



TESIS DE DOCTORADO

**PAPEL DE p53 EN LA
GLUCONEOGÉNESIS
HEPÁTICA**

María Jesús González Rellán

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA.

SANTIAGO DE COMPOSTELA
AÑO 2021





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Papel de p53 en la gluconeogénesis hepática

Dña. María Jesús González Rellán

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.*
- 5) Declaro no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.*

En Santiago de Compostela, enero de 2021

Fdo.....





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

D./Dña. **Rubén Nogueiras Pozo**

En condición de: **Tutor/a y director/a**

D./Dña. **Carlos Diéguez González**

En condición de: **Director/a**

Título de la tesis: **Papel de p53 en la gluconeogénesis hepática**

INFORMA/N:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **María Jesús González Rellán**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Santiago de Compostela, enero de 2021**

Firma electrónica





A mis padres.
A Sonia.
A Iván.



Resumen:

El factor de transcripción p53 regula numerosas vías de señalización para mantener la homeostasis celular y modular la respuesta celular a estrés. La deficiencia o exceso de nutrientes genera estrés metabólico en las células, por lo que hipotetizamos que p53 podría estar vinculado al mantenimiento de los niveles de glucosa. En esta tesis se muestra como durante la restricción de nutrientes, la proteína p53 se estabiliza mediante la *O*-GlcNAcilación, desarrollando un papel imprescindible en la regulación fisiológica de la homeostasis de la glucosa. Específicamente, p53 se une al promotor de PCK1, regulando su activación transcripcional, controlando así la producción hepática de glucosa. Los modelos animales que carecen de p53 específicamente en el hígado, muestran una capacidad gluconeogénica reducida durante la restricción calórica. Además, el glucagón, la adrenalina y los glucocorticoides incrementan los niveles de proteína de p53 en el hígado, y la administración de estas hormonas tanto a líneas celulares humanas que carecen de p53 como a los modelos animales que no expresan p53 específicamente en el hígado, no produce una respuesta hiperglucemiante. Además, encontramos que la insulina disminuye los niveles de proteína de p53, y que la sobre expresión de p53 empeora la sensibilidad a insulina. Finalmente, encontramos que los niveles de proteína de p53, así como los genes responsables de la *O*-GlcNAcilación, están elevados en el hígado de los pacientes con diabetes tipo 2, correlacionando positivamente con la glucemia y el HOMA-IR. En conjunto, estos resultados indican que una *O*-GlcNAcilación de p53 juega un papel importante e inesperado en la regulación de la homeostasis de la glucosa.

Abstract:

p53 regulates several signaling pathways to maintain the metabolic homeostasis of cells and modulates the cellular response to stress. Deficiency or excess of nutrients causes cellular metabolic stress, and we hypothesized that p53 could be linked to glucose maintenance. We show here that upon starvation hepatic p53 is stabilized by *O*-GlcNAcylation and plays an essential role in the physiological regulation of glucose homeostasis. More specifically, p53 binds to PCK1 promoter and regulates its transcriptional activation, thereby controlling hepatic glucose production. Mice lacking p53 in the liver show a reduced gluconeogenic response during calorie restriction. Glucagon, adrenaline and glucocorticoids augmented protein levels of p53, and administration of these hormones to p53 deficient human hepatocytes and to liver-specific p53 deficient mice fails to increase glucose levels. Moreover, insulin decreases p53 levels, and over-expression of p53 impairs insulin sensitivity. Finally, protein levels of p53, as well as genes responsible of *O*-GlcNAcylation are elevated in the liver of type 2 diabetic patients and positively correlate with glucose and HOMA-IR. Overall these results indicate that the *O*-GlcNAcylation of p53 plays an unsuspected key role regulating in vivo glucose homeostasis.

Resumo:

p53 é un dos xenes máis estudados nos últimos 30 anos no campo da oncoloxía, debido ás súas funcións anti tumorais, controlando a proliferación e a morte celular das células danadas; e porque se atopa mutado en máis do 50% dos tumores, o que pon de manifesto a súa importante función no control do ciclo celular. O interese en p53 magnifícase aínda máis polo feito de que, a diferenza doutros supresores tumorais, onde as mutacións que sofren asócianse frecuentemente á súa inactivación, as alteracións xénicas que padece p53 poden facer que se inactive ou que adquira novas funcións, maioritariamente pro tumorais. Sendo este o escenario por excelencia no que se estudaron e caracterizaron as funcións clásicas de p53, erixíndose como o principal mediador da resposta a estrés, os estudos máis recentes sinalan que p53 desenvolve outras funcións non canónicas, como o control da homeostase enerxética, que ten tamén un forte impacto no control do metabolismo celular e a supresión tumoral.

A glucosa é a principal fonte de enerxía para a maioría de organismos eucariotas, proporcionando enerxía e metabolitos para que as células podan realizar as súas funcións e dividirse. É ademais o principal substrato que nutre de intermediarios ao ciclo de Krebs, polo que o mantemento da homeostase da glucosa é un proceso de vital importancia. Curiosamente, a maioría das células cancerosas mostran alteracións no metabolismo da glucosa. Nestas, a glicólise é a vía preferida para a obtención de enerxía, mediante a descomposición de glucosa a piruvato, incluso en condicións aerobias normais. O piruvato resultante é convertido deseguido a lactato. Aínda que por esta vía obtense menos enerxía que pola descomposición completa de glucosa a CO_2 e H_2O , as células cancerosas obteñen así esqueletos carbonados e outros precursores para a biosíntese, e compensan a menor obtención de enerxía catabolizando maiores cantidades de glucosa cás células normais. Este cambio de preferencia da respiración mitocondrial á glicólise anaerobia coñécese como o efecto Warburg, e permite que as células cancerosas se poidan dividir a gran velocidade. Os intermediarios obtidos durante a glicólise serven como precursores para a síntese de aminoácidos, lípidos e nucleótidos. Estudos recentes veñen de demostrar que p53 é quen de modular o metabolismo da glucosa das células tumorais, opoñéndose ao efecto Warburg. Nestas condicións de estrés severo, unha das estratexias de p53 é a redución dos niveis da enzima glucosa-6-fosfatasa, suprimindo así o consumo da glucosa por parte das células tumorais, e promovendo a súa apoptose. p53 tamén reprime a expresión de PDK2, permitindo así a activación do complexo da PDH e favorecendo a produción de acetil-CoA a partir de piruvato, en detrimento da produción de lactato. Viuse tamén que p53 diminúe a dispoñibilidade interna da glucosa inhibindo a captación da glucosa, reprimindo a expresión dos transportadores da glucosa GLUT1 e GLUT4, e diminuindo os niveis de GLUT3 ao reprimir a actividade do seu activador transcripcional NF-kappaB. A activación da vía molecular da PI3K/AKT promove a glicólise nas células cancerosas. A enzima PTEN é unha fosfatasa que inhibe a activación de AKT. Describiuse que p53 inhibe a vía PI3K/AKT activando a transcripción de PTEN e Parkin, unha proteína que ao mesmo tempo regula positivamente a PTEN. Ademais, p53 inhibe a vía de PI3K/AKT inhibindo a expresión do receptor de insulina nas células do cancro de mama.

Aínda que a importancia da actividade de p53 no metabolismo da glucosa nas células tumorais é evidente, a súa función na homeostase da glucosa das células normais é practicamente descoñecida, pois apenas se desenvolveron estudos ao respecto. Nós hipotetizamos que p53 podería estar desenvolvendo unha función relevante no mantemento da glicemia, implicándose activamente no mantemento da homeostase da glucosa. Por esta razón, os nosos obxectivos principais foron 1) estudar a regulación dos niveis de proteína de p53 no

figado polo estado nutricional, 2) estudar o papel de p53 na gluconeoxénese hepática, e 3) estudar o papel de p53 como mecanismo de acción das principais hormonas glucorreguladoras.

Comezamos avaliando os niveis de proteína de p53 no figado de ratos WT en resposta ao estado nutricional, atopando que durante o xaxún de 24 horas, dáse un incremento significativo dos niveis de p53, que retorna aos niveis basais trala realimentación. Mediante a realización dun minucioso estudo temporal, detectamos que este incremento ocorre xa ás 6 horas de xaxún, manténdose elevado durante todo o período sen cambios nos niveis de expresión de p53. A continuación, quixemos identificar que sinal do estado nutricional era o responsable da regulación dos niveis hepáticos de p53, e atopamos que a adición de glicosa, que permite manter a glicemia tanto en modelos *in vivo*, é capaz de reducir os niveis de p53 durante o xaxún. Estes resultados corrobóranse tamén *in vitro*, nas células THLE-2, polo que, colectivamente, os nosos datos indican que os niveis hepáticos de p53 son regulados negativamente pola glucosa.

Dado que os nosos resultados indicaban que o incremento nos niveis de proteína de p53 no figado non se debían a un incremento da expresión do xén, propuxémonos identificar o mecanismo postranscripcional implicado na estabilización de p53 durante o xaxún. Mediante un ensaio de inmunoprecipitación da proteína p53 en modelos *in vitro*, identificamos que durante o xaxún dáse un incremento da *O*-GlcNAcilación de p53, que é unha modificación postranscripcional que atúa como un sensor nutricional. En consonancia, o tratamento das células con PUGNAc (axente farmacolóxico que promove e activa a *O*-GlcNAcilación das proteínas) incrementou os niveis da proteína p53 dun modo dependente da dose, mentres que o tratamento con OSMI-1 (inhibidor farmacolóxico da *O*-GlcNAcilación) diminuíu os niveis de p53 durante o xaxún, retornándoos aos niveis basais.

Unha vez demostrado que os niveis de p53 no figado se regulan pola glucemia, mediante un mecanismo dependente da *O*-GlcNAcilación, o noso seguinte propósito foi estudar a función de p53 na homeostase da glucosa. Ao someter a condicións de xaxún ás células THLE-2, observamos un incremento significativo dos niveis de proteína p53 e PCK1, que é a principal enzima limitante da gluconeoxénese, encargada de transformar o oxaloacetato en fosfoenolpiruvato e dióxido de carbono. Ademais, atopamos que os niveis de proteína e a súa actividade enzimática aumentan durante o xaxún, pero diminúen drasticamente ao silenciar p53; mentres que a sobre expresión de p53 incrementa a actividade enzimática de PCK1. Non obstante, a sobre expresión dunha versión mutante de p53, coa mutación A149S, que non se pode *O*-GlcNAcilar, non produce un incremento significativo na actividade de PCK1, poñendo de manifesto a importancia desta modificación nos efectos gluconeoxénicos de p53.

Dacordo con estes resultados, atopamos que a sobre expresión de p53 induce un incremento na produción de glucosa, e que este efecto é dependente da actividade de PCK1, xa que desaparece ao silenciar PCK1. Do mesmo modo, a sobre expresión de PCK1 nas células THLE-2 co xen p53 silenciando, permite recuperar a produción de glucosa durante o xaxún.

