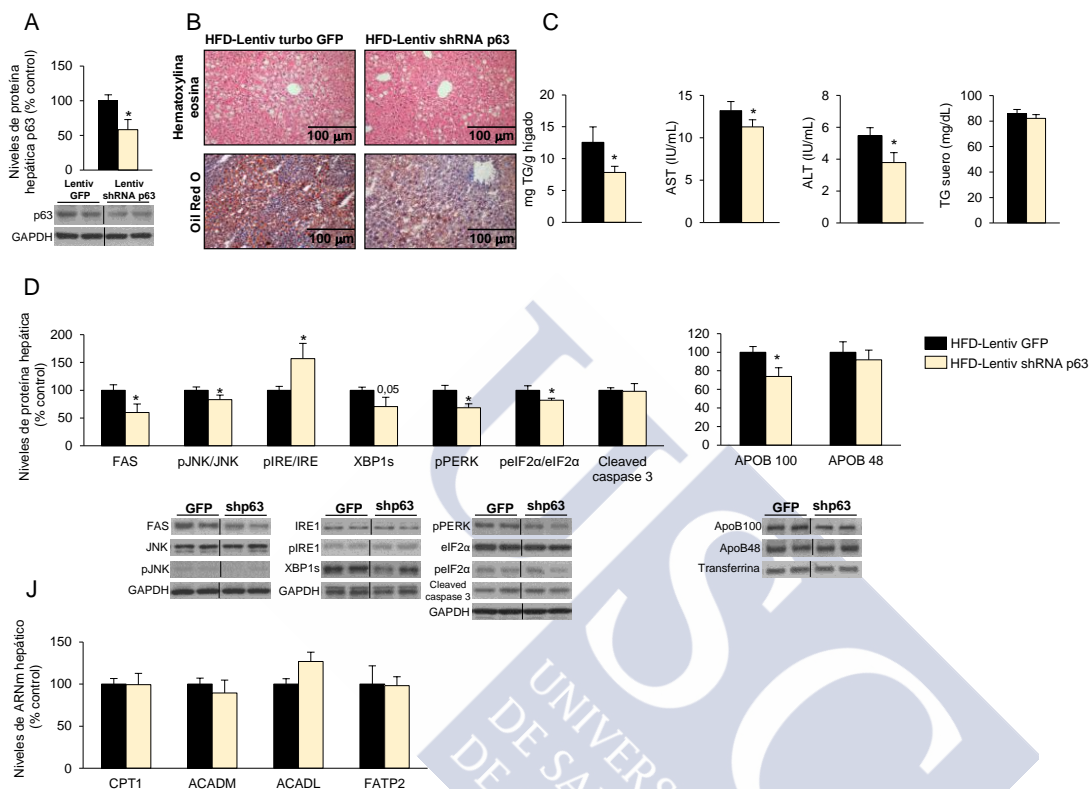


Figura 21. Efectos de la inhibición hepática simultánea de p63 en ratones obesos. (A) Cuantificación de los niveles de p63 total tras un mes de la inyección de lentivirus (n = 7 por grupo). **(B)** Tinción eosina hematoxilina y Oil Red O en cortes histológicos de hígado de ratones (n = 3 por grupo). **(C)** Contenido hepático de triglicéridos y niveles en suero de transaminasas y triglicéridos (n = 11 GFP y 13 shRNA p63). **(D)** Cuantificación de la expresión de FAS, pJNK/JNK, pIRE/IRE, XBP1s, pPERK, peIF2 α /eiF2 α , cleaved caspasa 3 y ApoB (n = 7 por grupo). **(E)** Niveles de expresión de los genes CPT1, ACADM, ACADL y FATP2. Se utilizó GAPDH para normalizar los niveles de proteína y HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los valores indican la media \pm el error estándar. Test t-student, *p<0,05 con respecto al control lentivirus GFP.

5.4 LA SOBREEXPRESIÓN DE TAP63 PROVOCA ESTEATOSIS.

5.4.1 La inhibición farmacológica del estrés del retículo endoplasmático revierte la esteatosis provocada por la sobreexpresión de TAp63 α .

Para conseguir la sobreexpresión de la isoforma TAp63 α en el hígado, se inyectó a través de la vena de la cola un virus adenoasociado para p63 (AAV8-TAp63 α) y su control GFP (AAV8-GFP). Tres semanas después de la infección con el virus, se inició el tratamiento para reducir el estrés de RE con una chaperona química, TUDCA²⁷⁸, inyectándolo de forma intraperitoneal durante una semana. Los niveles hepáticos de la proteína TAp63 α incrementaron

significativamente tras un mes de infección con el virus (Figura 22A). Los ratones, alimentados con dieta estándar, mostraron una mayor cantidad de gotas lipídicas en los hepatocitos debido a la sobreexpresión de p63 (Figura 22B), niveles elevados de TG hepáticos y un incremento de AST en suero (Figura 22C). Asociamos este mayor contenido en grasa en el hígado con una estimulación del estrés de RE debido a que se incrementó la expresión de diversos marcadores de respuesta a dicho estrés como XBP1s y p $\text{eIF}2\alpha/\text{eIF}2\alpha$ (Figura 22D). Todos estos efectos se pudieron revertir tras el tratamiento con TUDCA (Figura 22B-D). En cuanto a la oxidación de lípidos, la sobreexpresión de TAp63 α redujo los niveles de CPT1 y ACADM, pero el tratamiento con TUDCA no fue capaz de modificar este perfil (Figura 22E).

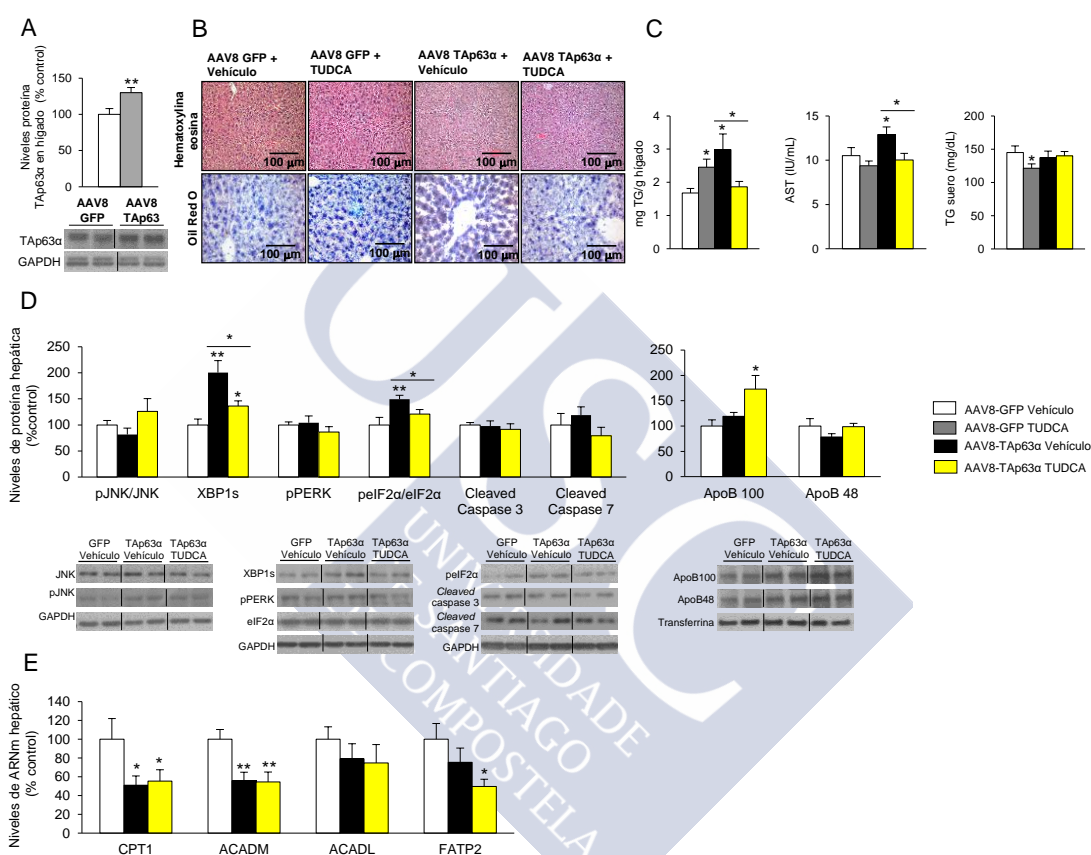


Figura 22. Efectos de la sobreexpresión hepática simultánea de TAp63 α en ratones obesos. . (A) Cuantificación de los niveles de TAp63 α tras un mes de la inyección del virus (n = 7 por grupo). (B) Tinción eosina hematoxilina y Oil Red O en cortes histológicos de hígado de ratones (n = 4 por grupo). (C) Contenido hepático de triglicéridos y niveles en suero de transaminasas y triglicéridos (n = 9 GFP y 10 TAp63 α). (D) Cuantificación de la expresión de FAS, pJNK/JNK, pIRE/IRE, XBP1s, pPERK, p $\text{eIF}2\alpha/\text{eIF}2\alpha$, cleaved caspasa 3 y ApoB (n = 7 por grupo). (E) Niveles de expresión de los genes CPT1, ACADM, ACADL y FATP2 (n = 8 por grupo). Se utilizó GAPDH y transferrina para normalizar los niveles de proteína y HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los valores indican la media \pm el error estándar. Test t-student, *p<0,05 y **p<0,01 con respecto al control AAV-GFP.

5.4.2 La inhibición genética del estrés del retículo endoplasmático revierte la esteatosis provocada por la sobreexpresión de TAp63 α .

Decidimos realizar una segunda aproximación para intentar revertir el estrés de RE generado por la sobreexpresión de TAp63 α . De nuevo se utilizó un AAV inyectado a través de la cola para aumentar la expresión de p63 en hígado. A las tres semanas de infección, se

administró a través de la vena de la cola un adenovirus que codifica para una chaperona, la proteína reguladora de glucosa 78, conocida por sus siglas GRP78 y su control GFP. Esta chaperona facilita un adecuado plegamiento de las proteínas actuando en la parte alta de la ruta de respuesta al estrés de retículo endoplásmico. Se comprobó la eficiencia de la infección con el adenovirus para GRP78 mediante una cuantificación de la expresión de la proteína en el hígado. Se observó que el daño hepático causado por la sobreexpresión de TAp63 α , aumento de gotas lipídicas en los hepatocitos, TG hepáticos, AST y aumento en la expresión de marcadores proteicos de estrés de RE y de FAS, se redujo tras el aumento de la chaperona GPR78. Sin embargo, no se detectaron cambios en la oxidación hepática (Figura 23).

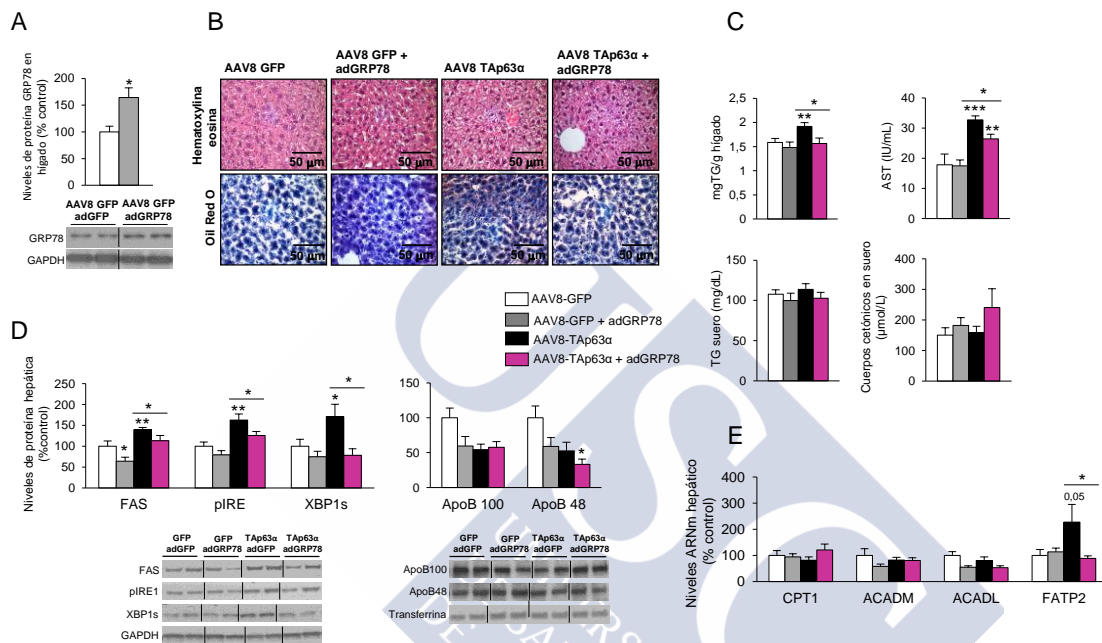


Figura 23. Efectos de la sobreexpresión hepática simultánea de TAp63 α e inhibición genética del estrés de RE. (A) Cuantificación de los niveles de GPR78 (n = 7 por grupo). (B) Tinción eosina hematoxilina y Oil Red O en cortes histológicos de hígado de ratones (n = 4 por grupo). (C) Contenido hepático de triglicéridos y niveles en suero de transaminasas, triglicéridos y cuerpos cetónicos (n = 9 por grupo). (D) Cuantificación de la expresión de FAS, pIRE/IRE, XBP1s, y ApoB (n = 7 por grupo). (E) Niveles de expresión de los genes CPT1, ACADM, ACADL y FATP2 (n = 8 por grupo). Se utilizó GAPDH y transferrina para normalizar los niveles de proteína y HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los valores indican la media \pm el error estándar. Test t-student, *p<0,05 y **p<0,01 con respecto al control AAV-GFP.

5.5 LOS CAMBIOS EN EL ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO PROVOCADOS POR LA SOBREEXPRESIÓN DE TAP63A OCURREN ANTES QUE LA ESTEATOSIS.