Para corroborar estes resultados obtidos ao silenciar p53 nas células THLE-2, empregamos un segundo modelo *in vitro*, as células Hep3B, que son hepatocitos humanos que non expresan p53. Ao someter a estas células a condicións de xaxún, os niveis de PCK1 mantivéronse inalterados, mentres que se deu un incremento dos niveis de oxaloacetato, indicando unha acumulación debida a un fluxo descompensado, ao non ser descarboxilado e fosforilado por PCK1. A recuperación da expresión de p53 nas células Hep3B produciu un incremento dos niveis de PCK1, tanto de *mRNA* como de proteína.

Cabe destacar que cando se recupera a expresión de p53 nas células Hep3B co plásmido pA149S, que non se pode *O*-GlcNAcilar, a pesar de que se restablecen os niveis de proteína de p53, non ten lugar a regulación da expresión de PCK1, efecto que só ten lugar co plásmido de

p53 WT. Observamos ademais que o incremento dos niveis de p53 que induce o xaxún non ten lugar cando a serina 149 está mutada e non se pode *O*-GlcNAcilar, así como a activación da expresión de PCK1.

Nos ratos WT, os niveis de *mRNA* e de proteína incrementáanse de forma notable ás 6 horas de xaxún, e persisten elevados tras 24 horas de xaxún, retornando aos niveis basais trala realimentación. Atopamos ademais que os niveis hepáticos de p53 correlacionan positivamente cos niveis de *mRNA* e de proteína de PCK1 ás 6 horas de xaxún, e que esta correlación mantense positiva durante as 12 e 24 horas de xaxún, ata que finalmente desaparece trala realimentación. Esta correlación positiva entre os niveis de p53 e PCK1 fan pensar que p53, como factor de transcripción, podería estar regulando a expresión de PCK1. Motivados por estas evidencias, buscamos os potenciais sitios de unión para p53 localizados na rexión do promotor do xén de PCK1 empregando a base de datos de JASPAR, onde atopamos 3 motivos putativos para p53. Atopamos 8 elementos consenso para p53 na rexión das primeiras -1330 pares de bases (pb) ubicadas antes do lugar do inicio da transcripción do promotor de PCK1. Para avaliar a capacidade de p53 para regular a transcripción de PCK1, realizamos un ensaio de actividade luciferasa nas células Hep3B, en presenza ou ausencia de p53. Con esta finalidade, empregamos plásmidos que expresaban a luciferasa baixo a actividade de dous fragmentos de diferente tamaño do promotor de PCK1, o plásmido pADTrack-1330-pck1 e o plásmido pADTrack-490-pck1. Atopamos que a cotransfección de p53 cos dous plásmidos do promotor de PCK1 incrementan significativamente a actividade luciferasa, o que indica que o lugar de unión para p53 debe estar localizado na rexión compartida por ambos plásmidos do fragmento do promotor de PCK1. Para avaliar a interacción directa entre p53 e PCK1, levamos a cabo unha inmunoprecipitación da cromatina, que confirmou a interacción na rexión máis proximal do promotor de PCK1.

Para corroborar estes resultados obtidos *in vitro*, realizamos de novo un CHIP *in vivo*, en ratos WT alimentados *ad libitum* ou sometidos a unha restrición calórica do 60%, unha condición fisiolóxica que promove a gluconeoxénese hepática. Atopamos que, nestas condicións, hai un enriquecemento da unión de p53 ao promotor de PCK1.

Para investigar en detalle a relevancia da *O*-GlcNAcilar de p53 na regulación dos niveis de PCK1, tratamos ás nosas células THLE-2 con PUGNAc, ataopando un incremento significativo dos niveis de PCK1 que, pola contra, non ten lugar cando silenciámos p53. Dacordo con estes resultados, a estimulación da *O*-GlcNAcilar nas células Hep3B non afecta aos niveis de PCK1, mentres que a recuperación da expresión de p53 nestas células permite que o efecto estimulador de PUGNAc sobre PCK1 teña lugar. En consonancia con estes resultados, observamos que cando recuperamos a expresión de p53 nas células Hep3B co plásmido pA149S, e tratamos ás células con PUGNAc, non ten lugar nin o incremento nos niveis de p53 estimulados polo tratamento, nin o incremento dos niveis de PCK1. Tomando os nosos datos en conxunto, observamos que p53 únese ao promotor de PCK1 modulando a súa expresión, sendo necesaria a estabilización de p53 mediante a súa *O*-GlcNAcilar.

A relación entre p53 e PCK1 que mostraron os nosos datos, levounos a xerar dous modelos animais que non expresan p53 no fígado, para estudar en detalle o papel do p53 endóxeno no metabolismo da glucosa. Con esta finalidade, un modelo animal xerouse inxectando o virus AAVO-Cre na vea da cola dos ratos adultos co xén p53 floxeado (ratos floxp53). O outro modelo animal xerouse cruzando ratos floxp53 cor ratos que xeneticamente expresan a recombinasa Cre baixo a actividade do promotor da albumina e o *enhancer* da α -fetoproteína (ratones Alfp-Cre), que xeran unha proxenie que carece do xén p53 especificamente no fígado. Estes dous modelos animais non mostraron diferenzas en inxesta, masa corporal, tolerancia á glucosa ou sensibilidade a insulina respecto aos seus grupos control.

Porén, mostraron baixos niveis de glucosa en sangue trala administración do piruvato, evidenciando unha capacidade gluconeoxénica deteriorada.

Para engadir unha visión funcional aos nosos datos, sometemos aos nosos ratons a unha restrición calórica do 60%, condición fisiolóxica que incrementa a produción hepática de glucosa. Durante a restrición calórica, os animais que non expresan p53 no fígado non son capaces de manter a glicemia nos mesmos valores que os animais do grupo control, sufrindo unha marcada hipoglicemia. En consonancia con estes resultados, os ratos que non expresan p53 no fígado mostran unha menor produción hepática de glucosa durante a restrición calórica.

A recuperación específica da expresión de p53 no fígado dos nosos animais reverteu a marcada hipoglicemia experimentada durante a restrición calórica, mostrando uns niveis de glucosa en sangue similares aos observados no grupo control. A nivel molecular, observamos que os cambios nos niveis de PCK1 concordan cos perfís glicémicos dos diferentes grupos experimentais, sendo elevados nos ratos do grupo control sometidos a restrición calórica e que manteñen niveis de glucosa estables; mentres que os ratos que non expresan p53 no fígado, os niveis de PCK1 e de glucosa circulantes son baixos. A recuperación da expresión de p53 permite o incremento de novo de PCK1 nos nosos modelos animais durante a restrición.

Unha vez estudado o efecto da diminución dos niveis hepáticos de p53 no metabolismo da glucosa, quixemos avaliar as consecuencias da sobre expresión específica de p53 no fígado. Para levar isto a cabo, realizamos un ensaio de ganancia de función, no que se incrementaron os niveis de p53 no fígado dos ratos Alfp-Cre, administrando o virus AAV8-DIO-p53-EGFP, con actividade dependente da recombinasa Cre. Os nosos resultados amosaron un incremento nos niveis de glucosa circulante durante a PTT, sen cambios na GTT e ITT.

Habendo demostrado que o p53 endógeno exerce un papel moi importante na regulación da gluconeoxénese hepática, o noso seguinte propósito foi investigar se p53 podería mediar o efecto das hormonas contra reguladoras. Ao tratar as células THLE-2 con glucagón, observamos un incremento significativo dos niveis de proteína de p53. Esta estabilización de p53 inducida polo glucagón non ten lugar cando as células son tratadas con OSMI-1, indicando que a *O*-GlcNAcilación media o efecto do glucagón sobre p53.

A continuación, avaliamos o efecto da inhibición de p53 nas células THLE-2 tratadas con glucagón. Aínda que nestas condicións o glucagón induce a fosforilación de CREB, non ten lugar o incremento nos niveis de PCK1 nin na actividade de PCK1. Para corroborar estes datos, tratamos as células THLE-2 con forskolina que, ao igual que o glucagón, incrementan os niveis intracelulares de AMPc activando a PKA. Observamos que a forskolina induce a fosforilación de CREB e, ao igual que observamos previamente co tratamento co glucagón, incrementa os niveis de p53. Non obstante, ao silenciar p53 nas células, a forskolina non é capaz de incrementar os niveis de PCK1 nin a produción de glucosa.

Ao igual que o glucagón, a adrenalina e os glucocorticoides son hormonas contra reguladoras moi importantes. Ao tratar ás células THLE-2 con adrenalina e hidrocortisona, observamos un incremento significativo dos niveis de proteína de p53. Cabe destacar que a estabilización de p53 inducida pola adrenalina e a hidrocortisona é inhibida ao tratar ás células con OSMI-1, indicando que os efectos destas hormonas sobre p53 son mediados pola *O*-GlcNAcilación. A continuación, estudiamos o efecto da inhibición de p53 nas accións da adrenalina e os glucocorticoides sobre a gluconeoxénese hepática. Atopamos que nin a adrenalina nin a hidrocortisona son capaces de incrementar os niveis de PCK1 nin a súa actividade en ausencia de p53. En consonancia con estes resultados, estas hormonas tampouco son capaces de inducir un incremento nos niveis de PCK1 nas células Hep3B. Estes resultados foron corroborados *in vivo*, onde vimos que a administración destas hormonas incrementa

os niveis hepáticos de p53, así como que, nos modelos animais que carecen de p53 no fígado, estas hormonas son incapaces de promover a gluconeoxénese.

Unha vez determinado o efecto de p53 mediando as accións das hormonas contra reguladoras, propuxémonos determinar o papel de p53 nos efectos da insulina. Ao tratar con insulina ás células THLE-2 sometidas a xaxún, observamos unha diminución dos niveis de p53 nun modo dependente da dose, así como unha diminución dos niveis de PCK1. Ademais, ao sobre expresar p53 nos hepatocitos, a insulina perde a capacidade de inhibir os niveis de proteína e a actividade de PCK1, e de reducir a produción hepática de glucosa. Do mesmo modo, cando o incremento dos niveis de p53 ten lugar co tratamento con PUGNAc, que induce a *O*-GlcNAcilación e un incremento nos niveis de proteína de p53, obtense o mesmo resultado, observando que, de novo, a insulina non é capaz de reducir os niveis de PCK1.

Dacordo con estes resultados obtidos *in vitro*, observamos un incremento significativo dos niveis de PCK1 ao sobre expresar p53 no fígado dos ratos WT, que vai acompañado dunha diminución da sensibilidade á insulina.

Dada a relevancia de p53 na regulación da sensibilidade a insulina no fígado, o noso seguinte obxectivo foi estudar a implicación dos niveis de p53 na regulación da glicemia postprandial, un indicador fundamental da sensibilidade a insulina, e estreitamente ligar ao desenvolvemento de diabetes tipo 2. Con esta finalidade, realizamos un ensaio de tolerancia a glucosa postprandial nos ratos que sobre expresan p53 no fígado. Mentres que non observamos diferenzas na cantidade de comida ingerida, os ratos con elevados niveis de p53 no fígado mostraron unha glicemia significativamente incrementado respecto aos ratos do grupo control. Observouse o mesmo resultado cando os animais se alimentaron con dieta alta en graxa, onde a sobre expresión de p53 empeorou a tolerancia a glucosa postprandial.

Avaliamos a continuación o impacto da diminución dos niveis hepáticos de p53 na tolerancia á glucosa postprandial. Os modelos animais que non expresan p53 no fígado mostraron unha mellor tolerancia á glucosa postprandial, tanto ao ser alimentados con dieta estándar como con dieta alta en graxa.

Dado que unha hiperglicemia postprandial elevada é unha característica principal do desenvolvemento de diabetes tipo 2, avaliamos a implicación clínica de p53 nos pacientes humanos con diabetes. Así, avaliamos os niveis de p53 no fígado de pacientes obesos clasificados en función da súa normoglicemia ou diabetes tipo 2, atopando un incremento significativo no último grupo, tanto dos niveis de p53, como de PCK1 e as principais proteínas implicadas na *O*-GlcNAcilación. Atopamos ademais que os niveis de proteína de p53 correlacionan positivamente coa resistencia a insulina e os niveis de glucosa 2 h despois da inxesta.

En resumo, os nosos resultados indican por primeira vez que: a) os niveis de proteína p53 no fígado están fortemente regulados polo estado nutricional, sendo os niveis de glucosa circulante unha importante sinal reguladora; b) que a estabilización de p53 polo estado nutricional é dependente da *O*-GlcNAcilación; c) que p53 é fundamental para a gluconeoxénese hepática e para a regulación directa da expresión de PCK1; d) que p53 é imprescindible para as accións glucorreguladoras do glucagón, da adrenalina, o cortisol e a insulina, así como os seus efectos sobre PCK1; e) que o incremento dos niveis de proteína de p53 xera resistencia a insulina; e f) que os pacientes obesos con diabetes tipo 2 mostran un incremento dos niveis de proteína de p53, PCK1 e as principais enzimas implicadas na *O*-GlcNAcilación.





Abreviaturas y anglicismos

- AAV: adenovirus asociado.
- AC: adenilil ciclasa.
- Ad: adenovirus.
- AGL: enzima desramificadora de glucógeno (*glycogen debranching enzyme*).
- AMP: adenosín monofosfato.
- AMPc: adenosín monofosfato cíclico.
- AMPK: proteína quinasa activada por AMP (*AMP-activated protein kinasae*).
- ATP: adenosín trifosfato.
- BAs: ácidos biliares (*bile acids*).
- BMI/IMC: índice de masa corporal.
- BSA: seroalbúmina bovina.
- CBP: proteína de unión a CREB (*CREB-binding protein*).
- ChIP: inmunoprecipitación de la cromatina (*chromatin immunoprecipitation*).
- CRTC2: coactivador transcripcional regulado por CREB 2 (*CREB regulated transcription coactivator 2*).
- CREB: proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (*cAMP response element-binding protein*).
- DMSO: dimetil sulfóxido.
- DNA/ADN: ácido desoxirribonucleico.
- DPP4: dipeptidil peptidasa 4 (*dipeptidyl peptidase-4*).
- DT2: diabetes mellitus tipo 2.
- FADH₂: flavín adenín dinucleótido.
- FGF: factor de crecimiento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*).
- FOXO1: *forkhead box protein 01*.
- FXR: receptor X farnesoide (farnesoid X receptor).
- G1P: glucosa-1-fosfato.
- G6P: glucosa-6-fosfato.
- G6Pasa: glucosa-6-fosfatasa.
- GCGR: receptor del glucagón (*glucagon receptor*).
- GFAT1: glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa 1.
- GFP: proteína verde fluorescente.
- GH: hormona del crecimiento (*growth hormone*).
- GIP: polipéptido inhibidor gástrico (*gastric inhibitory polypeptide*).
- GIPR: receptor de GIP (*GIP receptor*).
- GK: glucosa quinasa.
- GKRP: proteína reguladora de la glucokinasa (*glucokinase regulatory protein*).
- GliTT: test de tolerancia al glicerol (*glycerol tolerance test*).
- GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1 (*glucagon-like peptide 1*).
- GLP-1R: receptor de GLP-1 (*GLP-1 receptor*).
- GLUT: transportador de glucosa (*glucose transporter*).
- GLUT2: transportador de glucosa 2 (*glucose transporter 2*).
- GOAT: *ghrelin-O-acyl transferase*.
- GP: glucógeno fosforilasa.

- GPCR: receptor de 7 dominios transmembrana asociado a proteínas G (*G protein-coupled receptors*).
- GR: receptor de glucocorticoides (*glucocorticoid receptor*).
- GRES: elementos de respuesta a glucocorticoides
- GRUS: unidades de respuesta a glucocorticoides.
- GS: glucógeno sitansa.
- GTP: guanosín trifosfato (*guanosine triphosphate*).
- GTT: test de tolerancia a la glucosa (*glucose tolerance test*).
- HCC: hepatocarcinoma.
- HFD: dieta alta en grasa (*high fat diet*).
- HNF4a: factor nuclear 4 alfa de hepatocito (*hepatocyte nuclear factor 4 alpha*).
- HPA: eje hipotálamo-pituitaria-glándula adrenal.
- HPRT: *hypoxanthine phosphoribosyltransferase*.
- INSIG2: insulín induced gene 2.
- IP: inmunoprecipitación.
- IP: intraperitoneal.
- IR: receptor de insulina (*insulin receptor*).
- IRS: sustrato receptor de insulina (*insulin receptor substrate*).
- ITT: test de tolerancia a la insulina (*insulin tolerance test*).
- JNK: quinasa C-Jun N-terminal (*C-Jun N-terminal kinase*).
- KHH: Krebs-Henseleit-HEPES.
- KO: *knock out*.
- LDH: lactato deshidrogenasa.
- loxp: *locus crossover (x) in P1*.
- LXR: receptor hepático X (*liver X receptor*).
- MDM2: *murine double minute 2*.
- MDM4: *murine double minute 4*.
- miRNA: micro RNA.
- mRNA: RNA mensajero.
- NADH: nicotín adenín dinucleótido.
- NAFLD: enfermedad del hígado graso no alcohólico (*non alcoholic fatty liver disease*).
- NAS: NAFLD activity score.
- NEFAS: ácidos grasos no esterificados (*non-esterified fatty acids*).
- OGA: O-GlcNAcasa.
- OGT: O-GlcNAc transferasa.
- OMS: organización mundial de la salud.
- PBS: tampón fosfato salino (*phosphate buffer saline*).
- PC: piruvato carboxilasa (*pyruvate carboxylase*).
- PCK: fosfoenolpiruvato carboxikinasa (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*).
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*).
- PDH: complejo de la piruvato deshidrogenasa (*pyruvate dehydrogenase*).
- PDKs: kinasas de la piruvato deshidrogenasa (*pyruvate dehydrogenase kinases*).
- PFK: fosfofructokinasa (*phosphofructokinase*).
- PGC1alpha: coactivador 1-alpha del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha*).

- PGM: fosfoglicerato mutasa.
- PI3K: fosfatidilinositol 3-kinasa (*phosphatidylinositol 3-kinase*).
- PK: piruvato kinasa (*pyruvate kinase*).
- PKA: proteína kinasa A (*protein kinase A*).
- PPAR γ : receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*).
- PTT: test de tolerancia al piruvato (*pyruvate tolerance test*).
- RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*real time polymerase chain reaction*).
- SCN: núcleo supraquiasmático (*suprachiasmatic nucleus*).
- SDS-PAGE: gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
- SEM: desviación estándar de la media.
- SF1: factor de transcripción esteroideogénico 1 (*steroidogenic factor 1*).
- siRNA: pequeño RNA interferente (*small-interfering RNA*).
- TAGs: triacilglicéridos.
- THLE-2: *transformed human liver epithelial-2*.
- VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad (*very low-density lipoprotein*).
- VNM: núcleo ventromedial (*ventromedial nucleus*).

Anglicismos:

Ballooning: abalonamiento.

Downstream: más abajo.

Upstream: más arriba.

Knock out.



Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	29
1.1 HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.....	30
1.1.1 HORMONAS HIPOGLUCEMIANTES.....	30
1.1.1.1 <i>Insulina</i>	30
1.1.1.2 <i>Amilina</i>	30
1.1.1.3 <i>Incretinas</i>	31
1.1.1.3.1 <i>GIP</i>	31
1.1.1.3.2 <i>GLP-1</i>	31
1.1.2 HORMONAS HIPERGLUCEMIANTES.....	32
1.1.2.1 <i>Glucagón</i>	32
1.1.2.2 <i>Adrenalina</i>	33
1.1.2.3 <i>Glucocorticoides</i>	33
1.1.2.4 <i>Hormona del crecimiento</i>	34
1.2 PAPEL DEL HÍGADO EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.....	34
1.2.1 UTILIZACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA GLUCOSA EN EL HÍGADO.....	35
1.2.2 PRODUCCIÓN HEPÁTICA DE GLUCOSA.....	36
1.2.2.1 <i>Glucogenolisis</i>	36
1.2.2.2 <i>Gluconeogénesis</i>	37
1.2.2.3 <i>Regulación de la producción hepática de glucosa</i>	40
1.2.2.4 <i>Hiperglicemia y diabetes</i>	47
1.3 P53.....	49
1.3.1 ESTRUCTURA DE P53.....	49
1.3.2 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE P53.....	50
1.3.1.1 <i>O-GlcNAcilación</i>	51
1.4 FUNCIONES DE P53.....	54
1.4.1 PAPEL DE P53 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO.....	55
1.4.2 PAPEL DE P53 EN EL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS.....	55
1.4.3 PAPEL DE P53 EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA.....	56
2. OBJETIVOS.....	61
3. HIPÓTESIS.....	65
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
4.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	69
4.1.1. MODELOS ANIMALES.....	69
4.1.2 PROCEDIMIENTOS EN LOS ANIMALES.....	70
4.1.2.1 <i>Monitorización de la ingesta y la masa corporal</i>	70
4.1.2.2 <i>Efecto del estado nutricional en los niveles hepáticos de p53</i>	70
4.1.2.3 <i>Efecto de la concentración de glucosa en sangre sobre los niveles hepáticos de p53</i>	70
4.1.2.4 <i>Inyección intraperitoneal</i>	70
4.1.2.5 <i>Test de tolerancia a glucosa</i>	71
4.1.2.6 <i>Test de tolerancia a insulina</i>	71
4.1.2.7 <i>Test de tolerancia a piruvato</i>	71
4.1.2.8 <i>Test de tolerancia a glicerol</i>	71
4.1.2.9 <i>Administración de hormonas</i>	72