Algunos estudios han demostrado que el estrés del RE incrementa la lipogénesis, mientras que otros indican que este estrés es una consecuencia de un aumento en la lipogénesis. Para estudiar la ruta que media los efectos hepáticos de p63 en la lipogénesis, se sobreexpresó TAp63 α en el hígado durante solo dos semanas. En el hígado de estos ratones, en dieta estándar, se encontró un aumento significativo en la cantidad de TG y del marcador de estrés de RE, XBP1s, sin cambios en FAS (Figura 24A,B); esto nos indicó que los cambios hepáticos de estrés del RE en el hígado ocurren antes que el incremento de la lipogénesis, medida como un

aumento de la proteína FAS. Quisimos confirmar estos datos con otro estudio, también en ratones alimentados con dieta estándar. En este caso, se sobre-expresó TAp63 α durante un mes y durante los últimos tres días se inyectó por vía intraperitoneal a un grupo de ratones un inhibidor específico de FAS, el C75. Como esperábamos, C75 redujo la actividad de FAS (Figura 24E) y, además, fue capaz de reducir la cantidad de TG hepáticos acumulados debido a la sobreexpresión de TAp63 α . Todos estos efectos ocurrieron sin hallar cambios en XBP1s (Figura 24C, D y F). Por tanto, estos resultados nos indicaron que el estrés del RE ocurre antes que la lipogénesis.

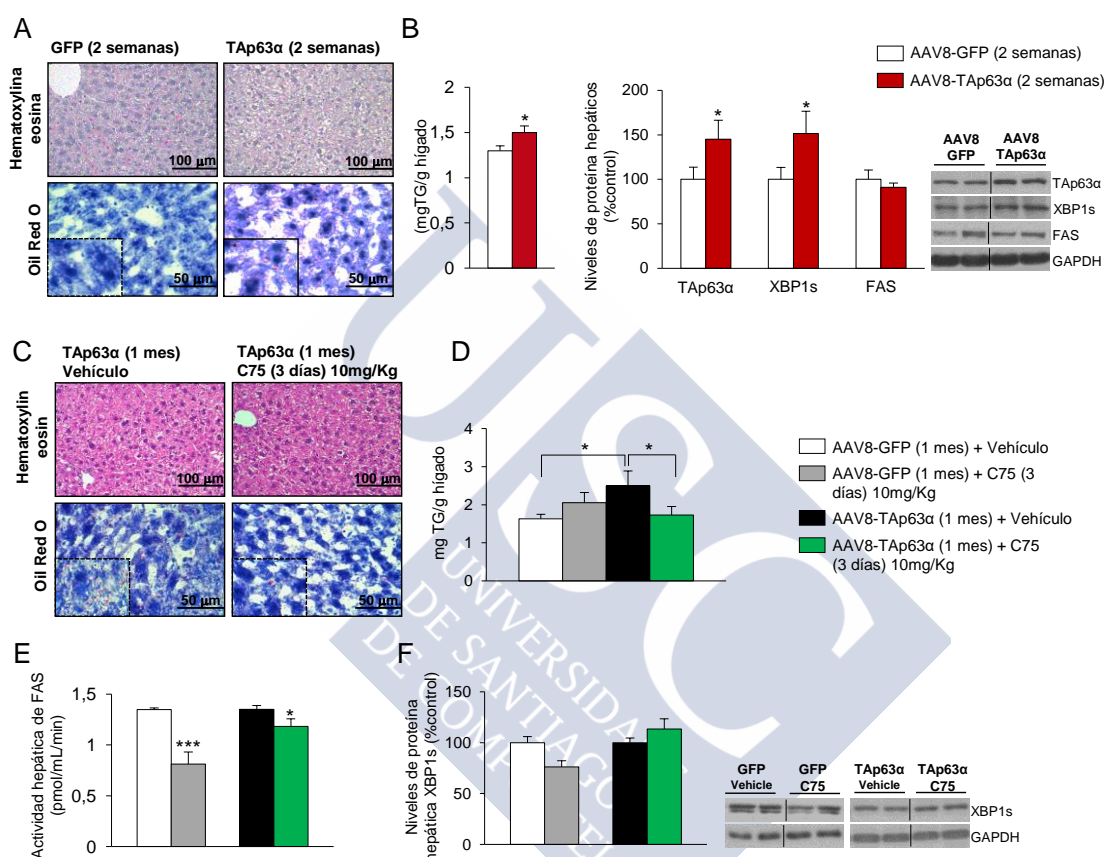


Figura 24. La lipogénesis causada por la sobreexpresión de TAp63 α es posterior al estrés del RE. (A) Tinción hematoxilina eosina y Oil Red O en cortes histológicos de hígado (n = 3 por grupo). (B) Cuantificación de triglicéridos hepáticos y niveles de expresión de las proteínas TAp63 α , XBP1s y FAS (n = 6 por grupo). (C) Cortes histológicos de hígado con las tinciones hematoxilina eosina y Oil Red O (n = 3 por grupo). (D) Contenido hepático de triglicéridos (n = 8 por grupo). (E) Actividad enzimática de FAS en el hígado (n = 8 por grupo). (F) Cuantificación de las proteína XBP1s (n = 7 por grupo). Se utilizó GAPDH para normalizar los niveles de proteína y HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los valores indican la media \pm el error estándar. Test t-student, *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001 con respecto al control AAV-GFP.

5.6 IKK: LA UNIÓN ENTRE P63 Y EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.

Nuestro siguiente objetivo fue indagar acerca del mecanismo que hace que p63 en el hígado incremente el estrés del RE. Estudios previos indican que IKK es una diana de acción de p63 y que IKK α e IKK β están involucradas en la lipogénesis. Por ello, decidimos medir los niveles de expresión de las formas fosforiladas tanto de IKK α e IKK β en nuestros modelos de ratones donde sobreexpresamos e inhibimos TAp63 α . Encontramos que pIKK β y el ARNm, pero no

la proteína total, se encuentra incrementadas de forma significativa un mes después de la sobreexpresión de p63 en el hígado (Figura 25A). Por otro lado, encontramos una disminución significativa de los niveles de pIKK β tras la inhibición de p63 en el hígado en ratones obesos; si embargo, no encontramos cambios en el ARNm ni en los niveles de proteína total (Figura 25B). Los niveles de pIKK α permanecieron sin cambios después de la manipulación hepática de p63 (Figura 25 A, B). Estos resultados indican que la manipulación de TAp63 α regula la fosforilación de IKK β .

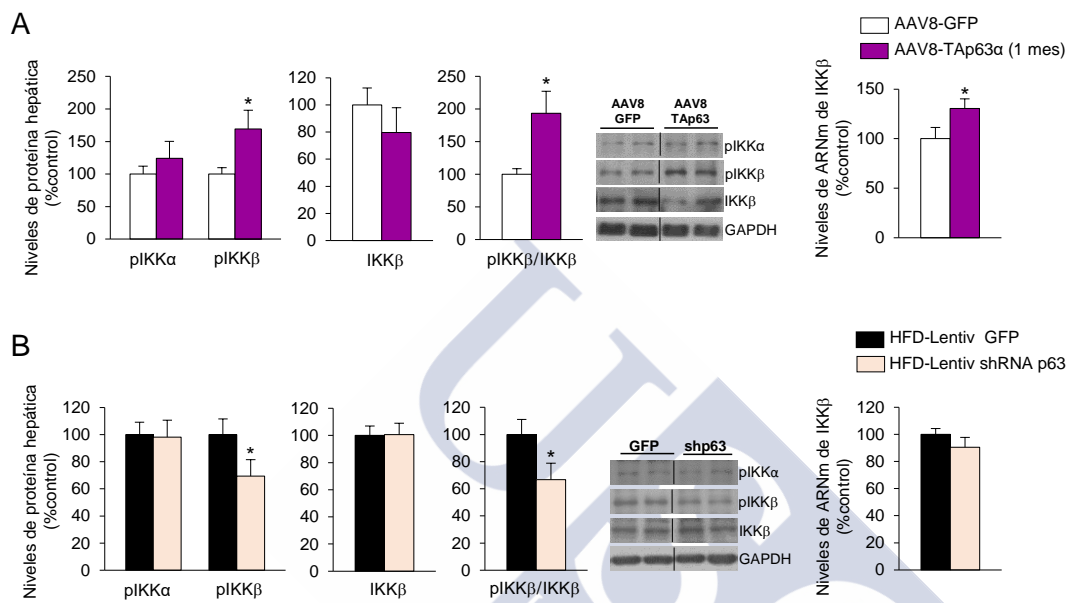


Figura 25. IKK β media la acción hepática de p63 en el desarrollo del estrés de RE. (A) Cuantificación de las proteínas fosforiladas IKK α e IKK β , proteína total de IKK β y nivel de ARNm de IKK β en el hígado de ratones tras un mes de infección con un virus adenoasociado para TAp63 α (n = 7-8 por grupo). **(B)** Cuantificación de las proteínas fosforiladas IKK α e IKK β , proteína total de IKK β y nivel de ARNm de IKK β en el hígado de ratones obesos tras un mes de silenciamiento de p63 con un shRNA específico. Se utilizó GAPDH para normalizar los niveles de proteína y HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los valores indican la media \pm el error estándar. Test t-student, *p<0,05 con respecto al control.

6 Efectos de la manipulación genética de p63 en hepatocitos humanos.

6.1 LA SOBREENPRESIÓN DE TAP63 INCREMENTA LA CANTIDAD DE LÍPIDO Y UN INCREMENTO DEL ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.

Para realizar estos experimentos se seleccionó una línea celular inmortalizada de hepatocitos procedentes de células normales de hígado, THLE2. Para comprobar los efectos de la sobreexpresión de p63 en el metabolismo lipídico, se emplearon plásmidos comerciales para las isoformas TAp63 α y Δ Np63 α . 24h después de la infección se realizó una inmunofluorescencia con Bodipy, una sonda comercial que tiñe de verde los lípidos. Los

resultados nos mostraron que solo la isoforma TAp63 α fue capaz de incrementar la cantidad de lípidos en los hepatocitos, mientras que tras la sobreexpresión con Δ Np63 α no observamos cambios (Figura 26A). A nivel proteico, se observó un incremento de XBP1s, como marcador de estrés de RE y de FAS como marcador de la lipogénesis (Figura 26B). En relación con el estrés de RE se realizó un experimento con otra línea celular de hepatocitos humanos, pero en esta ocasión tumorales, HepG2, en el que se encontró que la sobreexpresión de TAp63 α induce la fragmentación del retículo endoplásmico (Figura 26C).

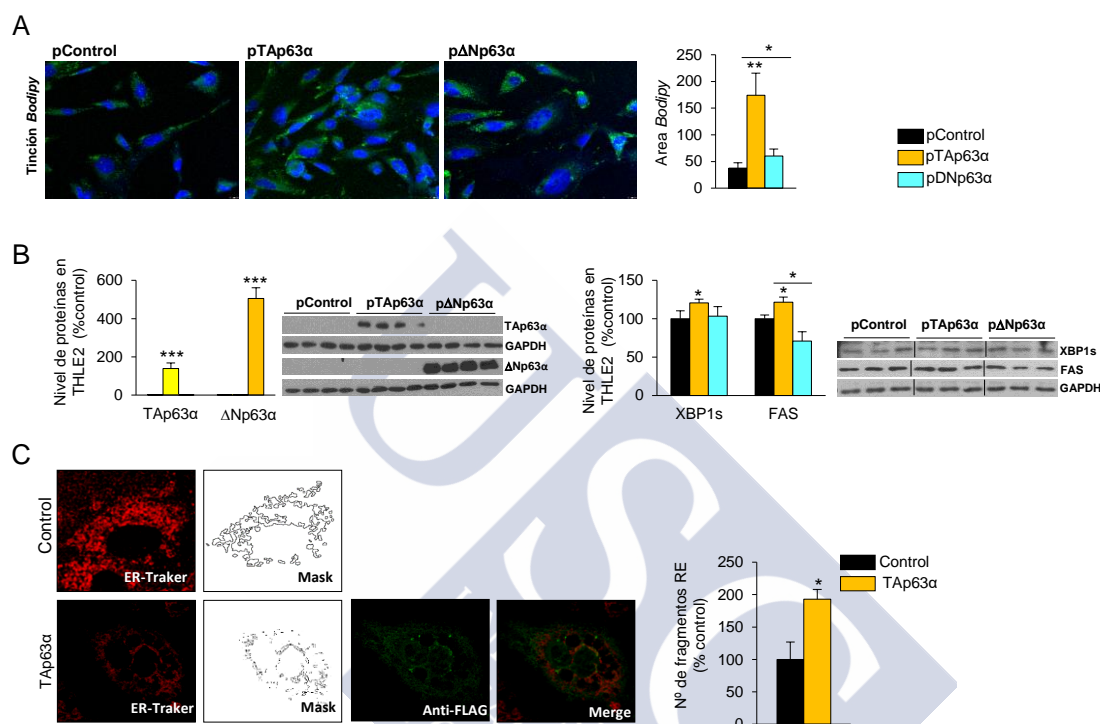


Figura 26. Efectos de la sobreexpresión de p63 en THLE2. (A) Imágenes de microscopía confocal de células THLE2 con Bodipy que tiñe de verde los lípidos y Dapi que tiñe de azul los núcleos (63x) y cuantificación del área de Bodipy. (B) Cuantificación de los niveles de las proteínas TAp63 α , Δ Np63 α , XBP1s y FAS (n = 4 por grupo) en THLE2. (C) Imágenes de microscopía fluorescente de células HepG2 con doble tinción, en rojo un marcador de fragmentación del RE y en verde TAp63 α . Se utilizó GAPDH para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media \pm el error estándar. Test t-student, *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001 con respecto al control.