4.1.2.9.1 <i>Leptina</i>	72
4.1.2.9.2 <i>Glucagón</i>	72
4.1.2.9.3 <i>Cortisol</i>	72
4.1.2.9.4 <i>Adrenalina</i>	72
4.1.2.9.5 <i>Insulina</i>	72
4.1.2.10 <i>Restricción calórica</i>	73
4.1.2.11 <i>Test de tolerancia a la glucosa postprandial</i>	73
4.1.2.12 <i>Inyección en la vena de la cola</i>	74
4.1.2.13 <i>Estudio de la sensibilidad a insulina en el hígado</i>	76
4.1.2.14 <i>Determinación de la producción hepática de glucosa</i>	76
4.1.2.15 <i>Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en muestras de hígado</i>	77
4.1.2.16 <i>Análisis histológico del tejido hepático</i>	78
4.1.2.17 <i>Sacrificio, recogida de tejidos y muestras</i>	78
4.2 CULTIVOS CELULARES	78
4.2.1 THLE-2 (TRANSFORMED HUMAN LIVER EPITHELIAL-2).....	78
4.2.2 HEP3B.....	79
4.3 TRATAMIENTOS CELULARES	79
4.3.1 TRANSFECCIONES TRANSITORIAS.....	80
4.3.1.1 <i>Silenciamiento de p53 y PCK1 en las células THLE-2</i>	80
4.3.1.2 <i>Sobre expresión de p53, PCK1 y pA149S en las células THLE-2</i>	80
4.3.1.3 <i>Sobre expresión de p53 y pA149S en las células Hep3B</i>	80
4.3.2 EFECTO DEL ESTADO NUTRICIONAL.....	81
4.3.3 ESTUDIO DE LA O-GLCNACILACIÓN DE P53.....	81
4.3.4 ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS PRINCIPALES HORMONAS GLUCORREGULADORAS.....	81
4.3.5 MEDICIÓN DE LA GLUCOSA EN MEDIO.....	82
4.3.6 MEDICIÓN DEL CONTENIDO CELULAR DE OXALOACETATO.....	82
4.3.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PCK1.....	83
4.3.8 INMUNOPRECIPITACIÓN DE P53.....	83
4.3.9 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA.....	84
4.3.10 INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA IN VITRO.....	84
4.4 MUESTRAS DE HÍGADO DE PACIENTES HUMANOS	85
4.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS	86
4.5.1 DETECCIÓN DE METABOLITOS EN SUERO.....	86
4.5.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL.....	86
4.5.2.1 <i>Extracción del ARN</i>	86
4.5.2.2 <i>Cuantificación de ARN</i>	87
4.5.2.3 <i>Retrotranscripción</i>	87
4.5.2.4 <i>PCR en tiempo real</i>	88
4.5.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN MEDIANTE WESTERN BLOT.....	89
4.5.3.1 <i>Extracción de proteína</i>	89
4.5.3.2 <i>Cuantificación de los extractos proteicos</i>	90
4.5.3.3 <i>Preparación de las muestras para la electroforesis SDS-PAGE</i>	90
4.5.3.4 <i>Electroforesis en SDS-PAGE</i>	91
4.5.3.5 <i>Transferencia semi-húmeda</i>	91
4.5.3.6 <i>Inmunodetección</i>	92
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	93
4.7 DISEÑO EXPERIMENTAL	94
4.7.1 DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE P53 EN EL HÍGADO.....	94
4.7.2 RATONES KNOCK OUT PARA P53 EN EL HÍGADO.....	95
4.7.3. SOBRE EXPRESIÓN DE P53 EN RATONES ALFP-CRE.....	95
4.7.4 REALIZACIÓN DE GTT, ITT, PTT Y GLITT.....	96
4.7.5 REALIZACIÓN DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA Y RECUPERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS NIVELES HEPÁTICOS DE P53 EN LOS RATONES ALFP-CRE FLOXP53.....	96

4.7.6 REALIZACIÓN DE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA Y RECUPERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS NIVELES DE P53 EN LOS RATONES FLOXP53 + AAV8-CRE.	97
4.7.7 ADMINISTRACIÓN DE HORMONAS HIPERGLUCEMIANTES	98
4.7.8 ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTADO NUTRICIONAL EN LA REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE P53 <i>IN VITRO</i>	98
4.7.9 ESTUDIO DE LA <i>O</i> -GLCÑACILACIÓN DE P53 <i>IN VITRO</i>	99
4.7.10 SOBRE EXPRESIÓN DE P53 EN LA LÍNEA CELULAR THLE-2.	101
4.7.11 INHIBICIÓN DE P53 EN LA LÍNEA CELULAR THLE-2.	102
4.7.12 SOBRE EXPRESIÓN DE P53 EN LA LÍNEA CELULAR HEP3B.	104
4.7.13 SOBRE EXPRESIÓN DE P53 E INHIBICIÓN DE PCK1 EN LAS CÉLULAS THLE-2.	106
4.7.14 INHIBICIÓN DE P53 Y SOBRE EXPRESIÓN DE PCK1.	106

5. RESULTADOS..... 111

5.1 EL ESTADO NUTRICIONAL REGULA LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE P53 EN EL HÍGADO A TRAVÉS DE SU <i>O</i>-GLCÑACILACIÓN.....	111
5.1.1 LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE P53 EN EL HÍGADO SE INCREMENTAN DURANTE EL AYUNO SIN CAMBIOS EN LOS NIVELES DE <i>mRNA</i> DE P53.	111
5.1.2 LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE P53 SE REGULAN POR LA GLUCOSA <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	112
5.1.3 LA <i>O</i> -GLCÑACILACIÓN ESTABILIZA A P53 DURANTE EL AYUNO.	113
5.2 P53 SE UNE AL PROMOTOR DE PCK1 Y REGULA SU EXPRESIÓN.....	114
5.2.1 P53 PROMUEVE LA EXPRESIÓN DE PCK1.	114
5.2.2 LOS NIVELES DE P53 Y PCK1 CORRELACIONAN DURANTE EL AYUNO <i>IN VIVO</i>	117
5.2.3 P53 SE UNE AL PROMOTOR DE PCK1.	118
5.2.4 LA <i>O</i> -GLCÑACILACIÓN PROMUEVE LA GLUCONEOGÉNESIS A TRAVÉS DE P53.	119
5.3 LOS RATONES QUE NO EXPRESAN P53 EN EL HÍGADO MUESTRAN UNA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA DETERIORADA.	120
5.3.1 LOS RATONES QUE NO EXPRESAN P53 PRODUCEN MENOS GLUCOSA HEPÁTICA.	120
5.3.2 LA RECUPERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE P53 REVIERTE LA HIPOGLUCEMIA DE LOS RATONES SIN P53 HEPÁTICO DURANTE LA RESTRICCIÓN CALÓRICA.	124
5.3.3 LA SOBRE EXPRESIÓN DE P53 EN EL HÍGADO INCREMENTA LA GLUCONEOGÉNESIS HEPÁTICA.	126
5.4 P53 ES NECESARIO PARA LAS ACCIONES GLUCONEOGENICAS DEL GLUCAGÓN EN EL HÍGADO.....	128
5.4.1 EL INCREMENTO DE LOS NIVELES HEPÁTICOS DE P53 INDUCIDOS POR EL GLUCAGÓN REQUIERE DE LA <i>O</i> -GLCÑACILACIÓN	128
5.4.2 EL GLUCAGÓN REQUIERE DE P53 PARA ESTIMULAR LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE PCK1.	128
5.4.3 EL GLUCAGÓN REQUIERE DE P53 PARA ESTIMULAR LA PRODUCCIÓN DE GLUCOSA <i>IN VIVO</i>	130
5.5 P53 ES NECESARIO PARA EL EFECTO GLUCONEOGENICO DE LA ADRENALINA Y LOS GLUCOCORTICOIDES.	131
5.5.1 LA ADRENALINA Y LOS GLUCOCORTICOIDES INCREMENTAN LOS NIVELES DE P53 EN EL HÍGADO POR UN MECANISMO DEPENDIENTE DE LA <i>O</i> -GLCÑACILACIÓN.	131
5.5.2 LA ADRENALINA Y LOS GLUCOCORTICOIDES REQUIEREN DE P53 PARA ESTIMULAR LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE PCK1.	132
5.5.3 LA ADRENALINA Y LOS GLUCOCORTICOIDES REQUIEREN DE P53 PARA ESTIMULAR LA PRODUCCIÓN DE GLUCOSA <i>IN VIVO</i>	133
5.6 LA SOBRE EXPRESIÓN DE P53 EN LOS HEPATOCITOS REDUCE LA SENSIBILIDAD A INSULINA.	134

5.6.1 LA INSULINA REGULA NEGATIVAMENTE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE P53 EN LOS HEPATOCITOS.....	134
5.6.2 LA SOBRE EXPRESIÓN DE P53 EN LOS HEPATOCITOS GENERA RESISTENCIA A INSULINA. ...	135
5.6.3 LA SOBRE EXPRESIÓN DE P53 EN EL HÍGADO GENERA RESISTENCIA A INSULINA <i>IN VIVO</i> . .	137
5.7 P53 AFECTA A LA TOLERANCIA DE LA GLUCOSA POSTPRANDIAL Y SE ASOCIA CON LA DIABETES TIPO 2 EN HUMANOS.....	138
5.7.1 LA SOBRE EXPRESIÓN DE P53 EN EL HÍGADO CAUSA HIPERGLICEMIA POSTPRANDIAL.....	138
5.7.2 LA INHIBICIÓN DE P53 EN EL HÍGADO MEJORA LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA POSTPRANDIAL.....	139
5.7.3 LOS NIVELES HEPÁTICOS DE P53 ESTÁN DIFERENCIALMENTE INCREMENTADOS EN LOS PACIENTES HUMANOS CON DIABETES TIPO 2.	140
<u>6. DISCUSIÓN.....</u>	<u>149</u>
<u>7. CONCLUSIONES.....</u>	<u>159</u>
<u>8. BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>163</u>







INTRODUCCIÓN





1. INTRODUCCIÓN.

1.1 HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.

La glucosa es la principal fuente de energía para la mayoría de los organismos eucariotas, proporcionando energía y metabolitos para que las células puedan realizar sus funciones y dividirse. En los mamíferos, la glucosa es la principal o la única fuente de energía para determinados tejidos y órganos, denominados glucodependientes, como son el cerebro, los riñones o los glóbulos rojos. En estado postprandial, el cerebro y el sistema nervioso representan el 50% del consumo de total de glucosa; los tejidos dependientes de insulina, principalmente el músculo, suponen el 25%, mientras que los demás órganos y tejidos constituyen, en su conjunto, el 25% restante [1, 2]. Por ello, el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa constituye un mecanismo fundamental para la supervivencia de los organismos.

Los niveles de glucosa plasmáticos son el resultado de un delicado balance entre la glucosa que se obtiene de la dieta mediante la absorción intestinal, la glucólisis y la gluconeogénesis [3]. En estado postprandial, los carbohidratos de la dieta se digieren y procesan por las glucosidasas en el tracto gastrointestinal, dando lugar a los monosacáridos, principalmente la hexosa glucosa [4]. Esta es transportada por el torrente sanguíneo hasta los diferentes tejidos, donde se metaboliza como fuente principal de ATP. En la mayoría de los tejidos, el catabolismo de la glucosa a piruvato, denominado glucólisis, supone la principal ruta metabólica para la obtención de ATP. En los tejidos que tienen abundantes mitocondrias, el piruvato citosólico se transporta hasta la matriz mitocondrial, donde se convierte a acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH), y se incorpora al ciclo de Krebs (ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarbónicos) conjugada al oxaloacetato, dando lugar al citrato. El ciclo de Krebs genera energía en forma de GTP (que es equivalente al ATP) y NADH y FADH₂, que se acoplan a la cadena de la fosforilación oxidativa para generar, a través de un gradiente de protones, más ATP. En determinados casos, como en los glóbulos rojos, que carecen de mitocondrias, o en condiciones de isquemia, el piruvato no se transporta hasta la matriz mitocondrial, sino que se convierte a lactato en el citosol, para regenerar los niveles de NAD⁺, necesarios para la generación de ATP por el proceso denominado glucólisis anaerobia [4].

En estado de ayuno, el aporte de glucosa al torrente sanguíneo proviene de la producción endógena de glucosa. Los principales órganos encargados de producir glucosa para el resto de tejidos son el hígado y los riñones, ya que, aunque muchos otros tejidos son capaces de almacenar glucógeno o realizar la gluconeogénesis (como el músculo), solo el hígado y los riñones expresan la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), la enzima necesaria para desfosforilar a la glucosa intracelular y que esta pueda salir de las células hacia el torrente sanguíneo. Los riñones juegan un papel importante en la homeostasis de la glucosa ya que, además de realizar la gluconeogénesis, captan la glucosa de la circulación y la reabsorben del filtrado glomerular [5]. Sin embargo, mientras que el aporte de glucosa por los riñones parece ser importante en condiciones de acidosis o de ayuno prolongado [6], el hígado constituye la principal fuente de glucosa en estado de ayuno o de elevada demanda energética, ya que contiene, junto con el músculo, el principal almacén de glucógeno del organismo, y es capaz de sintetizar glucosa *de novo* a partir de glicerol (procedente de la lipólisis en el tejido adiposo) y lactato y alanina (procedentes del tejido muscular), así como sintetizar cuerpos cetónicos a partir de la oxidación de los ácidos grasos libres, que junto con la glucosa, sirven también como sustratos energéticos para los demás tejidos y órganos.

Para poder llevar a cabo estas acciones fisiológicas que mantienen los niveles de glucosa circulantes dentro del rango homeostático, es necesaria una estrecha coordinación entre los sistemas que detectan los niveles circulantes de glucosa (principalmente el sistema nervioso central, el tracto gastrointestinal, el páncreas y el hígado) y el resto de tejidos y órganos. Esta comunicación sistémica se lleva a cabo principalmente por la acción coordinada de las principales hormonas involucradas en la homeostasis de la glucosa u hormonas glucorreguladoras. Estas pueden clasificarse en función de su capacidad para disminuir los niveles de glucosa circulantes (hormonas hipoglucemiantes) o aumentarlos (hormonas hiperoglucemiantes o contrarreguladoras).

1.1.1 Hormonas hipoglucemiantes.

La insulina es la principal hormona encargada de disminuir los niveles circulantes de glucosa, y su acción se ve reforzada con la actuación de otras hormonas importantes como son la amilina y las incretinas.

1.1.1.1 Insulina.

Descubierta en 1921 por Banting y Best [7, 8], la insulina es la principal hormona hipoglucemiante. Es producida y secretada por las células β del páncreas en respuesta a niveles elevados de glucosa circulante, fundamentalmente después de la ingesta de alimentos. Estructuralmente, consta de dos cadenas de polipéptidos de 51 amino ácidos, y una vez liberada al torrente sanguíneo ejerce sus funciones uniéndose específicamente a su receptor, denominado receptor de insulina (IR), presente principalmente en el sistema nervioso, el tejido adiposo, el hígado y el músculo [9].

La insulina regula la glucosa postprandial fundamentalmente de tres modos. En primer lugar, potencia la captación de glucosa y la glucólisis por los tejidos periféricos sensibles a insulina, principalmente el músculo esquelético. En segundo lugar, la insulina promueve la síntesis de glucógeno e inhibe la gluconeogénesis en el hígado y, finalmente, inhibe la secreción de glucagón por las células α del páncreas. Todas estas acciones tienen como resultado final una disminución de los niveles circulantes de glucosa. Otras acciones de la insulina incluyen la estimulación de la síntesis de lípidos, almacenamiento de triacilglicéridos (TAGs) en los adipocitos, síntesis de proteínas en el hígado y en el músculo, y crecimiento celular [9-11].

En estado postprandial, la secreción de insulina tiene lugar en dos fases: una fase inicial rápida, de insulina previamente sintetizada y almacenada en vesículas en las células β del páncreas; y una fase tardía donde la insulina es sintetizada *de novo*, y que tiene lugar si los niveles de glucosa circulantes permanecen elevados [12]. Aunque la glucosa es el estímulo más potente para la secreción de insulina, otros factores activan también su síntesis y liberación. Estos incluyen incrementos en los niveles circulantes de aminoácidos (especialmente arginina, leucina y lisina); la acción de las hormonas GLP-1 y GIP, liberadas tras las ingesta de alimentos; y la estimulación por el sistema nervioso parasimpático a través del nervio vago [9].

1.1.1.2 Amilina.

La amilina es un péptido de 37 amino ácidos, que fue descrito por primera vez en 1987. Se colocaliza junto a la insulina en las células β del páncreas, y se secretan juntas en una ratio de 20:1 (insulina:amilina). Diferentes estudios en humanos han demostrado que el perfil de secreción y de concentración en plasma de la amilina es similar al de la insulina, siendo elevado tras la ingesta de alimentos y bajo en estado de ayuno [9]. Los resultados preclínicos del estudio de esta hormona señalan que la amilina ejerce una función coordinada con la insulina para prevenir los incrementos bruscos de glucosa en sangre tras la ingesta. Se ha descrito que la amilina complementa las acciones hipoglucemiantes de la insulina mediante dos mecanismos principales: por un lado, suprime la secreción postprandial de glucagón, disminuyendo así el aporte de glucosa hepática al torrente sanguíneo tras la ingesta de alimentos; y por otro lado, la amilina disminuye la tasa de vaciado gástrico, y por lo tanto, la velocidad a la que los nutrientes pasan del estómago al intestino delgado para su absorción. Junto con estas funciones principales, se ha descrito también que la amilina reduce la ingesta y peso corporal en modelos animales preclínicos [9, 13].

1.1.1.3 Incretinas.

A finales de 1967, Perley y Kipins demostraron que la ingesta de alimentos producía un incremento de insulina superior al de la infusión directa de glucosa intravenosa [14]. Este efecto se denominó “efecto incretina”, y sugería que algunas sustancias secretadas por el tracto gastrointestinal favorecían la liberación de insulina tras la ingesta. Actualmente sabemos que los péptidos intestinales que se liberan en respuesta a la ingesta son los responsables de este fenómeno. Los dos péptidos más importantes y estudiados en el contexto de la homeostasis de la glucosa son el GIP y el GLP-1.

1.1.1.3.1 GIP.

Fue la primera incretina descrita, en la década de 1970. El GIP (polipéptido inhibidor gástrico) es un péptido de 42 aminoácidos, que se obtiene a partir de un precursor de 153 aminoácidos, denominado proGIP. Es sintetizado en las células K del intestino delgado, principalmente en el duodeno y el yeyuno. Durante el ayuno, los niveles circulantes de GIP son bajos, y estos aumentan tras la ingesta, por la estimulación directa de la glucosa y los lípidos de la dieta. Una vez secretado, el GIP estimula la producción y liberación de insulina uniéndose directamente a su receptor (GIPR) localizado en las células β del páncreas. Es importante resaltar que este efecto insulínico solo tiene lugar si los niveles plasmáticos de glucosa son elevados, ya que, aunque el GIP sea liberado también por la presencia de lípidos en la dieta, si los niveles de glucosa circulante son bajos, la liberación de GIP no resulta en un incremento de la secreción de insulina. Además de este efecto insulínico, el GIP tiene un papel importante en el metabolismo de los adipocitos, promoviendo la incorporación de ácidos grasos libres a TAGs y la síntesis de ácidos grasos. Finalmente, el GIP es degradado rápidamente por la dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) [15].

1.1.1.3.2 GLP-1.

La siguiente incretina descrita fue el GLP-1, en 1983. El GLP-1 se sintetiza a partir del péptido proglucagón. El proglucagón se expresa en diferentes tejidos, y es procesado proteolíticamente en diferentes hormonas de forma específica en cada tejido. En las células L del intestino (localizadas principalmente en el íleo y el colon), el proglucagón es procesado a

GLP-1, GLP-2, GRPP, glicentina y oxintomodulina por la convertasa PC1/3, y en las células α del páncreas, el proglucagón es procesado mayoritariamente a glucagón por la convertasa PC2, generando también GRPP, MPGF y IP-1 [16].

Mientras que el GIP es la hormona incretina más potente, el GLP-1 es liberado en concentraciones más altas, y es fisiológicamente más relevante en humanos [17]. Una vez secretado, el GLP-1 incrementa la síntesis y liberación de insulina cuando los niveles de glucosa plasmáticos son elevados, uniéndose directamente a su receptor (GLP1-R) en las células β del páncreas o a través del sistema nervioso central. Además de su efecto insulínico, el GLP-1 inhibe la secreción de glucagón y disminuye la tasa de vaciado gástrico [18], protege a las células β de la apoptosis, disminuye la ingesta e incrementa la termogénesis [15, 19]. Al igual que el GIP, el GLP-1 es también degradado rápidamente por la DPP4.