6.2 LA INHIBICIÓN TAP63 REVIERTE LA CANTIDAD DE LÍPIDOS ACUMULADOS POR EL ÁCIDO OLEICO

En un segundo experimento quisimos comprobar si, al igual que en nuestro modelo animal obeso con lentivirus para p63, eramos capaces de reducir la cantidad de grasa acumulada debido al tratamiento con ácido oleico. Para ello se silenció la expresión TAp63 α durante 24 horas y luego se expusieron a las células 24 horas más con ácido oleico. Encontramos que las células con una reducción de los niveles de TAp63 α (Figura 27B) mostraron una menor acumulación de lípidos (Figura 27A) y de los marcadores de estrés de RE (Figura 27B). Decidimos ver en este experimento la expresión de pIKK β y, como era de esperar, se encontraron niveles significativamente más bajos en las células donde silenciamos p63 (Figura 27B).

Como hemos visto en nuestro modelo en ratón, y confirmado en células con la disminución de pIKK β con el silenciamiento de TAp63 α , IKK β es el mediador de entre p63 y el desarrollo de sus efectos hepáticos. Por lo tanto, diseñamos un tercer experimento con las células THLE2 en las que se sobreexpresó de nuevo TAp63 y se silenció la expresión de IKK β con un siRNA específico. En primer lugar, se comprobó que el silenciamiento de IKK β no tiene efectos en condiciones basales en cuanto a acumulación de lípidos y estrés de RE (Figura 27C). Se pudo observar que el silenciamiento de IKK β revirtió la cantidad de lípidos acumulados y el estrés de RE generado por la sobreexpresión de TAp63 α (Figura 27D, E).

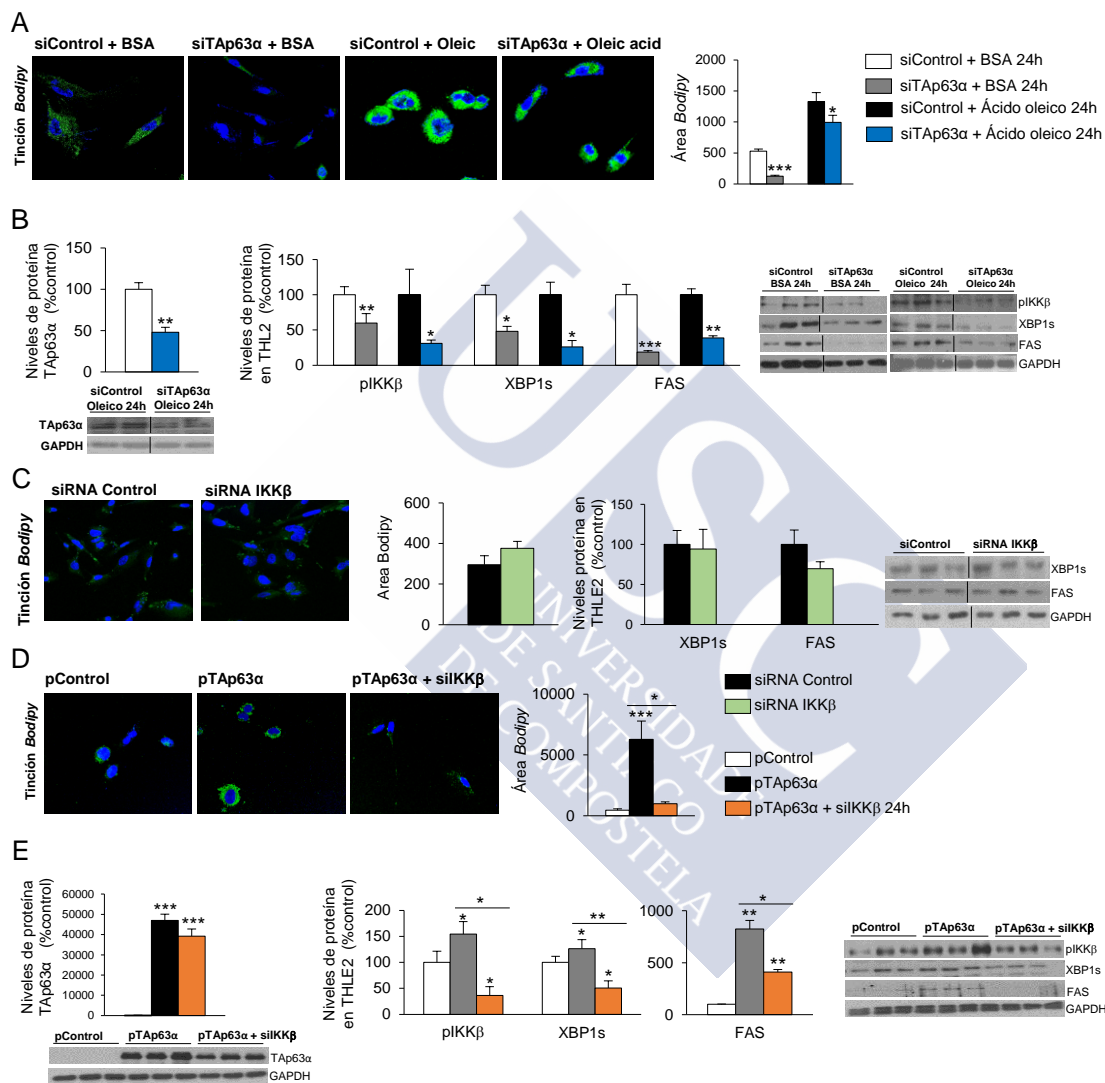


Figura 27. La inhibición de TAp63 α disminuye la acumulación lipídica vía IKK β en hepatocitos humanos con ácido oleico. (A) Imágenes de microscopía confocal de células THLE2 con Bodipy que tiñe de verde los lípidos y Dapi que tiñe de azul los núcleos (63x) y cuantificación del área de Bodipy. (B) Cuantificación de los niveles de las proteínas TAp63 α , pIKK β , XBP1s y FAS (n = 3 por grupo) en THLE2. (C,D) Imágenes de microscopía confocal de células THLE2 con doble tinción, Bodipy y Dapi junto con cuantificación del área de Bodipy. (E) Cuantificación de los niveles de las proteínas TAp63 α , pIKK β , XBP1s y FAS (n = 3 por grupo) en THLE2. Se utilizó GAPDH para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media \pm el error estándar. Test ANOVA de una vía seguido de un post-test Bonferroni, *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001 con respecto al control.

6.3 TAP63 α ESTIMULA LA LIPOGÉNESIS DE NOVO EN CÉLULAS THLE2

A continuación, se midió la lipogénesis *de novo*, la oxidación y el recambio lipídico en células THLE2 transfectadas con TAp63 α . Se encontró que la sobreexpresión de TAp63 α incrementó la síntesis *de novo* de TG y ácidos grasos, mientras que no se encontraron cambios significativos en la síntesis *de novo* de diacilglicerol, fosfolípidos, colesterol libre y esterificado (Figura 28A). La oxidación lipídica se midió como la oxidación del ácido palmítico completa (CO₂) e incompleta y no se observó ningún cambio (Figura 28B). Para llevar a cabo el experimento de recambio lipídico se realizó un doble marcaje radiactivo con oleico ³H y con glicerol ¹⁴C. Se realizaron estudios de pulso y caza de dichos sustratos radiactivos y se cuantifican los niveles de TG celular (dpm/mg de proteína). Además, se analizó la incorporación de los sustratos como cantidad de TG que se secretó al medio (TG en el medio, dmp/mg de proteína) por si al ver cambios podríamos tener una idea acerca de la secreción de VLDL. Por ultimo se estudió el porcentaje de TG secretado total, lo que nos indica cuánto de lo incorporado durante el pulso y caza se secreta. Como vemos en la Figura 28C, no se ha observado ningún cambio significativo.

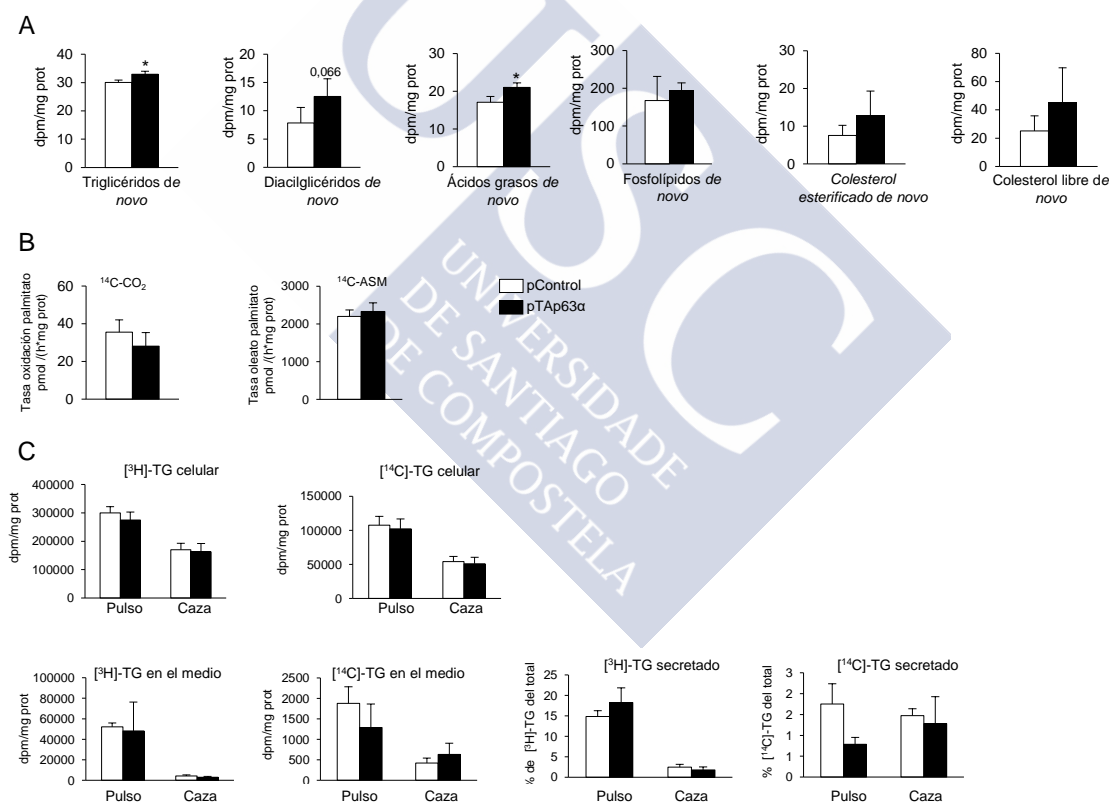


Figura 28. La sobreexpresión de TAp63 α incrementa la lipogénesis en células THLE2. (A) Síntesis de novo de triglicéridos, diacilglicéridos, ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol esterificado y libre (n = 4 por grupo). (B) Oxidación del ácido palmítico (n = 4 por grupo). (C) Recambio lipídico en células THLE2 transfectadas con plásmido control y plásmido TAp63 α . Los valores indican la media \pm el error estándar. Test t-student, *p<0,05 con respecto al control.

7 Estudio de los niveles de TAp63, IKK β y XBP1s en muestras humanas

Analizamos muestras de biopsias hepáticas procedentes de pacientes con NAFLD (IMC > 35Kg/m²) procedentes de dos cohortes diferentes; una utilizada para el estudio de la expresión de ARNm⁴; las características de estos pacientes se encuentran resumidas en la tabla 30. Una segunda cohorte para el estudio inmunohistoquímico⁵ de la expresión de TAp63 α ; las características de estos pacientes se encuentran resumidas en la tabla 31. Nuestros resultados muestran que existe una correlación positiva entre p63 y el IMC (Figura 29A), entre el NAS score y el índice de masa corporal (Figura 29B) y una clara tendencia entre p63 y el NAS score (Figura 29C). Además, encontramos una elevada expresión de p63, IKK β y XBP1s en pacientes con NAFLD comparándolos con individuos con un IMC < 35Kg/m². El análisis inmunohistoquímico de la expresión de TAp63 α corroboró los resultados, ya que se encuentran niveles más elevados en pacientes con NAFLD y NASH en comparación con pacientes control (IMC < 35Kg/m²).

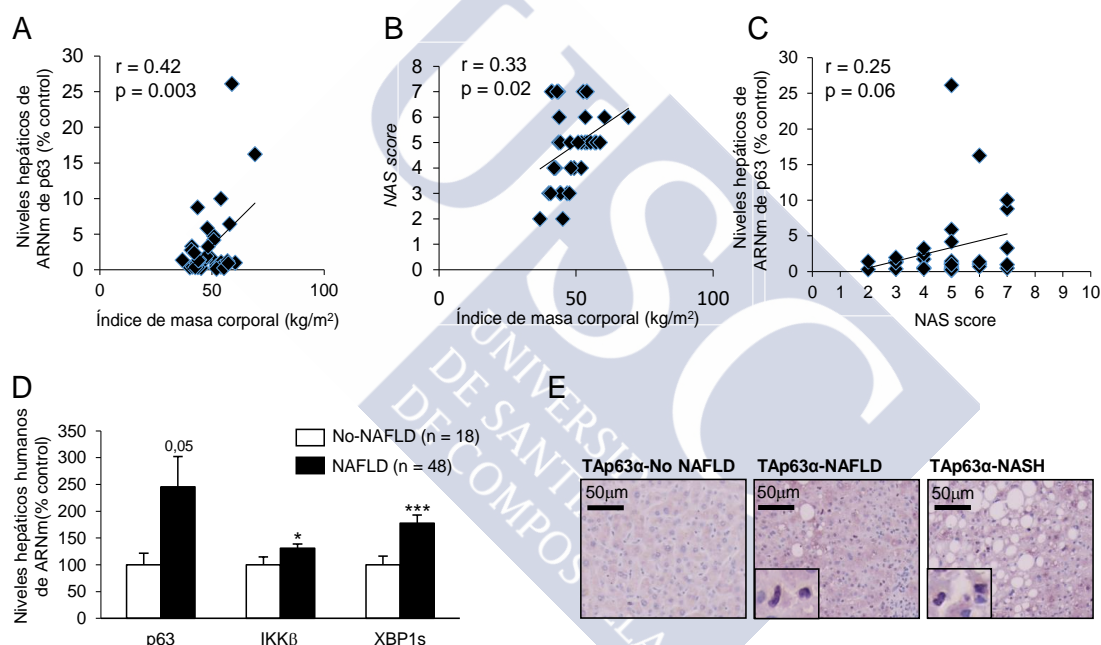


Figura 29. Datos clínicos y expresión de p63. Correlación entre (A) niveles de p63 e índice de masa corporal, (B) índice de masa corporal y NAS score y (C) niveles de p63 y NAS score. Las correlaciones entre los niveles de p63 y las diferentes variables de estudio se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson (si los datos siguen una distribución normal) o el coeficiente de correlación de Spearman (si los datos no siguen una distribución normal) (r). (D) Niveles hepáticos de ARNm de TAp63, IKK β y XBP1s en pacientes sin NAFLD ($n = 18$) y con NAFLD ($n = 48$). Se utilizó HRPT para normalizar los niveles de ARNm. Los valores indican la media \pm el error estándar. Test t-student, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ con respecto al control. (E) Fotos representativas de la inmunohistoquímica de TAp63 en cortes histológicos de pacientes sin NAFLD ($n = 11$), NAFLD ($n = 23$) y con NASH ($n = 19$) pacientes.