1.1.2 Hormonas hiperglucemiantes.

El estado postabsortivo comienza 4 – 6 horas después de la ingesta, cuando la absorción de nutrientes ya ha tenido lugar o está próxima a finalizar. En estas condiciones, los niveles de glucosa plasmáticos se mantienen dentro del rango fisiológico, y las tasas de producción y utilización de glucosa están equilibradas. Superado este periodo tras la ingesta, los bajos niveles de glucosa circulante favorecen la glucogenolisis y la gluconeogénesis en el hígado. Si el estado de ayuno continúa prologándose, la reserva de glucógeno se agota, y la gluconeogénesis constituye el principal mecanismo de obtención de glucosa. La primera respuesta a la disminución de los niveles de glucosa en sangre es la inhibición de la secreción de insulina, seguida de la secreción de glucagón, adrenalina, cortisol y la hormona de crecimiento. Estas son las principales hormonas hiperglucemiantes o contrarreguladoras, porque como su nombre indica, se oponen al efecto de la insulina [20].

1.1.2.1 Glucagón.

En la década de 1920, Kimball y Murlin informaron de la existencia de un factor presente en los islotes pancreáticos, distinto a la insulina, que tenía un papel importante en la homeostasis de la glucosa, ya que causaba hiperglicemia, y al que denominaron glucagón (*GLUCose-AGONist*)[21]. Pero fue en 1950 cuando, a partir de los trabajos de Unger y colaboradores, el glucagón fue caracterizado como la hormona opuesta a las acciones de la insulina [22], y la principal hormona hiperglucemiante.

El glucagón está compuesto por 29 aminoácidos y, como se explicó anteriormente, se sintetiza y procesa a partir del proglucagón en las células α del páncreas. Aunque la disminución en los niveles de glucosa circulante supone el principal estímulo para la secreción del glucagón, otras señales metabólicas influyen también en su liberación, como son los aminoácidos circulantes, los ácidos grasos libres y el estrés, a través de la activación del sistema nervioso simpático [23].

El glucagón es liberado al torrente sanguíneo de forma pulsátil, de modo que su efecto puede tener lugar en minutos, y después desaparecer de la circulación. Pequeñas dosis de glucagón son suficientes para producir incrementos significativos en los niveles de glucosa circulantes. Una vez secretado, el glucagón se une específicamente a su receptor, el receptor de glucagón (GCGR), que se ubica en diferentes tejidos, como el cerebro, adipocitos, páncreas y corazón, pero mayoritariamente en el hígado, y los riñones. Sus acciones tienen como resultado principal el incremento de la glucemia, actuando fundamentalmente en el hígado, donde promueve la glucogenolisis y la gluconeogénesis, constituyendo así el principal mecanismo de

contrarregulación de la insulina en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa *in vivo*. Otras funciones importantes del glucagón son la degradación de aminoácidos, la activación de la lipólisis, el control de la ingesta y peso corporal, el gasto energético y la termogénesis [23-25].

1.1.2.2 Adrenalina.

La adrenalina, también denominada “epinefrina” o “adrenina”, es una hormona y un neurotransmisor, con importantes acciones en el sistema cardiovascular y en la mediación de la conocida respuesta de “lucha o huida”. Químicamente es una catecolamina, y su nombre “adrenalina” deriva de las raíces latinas *ad-* y *renes*, que literalmente significa “junto al riñón”, en referencia a la ubicación anatómica de la glándula suprarrenal en el riñón, lugar donde se produce la síntesis y liberación de la adrenalina.

Junto con el glucagón, la adrenalina participa en la respuesta rápida a la hipoglucemia. Una vez liberada, la adrenalina promueve la glucogenólisis en el hígado y el músculo esquelético, la gluconeogénesis hepática, y suprime la captación de glucosa por el músculo, uniéndose a sus receptores α_1 - y β_2 -adrenérgicos [26]. Además, inhibe la secreción de insulina, y estimula la lipólisis del tejido adiposo, mediante la activación del receptor β_3 -adrenérgico, para proporcionar sustratos para la gluconeogénesis hepática [27, 28].

1.1.2.3 Glucocorticoides.

Los glucocorticoides son hormonas del estrés que juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en mamíferos, función de la que deriva su nombre de “glucocorticoides”, por su profundo efecto en los niveles plasmáticos de glucosa. Los glucocorticoides se producen en las glándulas adrenales, y su síntesis y liberación está estrictamente regulada por el eje hipotálamo-pituitaria-glándula adrenal (HPA) [29].

Los glucocorticoides producidos en mamíferos son el cortisol, la cortisona y la corticosterona, siendo el cortisol el principal glucocorticoide endógeno biológicamente activo en humanos, y la corticosterona en ratones y ratas. Junto con la hormona de crecimiento, participan en la respuesta lenta a la hipoglucemia, cuando el ayuno es persistente. Se ha caracterizado que los glucocorticoides pueden estimular la gluconeogénesis hepática directamente [29, 30], pero además favorecen la acción del glucagón al movilizar aminoácidos a partir de la degradación del músculo, y favorecen el depósito hepático de glucógeno [31]. En el músculo, los glucocorticoides inhiben la captación de glucosa inducida por la insulina, así como su utilización y la síntesis de glucógeno, además de ejercer un efecto permisivo sobre la glucogenólisis [32]. Juegan un papel fundamental en el efecto circadiano de la homeostasis de la glucosa [33], y estimulan también la lipólisis en el tejido adiposo, promoviendo la utilización de los ácidos grasos y la cetogénesis, mientras que disminuyen la utilización periférica de la glucosa. Los glucocorticoides poseen también un gran número de efectos biológicos en distintos tejidos [30].

Los glucocorticoides ejercen sus funciones uniéndose al receptor intracelular de glucocorticoides (GR, también denominado NR3C1a), que es un receptor nuclear. En ausencia de estímulo, el GR permanece en el citoplasma celular, en estado inactivo, unido a las chaperonas HSP 90 y 70 entre otras. En presencia de ligando, el GR se disocia de las chaperonas y forma un complejo con el ligando, que entra al núcleo celular, donde interactúa con otros factores de transcripción o se une a los elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) para activar la transcripción de genes específicos [30, 34].

1.1.2.4 Hormona del crecimiento.

La hormona del crecimiento (GH) es un péptido de 191 aminoácidos secretado por la glándula pituitaria de modo pulsátil, con un aumento importante durante el inicio del sueño, y con picos más tenues horas después de las comidas [35].

Se ha caracterizado que la GH tiene una función primordial en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa por el ritmo circadiano y en condiciones de ayuno prolongado, limitando la sensibilidad a insulina, reduciendo la utilización de glucosa por los tejidos periféricos, e induciendo la lipólisis en el tejido adiposo. Recientemente, se ha caracterizado además que la acción de la GH resulta imprescindible para el mantenimiento de los niveles de glucosa en condiciones de restricción calórica, actuando principalmente en el hígado, donde promueve la autofagia y la gluconeogénesis hepática a partir de los precursores lactato y alanina [36, 37].

Además del efecto ejercido por la GH, estudios recientes han puesto de manifiesto que algunos efectos de la GH pueden ser mimetizados por la ghrelina. La ghrelina es una hormona secretada por el estómago durante el ayuno, y estimula la secreción de GH por la pituitaria a través de un efecto directo a nivel hipofisiario, y otro más importante a nivel hipotalámico. Para ello, se une al receptor secretagogo de GH, también llamado receptor de ghrelina hipotálamo al receptor secretagogo de GH, también llamado receptor de ghrelina [38, 39]. En condiciones de restricción calórica crónica, la hipoglucemia puede ser revertida tanto por el tratamiento con GH exógena como con ghrelina [40, 41].

1.2 PAPEL DEL HÍGADO EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.

El hígado tiene un papel central en el metabolismo, como así lo evidencia su situación anatómica, al ser el receptor de todo el retorno venoso procedente del tracto gastrointestinal. En estado postprandial, el exceso de glucosa es almacenado en forma de glucógeno y/o es convertido a ácidos grasos o aminoácidos en el hígado. Estos ácidos grasos libres se esterifican con glicerol-3-fosfato para generar los triacilglicéridos (TAGs). Los TAGs se almacenan en forma de gotas lipídicas en el interior de los hepatocitos, o son secretados a la circulación en forma de partículas lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Los aminoácidos se metabolizan para obtener energía o son empleados para sintetizar proteínas, glucosa u otras moléculas. En estado de ayuno, los sustratos energéticos (como glucosa y TAGs) son secretados por el hígado al torrente sanguíneo y metabolizados por el músculo, el tejido adiposo, el cerebro y otros tejidos. El tejido adiposo produce y secreta ácidos grasos no esterificados (NEFAs) y glicerol a través de la lipólisis. El músculo degrada sus reservas de glucógeno y proteínas, y secreta lactato y alanina. De este modo, el glicerol, el lactato y la alanina producidos son transportados hasta el hígado, y utilizados como precursores para la síntesis de glucosa. Los NEFAs son oxidados en las mitocondrias hepáticas a través de la β -oxidación para generar cuerpos cetónicos (cetogénesis). La glucosa y los cuerpos cetónicos producidos por el hígado sirven como sustratos energéticos esenciales para el resto de tejidos durante el ayuno [42].

Como hemos visto, la capacidad única del hígado de almacenar y liberar glucosa le posiciona como un órgano fundamental en la regulación de la homeostasis de la glucosa, integrando las diferentes señales periféricas y actuando como un centro de coordinación de los diferentes tejidos (incluidos el cerebro, el músculo esquelético y el tejido adiposo), adaptando su metabolismo a las necesidades sistémicas.

1.2.1 Utilización y almacenamiento de la glucosa en el hígado.

En estado postprandial, el hígado contribuye activamente a la tolerancia a la glucosa, contribuyendo a reducir los niveles de glucosa en sangre al aumentar su captación y catabolismo [43]. La entrada de glucosa a los hepatocitos se realiza a través de los transportadores de glucosa (GLUTs). El transportador GLUT2 es el transportador de glucosa mayoritario en los hepatocitos, y opera de forma pasiva (no requiere energía para el transporte de glucosa) y bidireccional (sirve para importar y exportar la glucosa). En los hepatocitos, la captación o entrada de glucosa es independiente de la insulina, siendo la hiperglicemia (más que la hiperinsulinemia) el principal determinante para el transporte de glucosa al interior celular [44].