⁴ Las muestras pertenecientes a esta cohorte fueron cedidas por la Doctora Guadalupe Sabio; Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Las muestras fueron obtenidas en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander.

⁵ Las muestras pertenecientes a esta cohorte fueron cedidas por la Doctora María Luz Martínez Chantar; CIC bioGUNE, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). Las muestras fueron obtenidas en el Hospital Universitario de Salamanca por el Dr. Miguel Marcos.

Además, realizamos un estudio matemático para comprobar el grado de asociación entre p63 y los componentes del llamado NAFLD activity score (NAS) que abarcan el grado de esteatosis, la inflamación lobular y el *ballooning*. Encontramos que existe una fuerte y significativa asociación entre las muestras TAp63 α positivas (considerando positivo al menos 5 núcleos de hepatocitos marcados con TAp63 α) con el grado de esteatosis y el NAS score (Tabla 28).

	Chi Cuadrado	P	Odds Ratio (95% IC)
NAS	5.7651	0.0163	1.5367 (1.0527; 2.2433)
Esteatosis	4.8200	0.0281	1.9128 (1.0473; 3.4935)
Inflamación	2.3527	0.1251	2.1669 (0.7719; 6.0831)
Balooning	1.3474	0.2457	1.5406 (0.7430; 3.1943)
Fibrosis	0.9782	0.3226	1.5602 (0.6424; 3.7893)

Tabla 30. Relación logística entre TAp63 α y los parámetros que contribuyen al NAS score.

Variable	Obese patients with NAFLD (n = 35)	Controls (n = 11)	P
Age (years)	43.7 (11.4)	50.4 (17.5)	0.140
Female:male ratio	29:9	7:4	0.451
Hypertension (n)	15 (39.5)	2 (18.2)	0.287
Diabetes mellitus (n)	8 (21.1)	0 (0)	0.172
BMI (kg/m ²)	49.2 (6.9)	27.2 (4.24)	< 0.001*
Fasting blood sugar (mg/dL)	104.2 (34.4)	93.67 (14.3)	0.376
AST (IU/L)	24.8 (13.4)	21.0 (3.8)	0.137
ALT (IU/L)	30.8 (17.6)	28.4 (12.6)	0.703
Bilirubin (mg/dL)	0.43 (0.2)	0.49 (0.27)	0.383
Total cholesterol (mg/dL)	199.1 (33.6)	207.0 (37.3)	0.563
Triglycerides (mg/dL)	129.9 (50.0)	97.6 (38.3)	0.096
LDL-cholesterol (mg/dL)	118.7 (35.6)	124.8 (36.0)	0.668
HDL-cholesterol (mg/dL)	49.0 (13.2)	62.7 (18.5)	0.020*
NAS score	4.9 (1.5)	0	< 0.001*
Steatosis	2.1 (0.9)	0	< 0.001*
Lobular inflammation	1.6 (0.8)	0	< 0.001*
Hepatocyte ballooning	1.4 (0.6)	0	< 0.001*

Tabla 31. Datos obtenidos de los pacientes de la cohorte procedente del Hospital de Salamanca para el estudio de la expresión de p63 en el ARNm. Las variables se representan como la media y desviación estándar y se comparan las medias mediante test T de Student o con un test χ^2 .

NÚMERO DE PACIENTES	N= 39
GÉNERO (FEMENINO/MASCULINO)	21/18
EDAD (AÑOS)	45 ± 11
NAS SCORE 1-3 (N)	22
MEDIA	2.4 ± 1.0
NAS SCORE ≥ 4	17
MEDIA	4.5 ± 1.0

Tabla 30. Datos obtenidos de los pacientes de la cohorte procedente del Hospital de Santander para el estudio inmunohistoquímico de p63. La puntuación histológica se realizó de acuerdo a los criterios del NASH Clinical Research Network (NASH CRN)



DISCUSIÓN





DISCUSIÓN

Uno de los objetivos principales de esta tesis es el estudio de p53 en el metabolismo. Una característica esencial de las células tumorales es el cambio metabólico que sufren debido a las elevadas demandas energéticas debido al aumento de la proliferación celular. Por lo tanto, p53 desempeñará un papel importante en el desplazamiento metabólico de las células cancerosas, lo que sugiere una función fundamental en la regulación del metabolismo celular. De ahí que en los últimos años, se hayan acumulado una gran cantidad de datos acerca de p53 y su papel fundamental en el metabolismo, pero, como hemos mencionado a lo largo de la tesis, los resultados son controvertidos^{237-240,274,279-281}.

Comenzamos realizando el fenotipado metabólico de los ratones p53 KO con el fin de estudiar cuáles de los principales tejidos metabólicos se encontraban afectados por su deficiencia. Muchos estudios demostraron que p53 ejerce un papel importante en la homeostasis energética¹⁹⁵. Nuestros datos muestran que los ratones deficientes para p53 de forma global alimentados con dieta alta en grasa ganan menos peso y masa grasa antes de que desarrollen cualquier síntoma de presencia tumoral. Estas características se pueden explicar por el mayor gasto energético y el aumento de la actividad termogénica del BAT, consistente con observaciones anteriores²⁸². Existen estudios que demuestran que los ratones deficientes ganan más peso en comparación con los controles WT con niveles más bajos de la proteína UCP1 en BAT²⁸³. Sin embargo, otro estudio mostró que estos ratones eran resistentes a obesidad inducida por dieta y tenían niveles de UCP1 más elevados tanto en WAT como en BAT²⁸². Nuestros resultados están de acuerdo con este último estudio. Todos estos cambios son independientes de la ingesta de alimentos, de la tasa respiratoria o de la actividad locomotora. Nuestros hallazgos sugieren que el fenotipo de estos ratones es consecuencia de la energía disipada para generar calor en el BAT.

Se ha descrito que p53 se activa en los principales tejidos metabólicos, como el WAT o el hígado, en condiciones de obesidad inducida por dieta o genética^{224,237} y que la falta de p53 en el WAT produce alteraciones en la sensibilidad a insulina^{236,284}. Un estudio realizado por Yahagi *et al.* demuestra que p53 se encuentra activado en los adipocitos de ratones *ob/ob*, dando lugar a una regulación negativa de genes lipogénicos²²⁴. Existe, por tanto, un mecanismo de prevención de ganancia de adiposidad en animales ya obesos que conlleva una retroalimentación negativa entre p53 y la lipogénesis en el WAT. Esto encaja con nuestros resultados mostrando que la falta de p53 en ratones obesos da lugar a un incremento de enzimas lipogénicas y de oxidación en WAT. Estos resultados junto con el hecho de que estos ratones ganen menos grasa que sus controles, nos lleva a estudiar qué otros mecanismos pueden estar involucrados en la acción lipogénica de p53.

Dada la relación entre adiposidad y p53, nos pareció importante estudiar el papel de p53 en señales endocrinas implicadas en el desarrollo de adiposidad. Existen numerosos estudios donde se observa que la manipulación genética y farmacológica de la ghrelina afecta al peso y composición corporal. La administración central de la ghrelina incrementa la adiposidad y ganancia de peso⁶⁶⁻⁶⁸. De forma consistente con esto, otros estudios basados en manipulaciones genéticas en ratones, indican que la falta de ghrelina²⁸⁵ o su receptor²⁸⁶ hacen que acumulen

menos grasa que sus controles cuando son alimentados con dieta alta en grasa. Aunque la acción adipogénica de esta hormona peptídica es indudable, las rutas metabólicas por las que favorece la deposición lipídica siguen siendo, en parte, desconocidas. Los datos obtenidos a lo largo de esta tesis demuestran que p53 es crucial en la acción adipogénica de la ghrelina. Estos resultados parecen indicar que, la falta de p53 impide el almacenaje de los lípidos en el tejido adiposo y en el hígado.

La mayor parte de los efectos de la ghrelina se producen a través del receptor GHS-R1a (growth hormone secretagogue receptor, GHSR)⁶⁴, ampliamente expresado en el sistema nervioso central y tejidos periféricos^{287,288}. Aunque este receptor controla tanto los efectos adipogénicos como orexigénicos de la hormona, los mecanismos a través de los cuales ejerce su función son totalmente diferentes. Prueba de ello son los ratones con obesidad inducida por dieta, donde el efecto hiperfágico de la ghrelina desaparece^{73,289} conservando el efecto adipogénico²⁸⁹. Bajo nuestras condiciones experimentales, donde la ghrelina inyectada de forma crónica incrementa el peso corporal y la adiposidad en ratones p53 WT, no se producen alteraciones en la ingesta.

A nivel hipotalámico, la activación del receptor de la ghrelina (GHS-R1) en el hipotálamo provoca respuestas celulares que activan a SIRT1^{269,290}, la cual deacetila p53; estos cambios provocan la fosforilación de AMPK y aumento de la síntesis de novo de ácidos grasos, con una activación simultánea de la oxidación de los ácidos grasos²⁹¹. Debido a dichas modificaciones moleculares, se producen cambios en UCP2 y especies reactivas de oxígeno²⁹², incremento de la expresión de los factores Bsx²⁹³, FoxO1 y pCREB²⁴. La activación de estos factores de transcripción conduce en última instancia a la activación de la transcripción de los neuropéptidos orexigénicos NPY y AgRP²⁹⁴. En nuestros ratones, la inyección de ghrelina periférica provocó en el hipotálamo la disminución de los niveles de la proteína lipogénica FAS, diana que se encuentra más abajo en la ruta de señalización de p53 y AMPK^{291,295}.

A nivel periférico, los estudios que abordan los mecanismos moleculares por los cuales la ghrelina controla el metabolismo de los adipocitos, son escasos. Existen estudios in vitro donde se ha observado un incremento de la expresión del gen PPAR γ 2 tras la estimulación con ghrelina en un cultivo primario de adipocitos diferenciados mientras que en preadipocitos, la ghrelina estimula la actividad de glycerol-3-fosfato⁶⁹. Estudios in vivo demostraron que la ghrelina es capaz de promover la deposición de lípidos en el WAT y en el hígado mediante el incremento de la expresión de enzimas clave relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos: SCD1, ACC α y FAS. Sin embargo, los mecanismos moleculares que ocurren después de la activación del GHS-R1, pero antes del cambio en las enzimas involucradas en el metabolismo lipídico permanecen aun sin esclarecerse. En recientes estudios sobre el papel de la ghrelina en la regulación del metabolismo periférico, se ha demostrado que sus isoformas ghrelina acilado y UAG inhiben la lipólisis de los depósitos grasos tanto subcutáneo como visceral²⁹⁶.

Es importante resaltar que los ratones WT y deficientes en p53 alimentados con dieta estándar no mostraron diferencias en peso corporal, ingesta o composición corporal. Sin embargo, tienen niveles elevados de enzimas implicadas en el metabolismo lipídico en el tejido adiposo (SREBP1 y LPL) y en el hígado (ACC α y FAS) así como elevados niveles de TG hepáticos.

Curiosamente, encontramos que en los ratones deficientes en p53, la ghrelina no es capaz de estimular los genes responsables de dos funciones diferentes en el WAT: por un lado, genes involucrados en la captación y deposición (SREBP1c, FAS y LPL) y, por otro lado, aquellos que promueven la diferenciación (PPAR γ y CEBP α). A pesar de que el aumento de la ganancia de peso y de masa grasa en los ratones WT tratados con ghrelina no es estadísticamente significativo tras realizar un ANOVA de dos vías; es probable que con una mayor duración del tratamiento sí llegase a serlo. En este contexto, nuestros hallazgos indican entonces, que los cambios bioquímicos encontrados en el WAT y en el hígado se producen antes que los cambios de peso corporal y ganancia de masa grasa.

Otra cuestión importante a abordar fue si estas acciones de la ghrelina en tejidos periféricos estaban mediados a través de acciones de p53 en el cerebro. Nuestros hallazgos apoyan la hipótesis de que estas acciones podrían estar moduladas por p53 a nivel central ya que los resultados *in vitro* realizados en explantes de tejido adiposo incubados durante un periodo de tiempo largo con ghrelina, no mostraron ninguna alteración en la expresión de genes lipogénicos. A pesar de las numerosas evidencias previas del papel de p53 en el control de la adipogénesis^{284,297}.

En resumen, con estos experimentos, demostramos que p53 es esencial para la acción crónica de la ghrelina en el WAT y en el hígado (Figura 30) ya que regula la acción adipogénica y lipogénica de genes que, en último caso, llevan a un incremento de peso corporal.