Una vez en el interior de los hepatocitos, la glucosa libre es fosforilada por la glucocinasa (GK; en el hígado se expresa la isoenzima GK-2 o hexocinasa IV hepática) generando glucosa-6-fosfato (G6P) (Imagen 1). Es importante señalar que, a diferencia de los otros isotipos de hexocinasas (hexocinasas I, II y III), la GK no se inhibe alostéricamente por su producto, la G6P, permitiendo así que el hígado pueda importar y utilizar la glucosa de forma continuada en condiciones de hiperglicemia [4]. La GK se regula mediante la interacción con la GKRP (proteína reguladora de la glucocinasa), de modo que, en condiciones de ayuno, cuando los niveles intracelulares de glucosa son bajos, la GKRP se une a la GK y la recluta en el núcleo. Pero cuando las concentraciones de glucosa son altas, la glucosa induce la disociación de este complejo, permitiendo que la GK se traslade al citoplasma y fosforee a la glucosa, dando como resultado un incremento de la producción de G6P [42]. La G6P puede tener, principalmente, dos destinos: ser

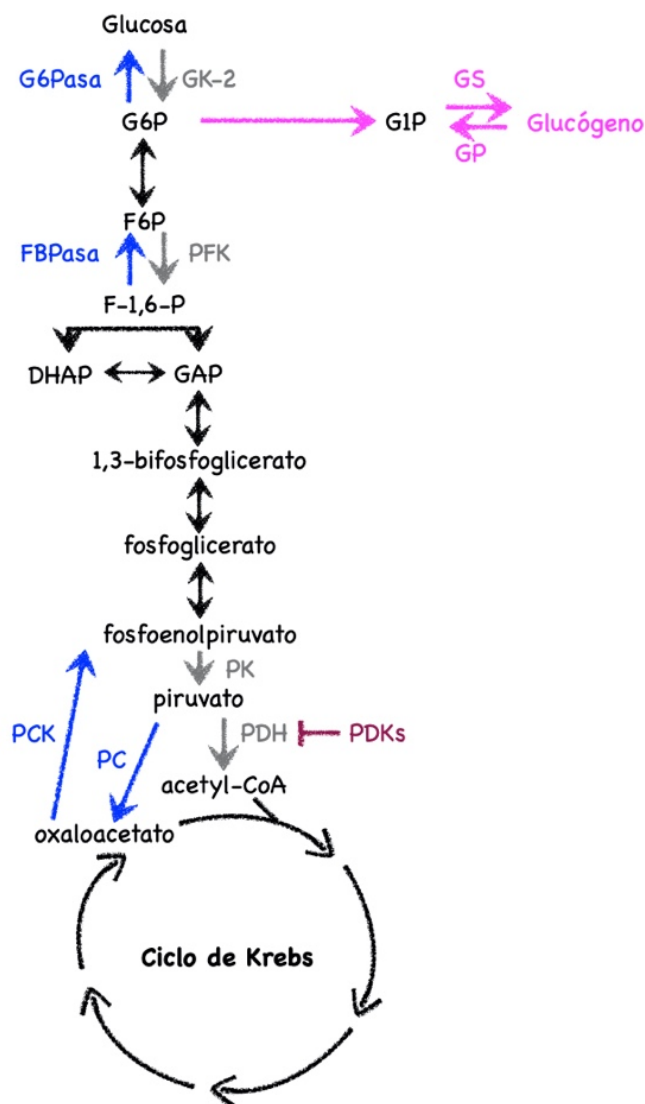


Imagen 1. Representación esquemática del metabolismo de la glucosa en el hígado. La ruta glucolítica está marcada en gris; la gluconeogénica en azul; y las vías relacionadas con la producción y degradación del glucógeno, en rosa. GK-2: glucocinasa-2; G6Pasa: glucosa-6-fosfatasa; G6P: glucosa-6-fosfato; G1P: glucosa-1-fosfato; GP: glucógeno fosforilasa; GS: glucógeno sintasa; F6P: fructosa-6-fosfato; F-1,6-P: fructosa-1,6-bisfosfato; FBPasa: fructosa 1,6 bisfosfatasa; PFK: fosfofructocinasa; PK: piruvato kinasa; PDH: complejo de la piruvato deshidrogenasa; PDKs: kinasas de la PDH; PC: piruvato carboxilasa; PCK: piruvato carboxilasa. Imagen de elaboración propia.

metabolizada para generar piruvato por la glucólisis, o servir como precursor para la síntesis de glucógeno (Imagen 1, procesos en color gris y rosa respectivamente). El hecho de que la GK sea la encima que actúa de nexo entre estos dos procesos, la posiciona como una diana directa del control de las hormonas glucorreguladoras, principalmente de la insulina y el glucagón, quienes la activan e inhiben respectivamente [45]. En estudios *in vitro*, en hepatocitos humanos obtenidos de biopsias de pacientes, se ha visto que la insulina incrementa tanto la expresión de la GK como su actividad, mientras que el glucagón ejerce el efecto opuesto [46]. Además, se ha visto que los pacientes que presentan mutaciones en el gen de la GK, almacenan mucho menos glucógeno que los sujetos control [47], y que los ratones transgénicos que expresan una copia extra del gen de la *Gk* muestran una deposición de glucógeno hepático tres veces superior que el de los ratones control [48].

Si la G6P es metabolizada por la glucólisis, acaba generando piruvato. En este proceso intervienen secuencialmente dos enzimas que, al igual que la GK, catalizan reacciones irreversibles y constituyen importantes puntos de regulación. Estas enzimas son la fosfofructokinasa (PFK) y la piruvato kinasa (PK) (Imagen 1), y se encuentran reguladas tanto por mediadores alostéricos como por modificaciones postraduccionales, promovidas tanto por la insulina como por el glucagón, que hacen que aumente o disminuya su actividad respectivamente [4, 49]. Posteriormente, el piruvato es degradado totalmente para obtener ATP a través del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. Pero la capacidad de oxidar los carbohidratos de la dieta es limitada, y cuando se excede, la glucosa adicional se emplea para sintetizar ácidos grasos mediante la lipogénesis, proceso promovido asimismo por la insulina, e inhibido por el glucagón [44].

Como se mencionó anteriormente, la G6P se emplea también para la síntesis de glucógeno (Imagen 1, donde se representa en color rosa), que proporciona un almacén de glucosa muy importante en estado de ayuno. Este proceso se denomina glucogenogénesis, y comienza con la isomerización de la G6P a glucosa-1-fosfato (G1P). La G1P se transforma a continuación en UDP-glucosa, que es el precursor del glucógeno. Para que la glucogenogénesis tenga lugar, es preciso activar a la enzima glucógeno sintasa (GS), e inactivar a la glucógeno fosforilasa (GP). La GS es la enzima que permite la elongación de las cadenas de glucógeno, catalizando la transferencia del residuo de glucosa de la UDP-glucosa al extremo no reductor de la cadena de glucógeno preexistente, mediante un enlace α 1-4 glucosídico. En estado postprandial, la insulina promueve la formación de glucógeno activando a la GS [4, 44, 50].

Finalmente, la G6P es también metabolizada por la vía de las pentosas fosfato, para generar NADPH, necesario para la síntesis de lípidos y de otras moléculas.

1.2.2 Producción hepática de glucosa.

Durante el estado de ayuno, la combinación de altos niveles de glucagón y bajos niveles de insulina incrementa la producción hepática de glucosa, para responder a las demandas energéticas de los tejidos periféricos. Inicialmente, el incremento de la producción hepática de glucosa proviene de la degradación del glucógeno, proceso denominado glucogenolisis. A medida que los niveles de glucógeno hepático se reducen, la disminución del flujo glucolítico y el incremento en la expresión y actividad de los genes y proteínas involucrados en la gluconeogénesis permiten la producción de glucosa *de novo*.

1.2.2.1 Glucogenolisis

La degradación de glucógeno en el citosol de los hepatocitos se lleva a cabo por la acción de dos enzimas: GP y la enzima desramificadora de glucógeno (AGL). La GP libera glucosa-1-fosfato de la cadena lineal de glucógeno, mientras que la AGL separa o desramifica las diferentes cadenas de glucógeno. La GP es activa cuando es fosforilada en el residuo de serina 14. El glucagón y la adrenalina, que incrementan los niveles intracelulares de AMPc, promueven la activación de la PKA, que fosforila y activa a GP, desencadenando de este modo la glucogenólisis [4]. La deficiencia congénita de la GP causa la enfermedad de Hers, que se caracteriza por la incapacidad de movilizar glucosa a partir del glucógeno en respuesta a ayuno o a glucagón, mientras que la deficiencia de la AGL provoca la enfermedad de Cori-Forbes, que se caracteriza por la acumulación excesiva de glucógeno en los tejidos afectados, entre ellos el hígado [51, 52].

1.2.2.2 Gluconeogénesis.

La gluconeogénesis es el mecanismo más importante de producción hepática de glucosa, ya que permite el aporte continuado de glucosa a los tejidos periféricos cuando las reservas de glucógeno se han agotado y continúa el estado de ayuno o de alta demanda energética. En este proceso, se obtiene glucosa *de novo* a partir de precursores no glucídicos, como son los aminoácidos, el lactato y el glicerol. Para incorporarse a la gluconeogénesis, los aminoácidos pueden ser convertidos directamente a piruvato o a intermediarios del ciclo de Krebs; el lactato puede ser convertido directamente a piruvato por la lacto deshidrogenasa (LDH) y el glicerol es convertido a dihidroxiacetona fosfato, que es un intermediario gluconeogénico [4] (Imagen 2).

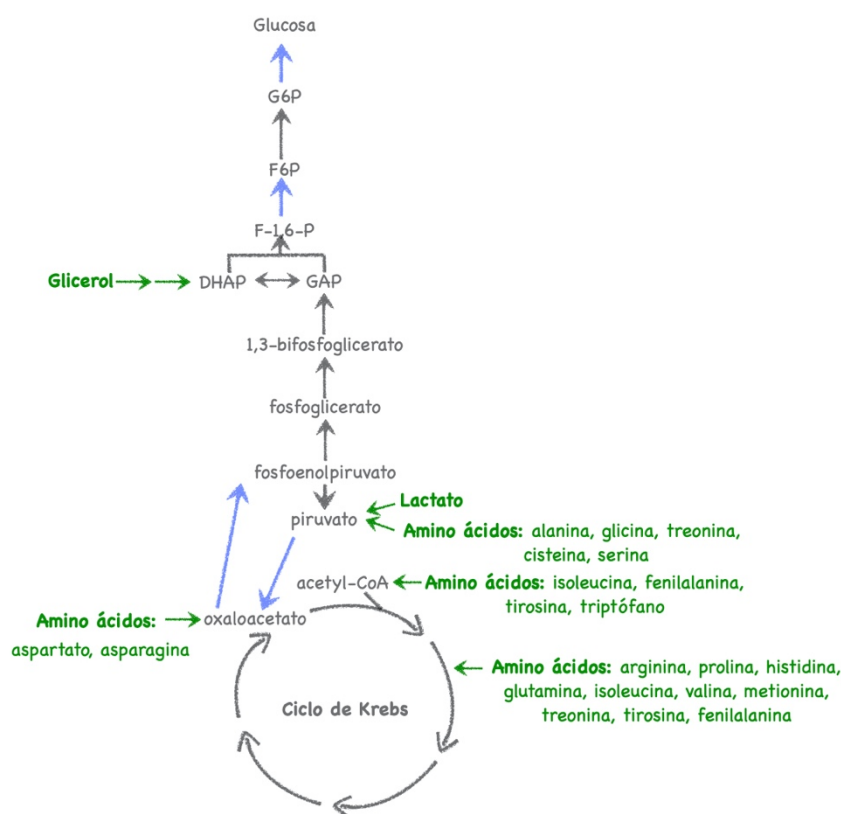


Imagen 2. Representación esquemática de la integración de los diferentes sustratos gluconeogénicos a la ruta molecular de la gluconeogénesis en el hígado. Imagen de elaboración propia.