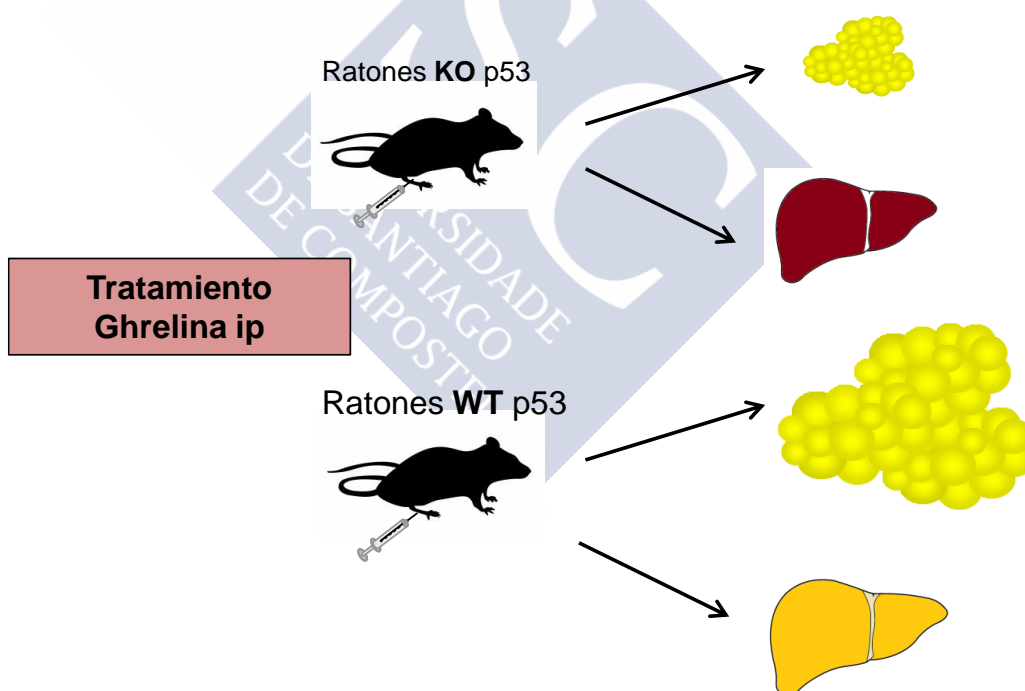


Figura 30. Representación esquemática de la acción adipogénica de la ghrelina en ratones p53 WT y KO.

Como hemos mencionado a lo largo de la tesis, existe una gran cantidad de estudios sobre el papel de p53 en el metabolismo hepático. Dada la ambigüedad de la literatura actual y que p53 se expresa en todas las células y tejidos metabólicamente activos, realizamos estudios de ganancia y pérdida de su función, específicamente en el hígado para evitar posibles contribuciones/compensaciones de p53 por parte de otros tejidos. Encontramos niveles elevados de grasa hepática en ratones deficientes para p53 a pesar del hecho de que ganan menos peso que los ratones control alimentados con dieta alta en grasa. Teóricamente este hecho podría explicarse en base a que las grasas no almacenadas en el WAT van al hígado y/o por un efecto dependiente de p53 hepática. Nuestros datos de cambios similares tras silenciamiento global de p53 y su silenciamiento específico a nivel hepático apoyan la segunda hipótesis sin que ello descarte un papel de p53 extrahepático (e.g a nivel central) en la regulación del WAT.

Los mecanismos moleculares que llevan a dicha acumulación hepática de lípidos incluyen la activación del estrés de RE y rutas metabólicas que favorecen el depósito lipídico. De forma más específica, nuestros datos demostraron una elevada lipogénesis *de novo* hepática, con niveles elevados de la enzima FAS en el hígado de ratones totalmente deficientes para p53 o bien en ratones donde se ha silenciado previamente la expresión de p53. Con respecto al estrés del RE, característica del hígado de ratones obesos²⁹⁸, encontramos sobre-expresados varios marcadores característicos de la UPR en el hígado de ratones deficientes en p53 de forma global y específica.

Comprobamos el papel específico de p53 en la atenuación de la esteatosis y estrés del RE inducido por dieta alta en grasa, recuperando los niveles de p53 en hígado de ratones KO. En la misma dirección que nuestros resultados, estudios anteriores también demostraron que la reducción global de p53 provoca hepatoesteatosis bajo condiciones de ayuno²⁴⁰, pero no se han identificado los mecanismos específicos que participan en este hecho. Teniendo todo esto en cuenta, los resultados sugieren que p53 ejerce una profunda influencia en el metabolismo hepático, ya que su pérdida lleva a marcados daños en el hígado. Además, estos efectos hepáticos son claramente independientes del estado nutricional ya que los ratones se alimentaron *ad libitum*. Ambos experimentos sugieren que la falta de p53 empeora la homeostasis lipídica en el hígado. Por eso, decidimos evaluar más a fondo la implicación de la vía de señalización más allá de p53, para descubrir posibles dianas farmacológicas.

Los niveles hepáticos de dianas posteriores a p53, como bax o p66shc, relacionadas con el metabolismo lipídico^{239,276} no se encuentran alterados en nuestros experimentos. Sin embargo, los niveles hepáticos de p63 se encuentran aumentados en los modelos en los que la ausencia de p53 es total o parcial; y lo que es más importante, la disminución hepática de p63 atenúa el estrés de RE y la deposición de lípidos asociados a la falta de p53. Esta interacción entre p63 y p53 es fuerte y puede complementar/antagonizar cada una de las demás funciones a nivel celular²²⁶. El silenciamiento hepático de p63 fue también suficiente para mejorar la esteatosis, y el estrés del RE.

De acuerdo con estos resultados procedentes de experimentos de pérdida de función, la sobreexpresión de p63 en el hígado incrementa los niveles de expresión de marcadores de estrés de RE, estimula la deposición de lípidos e induce esteatosis, confirmando que p63 es el mediador de los efectos asociados a la pérdida de la función de p53.

Distintos estudios demostraron interacciones opuestas entre p53 y p63 dependiendo del tejido y estado celular. Por ejemplo, la apoptosis dependiente de p53 en respuesta a daños en el ADN requiere p63 y p73 en el desarrollo del cerebro de ratón y fibroblastos embrionarios²⁹⁹. Sin embargo, en modelos murinos p63 (y p73) no contribuyen a la acción supresora tumoral de p53 en el desarrollo del linfoma³⁰⁰. Estudios más recientes han demostrado que p63 puede mostrar una actividad supresora de tumores similar o totalmente independiente de p53³⁰¹.

Otro aspecto importante de nuestro estudio fue descifrar qué isoforma de p63 es la responsable de los cambios en el metabolismo hepático de lípidos. Nuestros estudios indican que TAp63 α es la única isoforma inversamente regulada por p53 y positivamente regulada por dieta alta en grasa, mientras que otras isoformas de TAp63 y Δ Np63 no parecen estar reguladas por p53 o HFD. En la misma línea, nuestros estudios *in vitro* también sugieren que TAp63 α pero no Δ Np63 α es la responsable del incremento de lípidos en THLE2. En general, nuestros datos indican que TAp63 α es la isoforma que controla el metabolismo lipídico en el hígado. En este sentido, ratones con una deficiencia global de TAp63, son obesos, desarrollan esteatosis hepática y resistencia a insulina^{230,302}. Sin embargo, los ratones heterocigotos para p63 muestran una pérdida de peso³⁰³ y la razón por la cual esto ocurre no ha sido investigada. La discordancia entre nuestros resultados, que indican que TAp63 provoca esteatosis hepática, y los estudios anteriores en ratones a los que les falta TAp63, sugieren que el resultado de la desregulación de TAp63 es tejido-específica y que la falta global de TAp63 enmascara el papel de TAp63 en el hígado.

Para profundizar aún más en el papel de p53/p63 en el metabolismo hepático, estudiamos las rutas moleculares que controlan las acciones hepáticas de p63. La sobreexpresión de p63 induce el estrés de RE mientras que su inhibición lo reduce. La importancia del estrés de RE como mediador de la función hepática de p63 se demostró por el hecho de que la inhibición farmacológica (TUDCA) o genética (adenovirus que codifican para GRP78) del estrés de RE reduce (bloquea) la acción esteatótica de TAp63 α .

El estrés del RE involucra a IKK β como diana transcripcional ya que el silenciamiento de IKK β fue suficiente para bloquear el efecto de acumulación lipídica y expresión genética inducida por TAp63 en hepatocitos. Aunque esta asociación ya se había demostrado anteriormente³⁰⁴, estudios previos mostraron diferentes resultados en relación a la asociación entre p63 e IKK. Por ejemplo, en un estudio donde investigan el desarrollo epidérmico, observaron que p63 actúa previamente a IKK α , sin estudiar los efectos en IKK β ²³². Hasta donde sabemos, ningún estudio ha examinado la posibilidad de que otros miembros de la familia IKK puedan ser modulados por p63. El hecho de que nuestros resultados indiquen que TAp63 α incrementa los niveles de IKK β fosforilado no es sorprendente, si tenemos en cuenta que IKK α forma parte de un complejo de quinasas con IKK β e IKK γ , lo que sugiere que cualquiera de esas quinasas podría estar modulada por p63. Por otro lado IKK β , pero no IKK α , inhibe a TAp63 γ ²²⁵, una observación inesperada ya que IKK β también puede fosforilar y estabilizar TAp63 γ ²³³. Dada la complejidad de la biología de p63, la bibliografía disponible y nuestros resultados, especulamos con la hipótesis de que IKK y p63 pueden influenciarse recíprocamente dependiendo del estado de la célula. En esta línea, ya se ha descrito una regulación similar en el caso de p53 y AMPK³⁰⁵.

En cualquier caso, este es el primer estudio que indica que la sobreexpresión de TAp63 α conduce a la fosforilación de IKK β para provocar una alteración en la función del estrés de RE que resulta en una activación de la UPR. Así, la fosforilación de IKK β incrementa los niveles

de diferentes marcadores de estrés de RE y, además, el tratamiento farmacológico (TUDCA) o genético (adenovirus que sobreexpresan GPR78) lo mejora, así como también disminuye la deposición de lípidos provocada por TAp63 α . Estos resultados fueron comprobados también mediante microscopía indicando que TAp63 α provoca desfragmentación del RE³⁰⁶. La alteración de la función del RE conduce a una acumulación anormal de lípidos en el hígado. Concretamente, la alteración de la función del estrés de RE provocada por TAp63 α conduce a un incremento de los niveles de FAS y la lipogénesis *de novo* de TG en el hígado y en las células THLE2. Dada la complejidad de las acciones de TAp63 α , no podemos eludir que este factor de transcripción pueda estar involucrado en diferentes aspectos del metabolismo lipídico en otros tipos celulares. En este sentido, la inhibición de TAp63 α en células THLE2 protege a dichas células contra la acumulación lipídica inducida por el tratamiento con ácido oleico así como la sobreexpresión favorece la acumulación de gotas lipídicas.

Finalmente, investigamos la relevancia clínica de nuestros datos y encontramos que TAp63 α , así como IKK β y XPB1s, se encuentran elevados en el hígado de pacientes obesos con NAFLD y NASH. Esto sugiere que el papel hepático de p63 en el metabolismo lipídico puede tener importancia en enfermedades hepáticas humanas. Cabe señalar, que todos los pacientes con NAFLD/NASH fueron obesos y tanto el NAS score como los niveles de TAp63 α mostraron una correlación positiva con el IMC lo que hace que sea extremadamente difícil disociar el IMC con el daño hepático. Sin embargo, cuando se llevó a cabo una correlación de Pearson entre TAp63 y el NAS score, hubo una correlación positiva, sugiriendo que TAp63 α está asociado con NAFLD/NASH. Sería deseable el realizar en el futuro más estudios de expresión de TAp63 y el NAS score teniendo en cuenta la distinta taxonomía molecular asociada a distintos subgrupos de NASH.

Con todo, nuestros resultados indican que los experimentos de ganancia y pérdida de función de p53 y p63 específicamente en el hígado de ratones conducen a cambios marcados en el metabolismo lipídico hepático. La esteatosis provocada por la sobreexpresión de TAp63 α está mediada por la ruta IKK β /ER estrés/FAS (Figura 31). Los resultados obtenidos en ratones se corroboraron en un modelo de línea celular de hepatocitos humanos y biopsias de hígado de pacientes con NAFLD obesos. En conjunto, nuestros datos arrojan luz sobre un papel inesperado de la ruta TAp63 α /IKK β /ER estrés en la enfermedad hepática y se identifica a p63 como una posible diana terapéutica para tratar NAFLD.

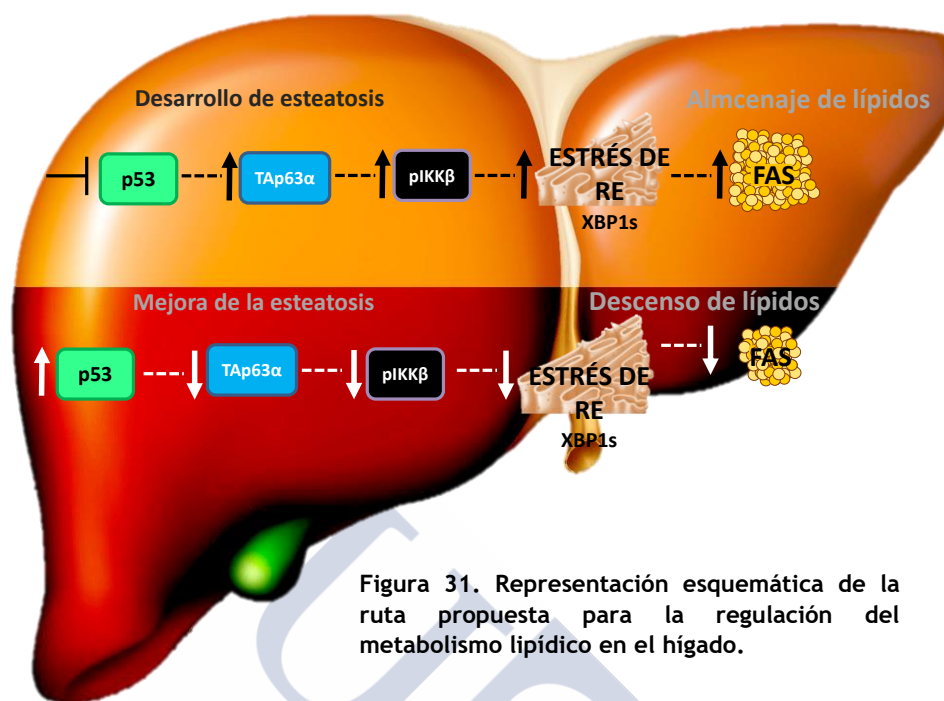


Figura 31. Representación esquemática de la ruta propuesta para la regulación del metabolismo lipídico en el hígado.





CONCLUSIONES





CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

- La ausencia de p53 provoca una disminución de peso y masa grasa independiente de la ingesta debido a la activación de la termogénesis en la grasa parda.
- p53 es crucial en la acción adipogénica de la ghrelina ya que la falta de p53 impide el depósito de lípidos en la grasa blanca y en el hígado.
- La disminución de los niveles de p53 de forma total o específica en el hígado, provocan un incremento de la grasa hepática independientemente del tipo de dieta.
- La recuperación hepática de la expresión de p53 en ratones totalmente deficientes para p53, fue suficiente para disminuir los triglicéridos en el hígado.
- La acción de p53 en la homeostasis lipídica hepática está mediada por TAp63 α . La disminución específica de p63 en el hígado reduce la esteatosis en ratones obesos y deficientes en p53.
- La sobreexpresión de TAp63 α en el hígado provoca esteatosis. Esta acción está mediada por la activación de IKK β y del estrés de retículo endoplasmático.
- La manipulación genética de p63 regula la acumulación de grasa en una línea celular de hepatocitos humanos a través de la fosforilación de IKK β .
- TAp63 α se encuentra elevado en muestras de hígado de pacientes con NAFLD y NASH; así como también la expresión de IKK β y XBP1s poniendo de manifiesto la relevancia clínica de nuestros resultados.



BIBLIOGRAFÍA





REFERENCES

1. Cohen, J.C., Horton, J.D. & Hobbs, H.H. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science* **332**, 1519 (2011).
2. Bedossa, P. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease.
3. Postic, C. & Girard, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *The Journal of clinical investigation* **118**, 829-838 (2008).
4. Liedtke, C., *et al.* Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis & Tissue Repair* **6**, 19 (2013).
5. Candi, E., *et al.* Metabolic pathways regulated by p63. *Biochemical and biophysical research communications* **482**, 440-444 (2017).
6. O'Neill, S. & O'Driscoll, L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obesity Reviews* **16**, 1-12 (2015).
7. González-Muniesa, P., *et al.* Obesity. *Nature Reviews Disease Primers* **3**, 17034 (2017).
8. OMS: Obesidad y sobrepeso nota descriptiva nº311. Enero 2015 disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/.1>.
9. Hill, J.O., Wyatt, H.R. & Peters, J.C. Energy Balance and Obesity. *Circulation* **126**, 126 (2012).
10. Spiegelman, B.M. & Flier, J.S. Obesity and the Regulation of Energy Balance. *Cell* **104**, 531-543 (2001).
11. Johannsen, D.L. & Ravussin, E. Spontaneous physical activity: relationship between fidgeting and body weight control.
12. Hulbert, A.J. & Else, P.L. Basal Metabolic Rate: History, Composition, Regulation, and Usefulness. *Physiological and Biochemical Zoology* **77**, 869-876 (2004).
13. López, M., Alvarez, C.V., Nogueiras, R. & Diéguez, C. Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends in molecular medicine* **19**, 418-427.
14. Lowell, B.B. & Spiegelman, B.M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis.
15. Townsend, K.L. & Tseng, Y.-H. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **25**, 168-177 (2014).
16. Cannon, B. & Nedergaard, J.A.N. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological reviews* **84**, 277 (2004).
17. Contreras, C., *et al.* The brain and brown fat. *Annals of medicine*, 1-19 (2014).
18. Mottillo, E.P., *et al.* Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic β 3-adrenergic receptor activation. *Journal of lipid research* **55**, 2276-2286 (2014).
19. Cao, W., Medvedev Av Fau - Daniel, K.W., Daniel Kw Fau - Collins, S. & Collins, S. beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase.
20. Holm, C., Fredrikson, G., Cannon, B. & Belfrage, P. Hormone-sensitive lipase in brown adipose tissue: Identification and effect of cold exposure. *Bioscience Reports* **7**, 897 (1987).
21. Calderon-Dominguez, M., *et al.* Fatty acid metabolism and the basis of brown adipose tissue function. *Adipocyte* **5**, 98-118 (2016).
22. Marrif, H., *et al.* Temperature Homeostasis in Transgenic Mice Lacking Thyroid Hormone Receptor- α Gene Products. *Endocrinology* **146**, 2872-2884 (2005).

23. Sjogren, M., *et al.* Hypermetabolism in mice caused by the central action of an unliganded thyroid hormone receptor alpha1.
24. Lopez, M., *et al.* Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nature medicine* **16**, 1001-1008.
25. Martínez-Sánchez, N., *et al.* Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell metabolism* **26**, 212-229.e212.
26. Haynes, W.G., Morgan, D.A., Walsh, S.A., Mark, A.L. & Sivitz, W.I. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *Journal of Clinical Investigation* **100**, 270-278 (1997).
27. Ueno, N., *et al.* Effect of age on brown adipose tissue activity in the obese (ob/ob) mouse.
28. Commins, S.P., Watson, P.M., Levin, N., Beiler, R.J. & Gettys, T.W. Central Leptin Regulates the UCP1 and obGenes in Brown and White Adipose Tissue via Different β -Adrenoceptor Subtypes. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 33059-33067 (2000).
29. Sugden, M.C. & Holness, M.J. Physiological modulation of the uptake and fate of glucose in brown adipose tissue. *Biochemical Journal* **295**, 171 (1993).
30. Yamauchi, T., *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity.
31. Qiao, L., Kinney B Fau - Schaack, J., Schaack J Fau - Shao, J. & Shao, J. Adiponectin inhibits lipolysis in mouse adipocytes.
32. Dong, M., *et al.* Cold Exposure Promotes Atherosclerotic Plaque Growth and Instability via UCP1-Dependent Lipolysis. *Cell metabolism* **18**, 118-129 (2013).
33. Yi, C.-X. & Tschöp, M.H. Brain-gut-adipose-tissue communication pathways at a glance. *Disease Models & Mechanisms* **5**, 583 (2012).
34. Coll, A.P., Farooqi, I.S. & O'Rahilly, S. The Hormonal Control of Food Intake. *Cell* **129**, 251-262 (2007).
35. Kusminski, C.M., Bickel, P.E. & Scherer, P.E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes.
36. Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M. & Hochberg, Z. Endocrinology of Adipose Tissue - An Update. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* **39**, 314-321 (2007).
37. Weisberg, S.P., *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* **112**, 1796-1808 (2003).
38. Radin, M.J., Sharkey, L.C. & Holycross, B.J. Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. *Veterinary Clinical Pathology* **38**, 136-156 (2009).
39. Fain, J.N., Madan Ak Fau - Hiler, M.L., Hiler MI Fau - Cheema, P., Cheema P Fau - Bahouth, S.W. & Bahouth, S.W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans.
40. Kershaw, E.E. & Flier, J.S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**, 2548-2556 (2004).
41. Morris, D.L. & Rui, L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **297**, E1247-E1259 (2009).
42. Muoio, D.M. & Lynis Dohm, G. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **16**, 653-666.
43. Matsuzawa, Y., Funahashi, T., Kihara, S. & Shimomura, I. Adiponectin and Metabolic Syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24**, 29 (2004).
44. Hosogai, N., *et al.* Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* **56**, 901-911 (2007).

45. Yamauchi, T., *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **423**, 762 (2003).
46. Kusminski, C.M., McTernan P, Fau - Kumar, S. & Kumar, S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes.
47. Tilg, H. & Moschen, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity.
48. Lazar, M.A. Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **39**, 710-716 (2007).
49. Banerjee, R.R., *et al.* Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* **303**, 1195-1198 (2004).
50. Tovar, S., *et al.* Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* **153**, R1-5 (2005).
51. Vazquez, M.J., *et al.* Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. *Endocrinology* **149**, 4534-4543 (2008).
52. Saltiel, A.R. & Kahn, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806 (2001).
53. White, M.F. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action.
54. Kahn, S.E., Hull R, Fau - Utzschneider, K.M. & Utzschneider, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.
55. Strycharz, J., Drzewoski, J., Szemraj, J. & Sliwinska, A. Erratum to "p53 Involved in Tissue-Specific Insulin Resistance Formation?"*Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, 16 (2017).
56. Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V. & Czech, M.P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 367-377 (2008).
57. Quesada, I., Tuduri, E., Ripoll, C. & Nadal, A. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *The Journal of endocrinology* **199**, 5-19 (2008).
58. Habegger, K.M., *et al.* The metabolic actions of glucagon revisited. *Nature reviews. Endocrinology* **6**, 689-697 (2010).
59. Penhos, J.C., Wu, C.H., Daunas, J., Reitman, M. & Levine, R. Effect of glucagon on the metabolism of lipids and on urea formation by the perfused rat liver. *Diabetes* **15**, 740-748 (1966).
60. Guettet, C., *et al.* Effect of chronic glucagon administration on lipoprotein composition in normally fed, fasted and cholesterol-fed rats. *Lipids* **26**, 451-458 (1991).
61. Inokuchi, A., Oomura, Y. & Nishimura, H. Effect of intracerebroventricularly infused glucagon on feeding behavior. *Physiology & behavior* **33**, 397-400 (1984).
62. Quiñones, M., *et al.* Hypothalamic CaMKK β mediates glucagon anorectic effect and its diet-induced resistance. *Molecular Metabolism* **4**, 961-970.
63. Howard, A.D., *et al.* A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* **273**, 974-977 (1996).
64. Kojima, M., *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656-660 (1999).
65. Williams, D.L. & Cummings, D.E. Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states. *The Journal of nutrition* **135**, 1320-1325 (2005).
66. Theander-Carrillo, C., *et al.* Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1983-1993 (2006).

67. Sangiao-Alvarellos, S., *et al.* Central ghrelin regulates peripheral lipid metabolism in a growth hormone-independent fashion.
68. Tschop, M., Smiley, D.L. & Heiman, M.L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **407**, 908-913 (2000).
69. Choi, K., *et al.* The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis.
70. Rodriguez, A., *et al.* Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes.
71. Rodríguez, A., *et al.* The ghrelin O-acyltransferase–ghrelin system reduces TNF- α -induced apoptosis and autophagy in human visceral adipocytes. *Diabetologia* **55**, 3038-3050 (2012).
72. Davies, J.S., *et al.* Ghrelin Induces Abdominal Obesity Via GHS-R-Dependent Lipid Retention. *Molecular Endocrinology* **23**, 914-924 (2009).
73. Perez-Tilve, D., *et al.* Ghrelin-induced adiposity is independent of orexigenic effects.
74. Berthoud, H.R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **26**, 393-428 (2002).
75. Holst, J.J. On the physiology of GIP and GLP-1. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* **36**, 747-754 (2004).
76. Knauf, C., *et al.* Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *The Journal of clinical investigation* **115**, 3554-3563 (2005).
77. Nogueiras, R., *et al.* Direct control of peripheral lipid deposition by CNS GLP-1 receptor signaling is mediated by the sympathetic nervous system and blunted in diet-induced obesity. *J Neurosci* **29**, 5916-5925 (2009).
78. Lockie, S.H., *et al.* Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Diabetes* **61**, 2753-2762 (2012).
79. Beiroa, D., *et al.* GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes* **63**, 3346-3358 (2014).
80. Boey, D., *et al.* Peptide YY ablation in mice leads to the development of hyperinsulinaemia and obesity. *Diabetologia* **49**, 1360-1370 (2006).
81. Rui, L. Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology* **4**, 177-197 (2014).
82. Meex, R.C.R. & Watt, M.J. Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. **13**, 509 (2017).
83. Bechmann, L.P., *et al.* The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases.
84. Li, S., Brown Ms Fau - Goldstein, J.L. & Goldstein, J.L. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis.
85. Browning, J.D. & Horton, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Journal of Clinical Investigation* **114**, 147-152 (2004).
86. Shimano, H., *et al.* Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells.
87. Uyeda, K. & Repa, J.J. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis.
88. Horton, J.D., Goldstein JI Fau - Brown, M.S. & Brown, M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver.
89. Doege, H., *et al.* Silencing of Hepatic Fatty Acid Transporter Protein 5 in Vivo Reverses Diet-induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Improves Hyperglycemia. *The Journal of biological chemistry* **283**, 22186-22192 (2008).
90. Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porrás, J.A. & Auguet, T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology* **7**, 221-239 (2014).

91. Hardy, T., Oakley, F., Anstee, Q.M. & Day, C.P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **11**, 451-496 (2016).
92. Kersten, S., *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *The Journal of clinical investigation* **103**, 1489-1498 (1999).
93. Linden, D., *et al.* Influence of peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists on the intracellular turnover and secretion of apolipoprotein (Apo) B-100 and ApoB-48.
94. Reddy, J.K. III. Peroxisomal β -oxidation, PPAR α , and steatohepatitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **281**, G1333-G1339 (2001).
95. Chen, Z., Fitzgerald RI Fau - Averna, M.R., Averna Mr Fau - Schonfeld, G. & Schonfeld, G. A targeted apolipoprotein B-38.9-producing mutation causes fatty livers in mice due to the reduced ability of apolipoprotein B-38.9 to transport triglycerides.
96. Cefalu, A.B., *et al.* A novel APOB mutation identified by exome sequencing cosegregates with steatosis, liver cancer, and hypocholesterolemia.
97. Czaja, M.J. Autophagy in health and disease. 2. Regulation of lipid metabolism and storage by autophagy: pathophysiological implications. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **298**, C973 (2010).
98. Finn, P.F. & Dice, J.F. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* **22**, 830-844 (2006).
99. Seyer, P., *et al.* Hepatic glucose sensing is required to preserve beta cell glucose competence.
100. Agius, L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism.
101. Wahren, J. & Ekberg, K. Splanchnic regulation of glucose production.
102. Pilkis, S.J., el-Maghrabi Mr Fau - Claus, T.H. & Claus, T.H. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis.
103. Puigserver, P., *et al.* Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction.
104. Oh KJ Fau - Han, H.-S., Han Hs Fau - Kim, M.-J., Kim Mj Fau - Koo, S.-H. & Koo, S.H. CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis.
105. Guertin, D.A., *et al.* Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1.
106. Kim, H.S., *et al.* Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis.
107. Yamashita, H., *et al.* A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 9116-9121 (2001).
108. Younossi, Z.M., *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **64**, 73-84 (2016).
109. Angulo, P. Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: is liver histology of any prognostic significance?
110. Than, N.N. & Newsome, P.N. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease.
111. Ekstedt, M., *et al.* Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes.
112. Yeh, M.M. & Brunt, E.M. Pathological features of fatty liver disease.
113. Lackner, C., *et al.* Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis.
114. Brunt, E.M., *et al.* Portal chronic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a histologic marker of advanced NAFLD-Clinicopathologic correlations from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network.
115. Kleiner, D.E., *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.

116. Brunt, E.M., Kleiner De Fau - Wilson, L.A., Wilson La Fau - Belt, P., Belt P Fau - Neuschwander-Tetri, B.A. & Neuschwander-Tetri, B.A. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings.
117. Machado, M., Marques-Vidal P Fau - Cortez-Pinto, H. & Cortez-Pinto, H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery.
118. Bedossa, P., *et al.* Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients.
119. Yamaguchi, K., *et al.* Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis.
120. Samuel, V.T., Petersen, K.F. & Shulman, G.I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *The Lancet* **375**, 2267-2277 (2010).
121. Day, C.P. & James, O.F.W. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology* **114**, 842-845.
122. Graham, T.E. & Kahn, B.B. Tissue-specific alterations of glucose transport and molecular mechanisms of intertissue communication in obesity and type 2 diabetes.
123. Perry, R.J., Samuel, V.T., Petersen, K.F. & Shulman, G.I. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **510**, 84-91 (2014).
124. Wilcox, G. Insulin and Insulin Resistance. *Clinical Biochemist Reviews* **26**, 19-39 (2005).
125. Greenfield, J.R. & Campbell, L.V. Insulin resistance and obesity. *Clinics in Dermatology* **22**, 289-295 (2004).
126. Weiss, R. Fat distribution and storage: how much, where, and how?
127. Farrell, G.C. & Larter, C.Z. Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology* **43**, S99-S112 (2006).
128. Marchesini, G., *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome.
129. Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Duncan, R.E., Ahmadian, M. & Sul, H.S. Regulation of Triglyceride Metabolism.IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **293**, G1-G4 (2007).
130. Buqué, X., Aspichueta, P. & Ochoa, B. Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* **100**, 565-578 (2008).
131. Cusi, K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* **142**, 711-725 e716 (2012).
132. Oneta, C.M. & Dufour, J.F. Non-alcoholic fatty liver disease: treatment options based on pathogenic considerations.
133. Youssef, W.I. & McCullough, A.J. Steatohepatitis in obese individuals.
134. Xu, A., *et al.* The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *The Journal of clinical investigation* **112**, 91-100 (2003).
135. Polyzos, S.A., Kountouras, J., Zavos, C. & Tsiaousi, E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes, obesity & metabolism* **12**, 365-383 (2010).
136. Aguirre, V., Uchida T Fau - Yenush, L., Yenush L Fau - Davis, R., Davis R Fau - White, M.F. & White, M.F. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307).
137. Hotamisligil, G.S., *et al.* IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance.
138. Kawakami M Fau - Murase, T., *et al.* Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells.
139. Watt, M.J., *et al.* Hormone-sensitive lipase is reduced in the adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus: influence of IL-6 infusion.

140. Bezaire, V., Mairal A Fau - Anesia, R., Anesia R Fau - Lefort, C., Lefort C Fau - Langin, D. & Langin, D. Chronic TNF α and cAMP pre-treatment of human adipocytes alter HSL, ATGL and perilipin to regulate basal and stimulated lipolysis.
141. Donnelly, K.L., *et al.* Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1343-1351 (2005).
142. Kumashiro, N., *et al.* Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 16381-16385 (2011).
143. Nguyen, P., *et al.* Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **92**, 272-283 (2008).
144. Sparks, J.D. & Sparks, C.E. Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion.
145. Powell, E.E., *et al.* The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years.
146. Avramoglu, R.K., Basciano H Fau - Adeli, K. & Adeli, K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states.
147. Musso, G., Cassader, M. & Gambino, R. Non-alcoholic steatohepatitis: emerging molecular targets and therapeutic strategies. *Nature Reviews Drug Discovery* **15**, 249 (2016).
148. Cha, J.Y. & Repa, J.J. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR.
149. Pagano, G., *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* **35**, 367-372 (2002).
150. Browning, J.D. & Horton, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury.
151. Musso, G., Gambino, R. & Cassader, M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Progress in Lipid Research* **52**, 175-191 (2013).
152. Ponziani, F.R., Pecere S Fau - Gasbarrini, A., Gasbarrini A Fau - Ojetti, V. & Ojetti, V. Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism.
153. Esterbauer, H., Schaur, R.J. & Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine* **11**, 81-128 (1991).
154. Pan, M., *et al.* Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *The Journal of clinical investigation* **113**, 1277-1287 (2004).
155. Kim, O.K., Jun W Fau - Lee, J. & Lee, J. Mechanism of ER Stress and Inflammation for Hepatic Insulin Resistance in Obesity.
156. Lackey, D.E. & Olefsky, J.M. Regulation of metabolism by the innate immune system.
157. Baker, R.G., Hayden Ms Fau - Ghosh, S. & Ghosh, S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease.
158. Tornatore, L., Thotakura Ak Fau - Bennett, J., Bennett J Fau - Moretti, M., Moretti M Fau - Franzoso, G. & Franzoso, G. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation.
159. Hirosumi, J., *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 333-336 (2002).
160. Gual, P., Le Marchand-Brustel Y Fau - Tanti, J.-F. & Tanti, J.F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation.
161. Westwell-Roper, C., Nackiewicz, D., Dan, M. & Ehses, J.A. Toll-like receptors and NLRP3 as central regulators of pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes.
162. Shi, H., *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.
163. Hui, J.M., *et al.* Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or adiponectin? *Hepatology* **40**, 46-54 (2004).

164. Wieckowska, A., *et al.* Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis.
165. Haukeland, J.W., *et al.* Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *Journal of hepatology* **44**, 1167-1174 (2006).
166. Malhi, H. & Gores, G.J. Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury. *Gastroenterology* **134**, 1641-1654 (2008).
167. Feldstein, A.E., *et al.* Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **125**, 437-443 (2003).
168. Crespo, J., *et al.* Gene expression of tumor necrosis factor α and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* **34**, 1158-1163 (2001).
169. Cao, L., Quan, X.-B., Zeng, W.-J., Yang, X.-O. & Wang, M.-J. Mechanism of Hepatocyte Apoptosis. *Journal of Cell Death* **9**, 19-29 (2016).
170. Baiceanu, A., Mesdom, P., Lagouge, M. & Foufelle, F. Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis. *Nature Reviews Endocrinology* **12**, 710 (2016).
171. Ozcan, U., *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457-461 (2004).
172. Malhi, H. & Kaufman, R.J. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *Journal of hepatology* **54**, 795-809 (2011).
173. Pagliassotti, M.J. Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease. *Annual review of nutrition* **32**, 17-33 (2012).
174. Cretenet, G., Le Clech, M. & Gachon, F. Circadian Clock-Coordinated 12 Hr Period Rhythmic Activation of the IRE1 α Pathway Controls Lipid Metabolism in Mouse Liver. *Cell metabolism* **11**, 47-57 (2010).
175. Zhang, X.-Q., Xu, C.-F., Yu, C.-H., Chen, W.-X. & Li, Y.-M. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG* **20**, 1768-1776 (2014).
176. Kammoun, H.L., *et al.* GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *The Journal of clinical investigation* **119**, 1201-1215 (2009).
177. Oyadomari, S., Harding, H.P., Zhang, Y., Oyadomari, M. & Ron, D. Dephosphorylation of Translation Initiation Factor 2 α Enhances Glucose Tolerance and Attenuates Hepatosteatosis in Mice. *Cell metabolism* **7**, 520-532 (2008).
178. Ahsan, M.K., *et al.* Linaclotide activates guanylate cyclase-C/cGMP/protein kinase-II-dependent trafficking of CFTR in the intestine. *Physiological reports* **5**(2017).
179. Lee, A.-H., Scapa, E.F., Cohen, D.E. & Glimcher, L.H. Regulation of Hepatic Lipogenesis by the Transcription Factor XBP1. *Science* **320**, 1492 (2008).
180. Park, S.W., *et al.* The regulatory subunits of PI3K, p85 α and p85 β , interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. *Nature medicine* **16**, 429-437 (2010).
181. Ota, T., Gayet, C. & Ginsberg, H.N. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *The Journal of clinical investigation* **118**, 316-332 (2008).
182. Choi, S.H. & Ginsberg, H.N. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **22**, 353-363 (2011).
183. Cnop, M., Fofelle, F. & Velloso, L.A. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in molecular medicine* **18**, 59-68 (2012).
184. Zhang, K. Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* **3**, 33-40 (2010).

185. Pfaffenbach, K.T., *et al.* Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death.
186. Feldstein, A.E. & Gores, G.J. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis.
187. Hyslop Pa Fau - York, D.A., York Da Fau - Corina, D.L. & Corina, D.L. Changes in the composition and fluidity of membranes in obese (ob/ob) mice: a study of hepatic microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase activity.
188. Deng, J., *et al.* Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2.
189. Hu, P., Han, Z., Couvillon, A.D., Kaufman, R.J. & Exton, J.H. Autocrine Tumor Necrosis Factor Alpha Links Endoplasmic Reticulum Stress to the Membrane Death Receptor Pathway through IRE1 α -Mediated NF- κ B Activation and Down-Regulation of TRAF2 Expression. *Molecular and cellular biology* **26**, 3071-3084 (2006).
190. Cullinan, S.B. & Diehl, J.A. Coordination of ER and oxidative stress signaling: The PERK/Nrf2 signaling pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**, 317-332 (2006).
191. Gotoh, T. & Mori, M. Nitric Oxide and Endoplasmic Reticulum Stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26**, 1439 (2006).
192. Hotamisligil, G.S. Inflammation and metabolic disorders.
193. Schattenberg, J.M., *et al.* Jnk1 but not jnk2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* **43**, 163-172 (2006).
194. Sabio, G., *et al.* Prevention of Steatosis by Hepatic JNK1. *Cell metabolism* **10**, 491-498 (2009).
195. Vousden, K.H. & Prives, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* **137**, 413-431 (2009).
196. Donehower, L.A., *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215 (1992).
197. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C.C. p53 Mutations in Human Cancers. *Science* **253**, 49-53 (1991).
198. Varley, J.M. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome.
199. Horn, H.F. & Vousden, K.H. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* **26**, 1306 (2007).
200. Maddocks, O.D.K., *et al.* Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature* **493**, 542 (2012).
201. Berkers, C.R., Maddocks, O.D., Cheung, E.C., Mor, I. & Vousden, K.H. Metabolic regulation by p53 family members. *Cell metabolism* **18**, 617-633 (2013).
202. Brady, C.A. & Attardi, L.D. p53 at a glance. *Journal of cell science* **123**, 2527 (2010).
203. Maiuri, M.C., *et al.* Autophagy regulation by p53. *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 181-185 (2010).
204. Ward, Patrick S. & Thompson, Craig B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer cell* **21**, 297-308 (2012).
205. Goldstein, I. & Rotter, V. Regulation of lipid metabolism by p53 – fighting two villains with one sword. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **23**, 567-575 (2012).
206. Maddocks, O.D.K. & Vousden, K.H. Metabolic regulation by p53. *Journal of Molecular Medicine* **89**, 237-245 (2011).
207. Feng, Z. & Levine, A.J. The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends in Cell Biology* **20**, 427-434 (2010).
208. Goldstein, I. & Rotter, V. Regulation of lipid metabolism by p53 - fighting two villains with one sword. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **23**, 567-575 (2012).
209. Lee, C.W., *et al.* AMPK promotes p53 acetylation via phosphorylation and inactivation of SIRT1 in liver cancer cells.
210. Cantó, C., *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056 (2009).

211. Madan, E., *et al.* Regulation of glucose metabolism by p53: emerging new roles for the tumor suppressor.
212. Bensaad, K. & Vousden, K.H. p53: new roles in metabolism. *Trends in Cell Biology* **17**, 286-291 (2007).
213. Contractor, T. & Harris, C.R. p53 Negatively Regulates Transcription of the Pyruvate Dehydrogenase Kinase Pdk2. *Cancer Research* **72**, 560 (2012).
214. Schwartzberg-Bar-Yoseph, F., Armoni, M. & Karnieli, E. The Tumor Suppressor p53 Down-Regulates Glucose Transporters GLUT1 and GLUT4 Gene Expression. *Cancer Research* **64**, 2627 (2004).
215. Polyak, K., Xia Y Fau - Zweier, J.L., Zweier JI Fau - Kinzler, K.W., Kinzler Kw Fau - Vogelstein, B. & Vogelstein, B. A model for p53-induced apoptosis.
216. Budanov, A.V., Sablina Aa Fau - Feinstein, E., Feinstein E Fau - Koonin, E.V., Koonin Ev Fau - Chumakov, P.M. & Chumakov, P.M. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD.
217. Tan, M., *et al.* Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53.
218. Yoon, K.A., Nakamura Y Fau - Arakawa, H. & Arakawa, H. Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses.
219. Matoba, S., *et al.* p53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science* **312**, 1650 (2006).
220. Goldstein, I., *et al.* p53, a novel regulator of lipid metabolism pathways. *Journal of hepatology* **56**, 656-662 (2012).
221. Hallenborg, P., Feddersen, S., Madsen, L. & Kristiansen, K. The tumor suppressors pRB and p53 as regulators of adipocyte differentiation and function. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **13**, 235-246 (2009).
222. Assaily, W., *et al.* ROS-mediated p53 induction of Lpin1 regulates fatty acid oxidation in response to nutritional stress. *Molecular cell* **44**, 491-501 (2011).
223. Finck, B.N., *et al.* Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway.
224. Yahagi, N., *et al.* p53 Activation in adipocytes of obese mice. *The Journal of biological chemistry* **278**, 25395-25400 (2003).
225. Liao, J.M., *et al.* IkkappaB kinase beta (IKKbeta) inhibits p63 isoform gamma (TAp63gamma) transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry* **288**, 18184-18193 (2013).
226. Allocati, N., Di Ilio, C. & De Laurenzi, V. p63/p73 in the control of cell cycle and cell death. *Experimental cell research* **318**, 1285-1290 (2012).
227. Su, X., *et al.* TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature* **467**, 986-990 (2010).
228. Romano, R.A., *et al.* DeltaNp63 knockout mice reveal its indispensable role as a master regulator of epithelial development and differentiation.
229. Sabbisetti, V., *et al.* p63 promotes cell survival through fatty acid synthase.
230. Su, X., *et al.* TAp63 is a master transcriptional regulator of lipid and glucose metabolism. *Cell metabolism* **16**, 511-525 (2012).
231. Liao, W., *et al.* Ccdc3: A New P63 Target Involved in Regulation Of Liver Lipid Metabolism. *Scientific Reports* **7**, 9020 (2017).
232. Candi, E., *et al.* p63 is upstream of IKK alpha in epidermal development. *Journal of cell science* **119**, 4617-4622 (2006).
233. MacPartlin, M., Zeng, S.X. & Lu, H. Phosphorylation and stabilization of TAp63gamma by IkkappaB kinase-beta. *The Journal of biological chemistry* **283**, 15754-15761 (2008).

234. Cai, D., *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nature medicine* **11**, 183 (2005).
235. Arkan, M.C., *et al.* IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature medicine* **11**, 191 (2005).
236. Minamino, T., *et al.* A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nature medicine* **15**, 1082 (2009).
237. Yahagi, N., *et al.* p53 involvement in the pathogenesis of fatty liver disease. *The Journal of biological chemistry* **279**, 20571-20575 (2004).
238. Derdak, Z., *et al.* Inhibition of p53 attenuates steatosis and liver injury in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology* **58**, 785-791 (2013).
239. Tomita, K., *et al.* p53/p66Shc-mediated signaling contributes to the progression of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice. *Journal of hepatology* **57**, 837-843 (2012).
240. Liu, Y., *et al.* Ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway coordinates nutrient stress with lipid metabolism by regulating MCD and promoting fatty acid oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E2414-2422 (2014).
241. Wang, X., Zhao, X., Gao, X., Mei, Y. & Wu, M. A new role of p53 in regulating lipid metabolism. *Journal of Molecular Cell Biology* **5**, 147-150 (2013).
242. Prokesch, A., *et al.* Liver p53 is stabilized upon starvation and required for amino acid catabolism and gluconeogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **31**, 732-742 (2017).
243. Rufini, A., *et al.* TAp73 depletion accelerates aging through metabolic dysregulation.
244. Jacks, T., *et al.* Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Current biology : CB* **4**, 1-7 (1994).
245. Tschop, M.H., *et al.* A guide to analysis of mouse energy metabolism. *Nature methods* **9**, 57-63 (2012).
246. Butler, A.A. & Kozak, L.P. A Recurring Problem With the Analysis of Energy Expenditure in Genetic Models Expressing Lean and Obese Phenotypes. *Diabetes* **59**, 323-329 (2010).
247. Johnstone, A.M., Murison Sd Fau - Duncan, J.S., Duncan Js Fau - Rance, K.A., Rance Ka Fau - Speakman, J.R. & Speakman, J.R. Factors influencing variation in basal metabolic rate include fat-free mass, fat mass, age, and circulating thyroxine but not sex, circulating leptin, or triiodothyronine.
248. Even, P.C., Mokhtarian, A. & Pele, A. Practical aspects of indirect calorimetry in laboratory animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **18**, 435-447 (1994).
249. Lam, Y.Y. & Ravussin, E. Indirect calorimetry: an indispensable tool to understand and predict obesity. *European Journal Of Clinical Nutrition* **71**, 318 (2016).
250. Longo, K.A., *et al.* The 24-hour respiratory quotient predicts energy intake and changes in body mass. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **298**, R747-754 (2010).
251. Ahmed, S.S., Li, J., Godwin, J., Gao, G. & Zhong, L. Gene Transfer in the Liver Using Recombinant Adeno-Associated Virus. in *Current Protocols in Microbiology* (John Wiley & Sons, Inc., 2005).
252. Sands, M.S. AAV-Mediated Liver-Directed Gene Therapy. in *Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols* (eds. Snyder, R.O. & Moullier, P.) 141-157 (Humana Press, Totowa, NJ, 2011).
253. Aspichueta, P., Perez S Fau - Ochoa, B., Ochoa B Fau - Fresnedo, O. & Fresnedo, O. Endotoxin promotes preferential periportal upregulation of VLDL secretion in the rat liver.
254. Martínez-Uña, M., *et al.* S-Adenosylmethionine increases circulating very-low density lipoprotein clearance in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology* **62**, 673-681 (2015).
255. Miller, J. Reaction time analysis with outlier exclusion: bias varies with sample size. *The Quarterly journal of experimental psychology. A, Human experimental psychology* **43**, 907-912 (1991).

256. SHAPIRO, S.S. & WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **52**, 591-611 (1965).
257. Razali, N.M. & Wah, Y.B. Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics* **2**, 21-33 (2011).
258. Kao, L.S. & Green, C.E. Analysis of Variance: Is There a Difference in Means and What Does It Mean? *The Journal of surgical research* **144**, 158-170 (2008).
259. de Winter, J.C. Using the Student's t-test with extremely small sample sizes. *Practical Assessment, Research & Evaluation* **18**(2013).
260. Student. The probable error of a mean. *Biometrika* **6**, 1-25 (1908).
261. Milton, J.S. *Estadística para biología y ciencias de la salud*, (McGraw-Hill Interamericana de España S.L., 2007).
262. Dunn, O.J. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* **6**, 241-252 (1964).
263. Campbell, G. & Skillings, J.H. Nonparametric Stepwise Multiple Comparison Procedures. *Journal of the American Statistical Association* **80**, 998-1003 (1985).
264. Bridge, P.D. & Sawilowsky, S.S. Increasing Physicians' Awareness of the Impact of Statistics on Research Outcomes. *Journal of Clinical Epidemiology* **52**, 229-235 (1999).
265. Nakai, H., *et al.* Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol* **79**, 214-224 (2005).
266. Wang, L., *et al.* Systematic evaluation of AAV vectors for liver directed gene transfer in murine models.
267. Kattenhorn, L.M., *et al.* Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Liver Disease. *Human Gene Therapy* **27**, 947-961 (2016).
268. Kievit, P., *et al.* Chronic treatment with a melanocortin-4 receptor agonist causes weight loss, reduces insulin resistance, and improves cardiovascular function in diet-induced obese rhesus macaques. *Diabetes* **62**, 490-497 (2013).
269. Velasquez, D.A., *et al.* The central Sirtuin 1/p53 pathway is essential for the orexigenic action of ghrelin. *Diabetes* **60**, 1177-1185.
270. Lopez, M., *et al.* Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nature medicine* **16**, 1001-1008 (2010).
271. Weiner, D.M., *et al.* D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 1859-1863 (1991).
272. Uno, T. & Shibata, M. Role of inferior olive and thoracic IML neurons in nonshivering thermogenesis in rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **280**, R536-546 (2001).
273. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews* **84**, 277-359 (2004).
274. Farrell, G.C., *et al.* Apoptosis in experimental NASH is associated with p53 activation and TRAIL receptor expression. *Journal of gastroenterology and hepatology* **24**, 443-452 (2009).
275. Shibata, M., Uno, T. & Hashimoto, M. Disinhibition of lower midbrain neurons enhances non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. *Brain research* **833**, 242-250 (1999).
276. Liu, K., *et al.* Depending on the stage of hepatosteatosis, p53 causes apoptosis primarily through either DRAM-induced autophagy or BAX. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **33**, 1566-1574 (2013).
277. Begg, D.P., *et al.* Effect of guanylate cyclase-C activity on energy and glucose homeostasis. *Diabetes* **63**, 3798-3804 (2014).
278. Ozcan, U., *et al.* Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* **313**, 1137-1140 (2006).
279. Derdak, Z., *et al.* Activation of p53 enhances apoptosis and insulin resistance in a rat model of alcoholic liver disease. *Journal of hepatology* **54**, 164-172 (2011).

280. Pani, G., *et al.* Abrogation of hepatocyte apoptosis and early appearance of liver dysplasia in ethanol-fed p53-deficient mice. *Biochemical and biophysical research communications* **325**, 97-100 (2004).
281. Lieber, C.S., Leo, M.A., Wang, X. & Decarli, L.M. Alcohol alters hepatic FoxO1, p53, and mitochondrial SIRT5 deacetylation function. *Biochemical and biophysical research communications* **373**, 246-252 (2008).
282. Hallenborg, P., *et al.* p53 regulates expression of uncoupling protein 1 through binding and repression of PPARgamma coactivator-1alpha.
283. Molchadsky, A., *et al.* p53 is required for brown adipogenic differentiation and has a protective role against diet-induced obesity. *Cell death and differentiation* **20**, 774 (2013).
284. Shimizu, I., *et al.* p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure.
285. Wortley, K.E., *et al.* Absence of ghrelin protects against early-onset obesity.
286. Zigman, J.M., *et al.* Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity.
287. Zigman, J.M., Jones Je Fau - Lee, C.E., Lee Ce Fau - Saper, C.B., Saper Cb Fau - Elmquist, J.K. & Elmquist, J.K. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain.
288. Nogueiras, R., Perez-Tilve D Fau - Wortley, K.E., Wortley Ke Fau - Tschop, M. & Tschop, M. Growth hormone secretagogue (ghrelin-) receptors--a complex drug target for the regulation of body weight.
289. Briggs, D.I., Enriori, P.J., Lemus, M.B., Cowley, M.A. & Andrews, Z.B. Diet-Induced Obesity Causes Ghrelin Resistance in Arcuate NPY/AgRP Neurons. *Endocrinology* **151**, 4745-4755 (2010).
290. Dietrich, M.O., *et al.* Agrp neurons mediate Sirt1's action on the melanocortin system and energy balance: roles for Sirt1 in neuronal firing and synaptic plasticity.
291. Lopez, M., *et al.* Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell metabolism* **7**, 389-399 (2008).
292. Andrews, Z.B., *et al.* UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals.
293. Sakkou, M., *et al.* A role for brain-specific homeobox factor Bsx in the control of hyperphagia and locomotory behavior.
294. Wren, A.M., *et al.* The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion.
295. Velásquez, D.A., *et al.* The Central Sirtuin 1/p53 Pathway Is Essential for the Orexigenic Action of Ghrelin. *Diabetes* **60**, 1177-1185 (2011).
296. Cervone, D.T. & Dyck, D.J. Ghrelin and the Regulation of Peripheral Tissue Metabolism. *The FASEB Journal* **31**, 1084.1081-1084.1081 (2017).
297. Minamino, T., *et al.* A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance.
298. Özcan, U., *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science* **306**, 457 (2004).
299. Flores, E.R., *et al.* p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* **416**, 560-564 (2002).
300. Perez-Losada, J., Wu, D., DelRosario, R., Balmain, A. & Mao, J.H. p63 and p73 do not contribute to p53-mediated lymphoma suppressor activity in vivo. *Oncogene* **24**, 5521-5524 (2005).
301. Xu-Monette, Z.Y., *et al.* p63 expression confers significantly better survival outcomes in high-risk diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates p53-like and p53-independent tumor suppressor function. *Aging* **8**, 345-365 (2016).
302. Su, X., *et al.* Tap63 prevents premature aging by promoting adult stem cell maintenance. *Cell stem cell* **5**, 64-75 (2009).

Bibliografía

303. Ihrie, R.A., Bronson, R.T. & Attardi, L.D. Adult mice lacking the p53/p63 target gene *Perp* are not predisposed to spontaneous tumorigenesis but display features of ectodermal dysplasia syndromes. *Cell death and differentiation* **13**, 1614-1618 (2006).
304. Zhang, X., *et al.* Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* **135**, 61-73 (2008).
305. Vousden, K.H. & Ryan, K.M. p53 and metabolism. *Nature reviews. Cancer* **9**, 691-700 (2009).
306. de Brito, O.M. & Scorrano, L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**, 605-610 (2008).



ANEXO I

Lista licencias imágenes introducción

	Referencia	Editorial	Número de licencia
Imagen 1 e imagen 9	131	Elsevier	4247741047952
Imagen 4 e imagen 7	1	American ASSN for the Advancement of Science	4264250362489
Imagen 5	97	American Physiological Society	4247801207008
Imagen 11 e imagen 12	3	American Society for Clinical Investigation	4247820318903
Imagen 13 e imagen 14	85	American Society for Clinical Investigation	4247790495953
Imagen 15 e imagen 16	183	Elsevier	4247790839269
Imagen 18	208	Elsevier	4247811312751
Imagen 19	226	Elsevier	4247811390327
Imagen 20	5	Elsevier	4247811482923