El glicerol es convertido a dihidroxiacetona fosfato, que es un intermediario gluconeogénico [4] (Imagen 2).

La gluconeogénesis constituye la ruta opuesta a la glucólisis, compartiendo ambas 7 reacciones comunes, puesto que son reversibles. Difieren en los puntos de control, que en la gluconeogénesis los constituyen las enzimas PDH, piruvato carboxilasa (PC),

fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), que catalizan reacciones irreversibles, siendo determinantes para la regulación del proceso gluconeogénico:

PDH: la piruvato deshidrogenasa es un complejo multi-enzimático que participa tanto en la glucólisis como en la gluconeogénesis. En estado postprandial, la PDH cataliza la conversión del piruvato, coenzima A y NAD^+ a acetil-CoA, NADH y CO_2 . Sin embargo, en condiciones de ayuno, el piruvato debe ser preservado para la síntesis de glucosa, por lo que la PDH es fosforilada por las kinasas de la piruvato deshidrogenasa (PDKs) e inactivada, permitiendo que el piruvato ingrese en el ciclo de Krebs [53] (Imagen 1). Existen 4 isoenzimas que fosforilan a la PDH, y son la PDK1, PDK2, PDK3 y PDK4. Las isoenzimas PDK2 y PDK4 son las más abundantes, expresándose en una gran variedad de tejidos, aunque mayoritariamente en el corazón, los riñones y el hígado; mientras que la PDK3 y la PDK1 tienen un patrón de expresión más reducido, limitándose al cerebro y al hígado [54, 55]. Se ha caracterizado que los ratones *knock out* para PDK4 tienen bajos niveles de glucosa en sangre cuando se someten a ayuno [56, 57] y que la actividad de PDK4 es necesaria para el efecto gluconeogénico del glucagón [58, 59].

PC: la piruvato carboxilasa es la enzima que cataliza la carboxilación del piruvato para formar oxaloacetato, que ingresa en el Ciclo de Krebs (Imagen 1). Esta reacción, además de ser necesaria para la síntesis *de novo* de la glucosa, es un proceso anaplerótico muy importante, que permite reponer los niveles de oxaloacetato en el Ciclo de Krebs [60]. Dado que el ciclo de Krebs es una ruta metabólica implicada en numerosos procesos biológicos, cuando sus intermediarios se reclutan para su uso en vías sintéticas, deben reabastecerse de nuevo para que el ciclo pueda seguir funcionando. Se denominan reacciones anapleróticas a las que nutren al ciclo de Krebs, y catapleróticas a las que eliminan el exceso de intermediarios para evitar su acumulación en la matriz mitocondrial, y están vinculadas a procesos biosintéticos (Imagen 3). Por lo tanto, la PC se considera una enzima crucial no solo en la gluconeogénesis, sino en el metabolismo intermediario y la homeostasis del ciclo de Krebs [61]. Los niveles de PC están débilmente regulados por su activación transcripcional, aunque sí se ha descrito que en estado de ayuno se incrementa su expresión y sus niveles de proteína [62]. Destaca el incremento de la actividad de la PC en estado de ayuno, que se regula alostéricamente por los niveles de acetil-CoA, siendo determinante para el flujo gluconeogénico [63]. Se ha caracterizado que los ratones *knock out* para PC específicamente en el hígado presentan alteraciones en la anaplerosis hepática, disminución de los niveles de intermediarios del ciclo de Krebs y menor capacidad gluconeogénica, aunque mantienen la euglicemia en estado de ayuno, con un incremento compensatorio de la cetogénesis y la gluconeogénesis renal [64].

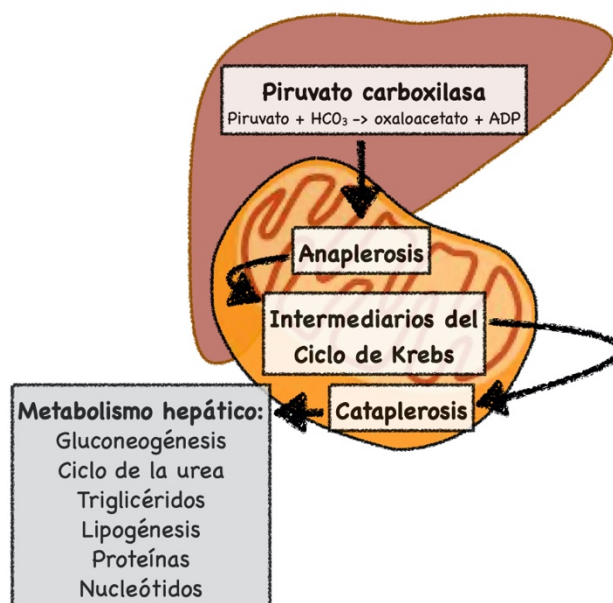


Imagen 3. Representación esquemática del papel de la PC en el flujo anaplerótico, y su conexión con el Ciclo de Krebs y los procesos biosintéticos acoplados a la cataplerosis. Imagen de elaboración propia.

PCK: la fosfoenolpiruvato carboxikinasa es la principal enzima limitante de la gluconeogénesis, por lo que constituye el punto de control más importante del proceso de síntesis *de novo* de la glucosa [65, 66]. La PCK vincula el ciclo de Krebs con la gluconeogénesis, ya que tiene un efecto cataplerótico, al catalizar la formación de fosfoenolpiruvato a partir del oxaloacetato. De este modo, posibilita que el incremento de los niveles de oxaloacetato que se da durante la estimulación de la gluconeogénesis, se transforme en fosfoenolpiruvato. Existen dos isoformas de PCK, la citosólica (PCK1) y la mitocondrial (PCK2) [67]. Las isoenzimas PCK1 y PCK2 están codificadas por diferentes genes (*PCK1* y *PCK2* respectivamente) y, aunque comparten un 68% de identidad y un 82% de similitud, PCK1 se ha erigido como la enzima fundamental para la gluconeogénesis, ya que sus niveles de expresión están fuertemente regulados por el estado nutricional y por las hormonas glucoconreguladoras [68-71], y su sobre expresión se correlaciona con una producción incrementada de glucosa [72]. Se ha caracterizado que los ratones *knock out* globales para PCK1 mueren a los pocos días de nacer, ya que son hipoglucémicos y el ciclo de Krebs deja de funcionar correctamente por la ausencia de cataplerosis [73, 74]. Sin embargo, los ratones *knock out* para PCK1 específicamente en el hígado son viables, y aunque muestran un deterioro casi absoluto de la gluconeogénesis hepática a partir de la cataplerosis del Ciclo de Krebs [75], mantienen la euglicemia tras 24 horas de ayuno, aumentando la gluconeogénesis extrahepática y disminuyendo la utilización de la glucosa del resto de tejidos [74, 76]. Además, estos ratones no son capaces de eliminar el exceso de oxaloacetato que se genera durante el ayuno, desarrollando hígado graso [76-79]. Esta dicotomía entre el modelo *knock out* global y el específico de hígado, puso de manifiesto que PCK1 no solo es imprescindible para la gluconeogénesis hepática, sino para el correcto funcionamiento del ciclo de Krebs, con su función cataplerótica, en el conjunto de los diferentes tipos celulares de los tejidos y órganos

A diferencia de las otras enzimas gluconeogénicas, en el hígado la actividad de PCK1 no está condicionada por modificaciones postraduccionales o por regulación alostérica, sino por sus niveles de proteína, que dependen de la actividad transcripcional del gen. Se ha descrito que la regulación de la transcripción de *PCK1* tiene lugar entre -1500 pb y +1 pb del promotor, y que este contiene dominios de unión para el receptor de glucocorticoides (entre -450 pb y -400 pb), para la señalización de la insulina (entre -416 pb y -407 pb) y para los elementos de respuesta a niveles de cAMP (controlados por el glucagón y la adrenalina), situados en diferentes puntos a lo largo de la secuencia del promotor. En el promotor de *PCK1* se localizan además secuencias para otros motivos de unión cuya implicación biológica y fisiológica no se han estudiado hasta la fecha [65, 80]. Por su parte, *PCK2* no se regula a nivel transcripcional, mostrando una expresión constitutiva en humanos, roedores y aves [81].

G6Pasa: la glucosa-6-fosfatasa cataliza la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato a glucosa y fosfato inorgánico, pudiendo así la glucosa abandonar el interior celular y salir al torrente sanguíneo. La glucosa-6-fosfato se obtiene tanto de la gluconeogénesis como de la glucogenolisis, por lo que la reacción catalizada por la G6Pasa representa la etapa final del proceso de producción hepática de glucosa [82]. La G6Pasa es un complejo enzimático compuesto por la subunidad catalítica (G6PC) y la subunidad translocasa (G6PT), que se acoplan funcionalmente. Se localiza en el retículo endoplasmático, y la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato tiene lugar en el lumen del retículo, y requiere de transportadores que importen la glucosa-6-fosfato desde el citoplasma al interior del retículo, y que exporten la glucosa y el fosfato inorgánico resultantes de la hidrólisis de vuelta al citoplasma [83]. La actividad de la G6Pasa se regula a nivel transcripcional y por concentración de sustrato. Se ha caracterizado que en el promotor de *G6PC* hay elementos de respuesta a glucocorticoides y sus factores asociados [84], y a factores de transcripción y coactivadores implicados en la señalización del glucagón [85, 86], insulina [87, 88] y la glucosa [89].

1.2.2.3 Regulación de la producción hepática de glucosa.

La regulación de la producción hepática de glucosa es un proceso complejo, dado que se realiza a nivel de sustrato, a nivel alostérico y a nivel transcripcional, donde confluyen factores de transcripción (como FOXO1, CREB, Nur77, HNF4a, C/EBP α y PPAR γ) y coactivadores (como PGC-1 α , CBP y CRTC2) que integran y median las diferentes respuestas desencadenadas por el estado nutricional y las hormonas glucoconductoras, dando lugar a la activación o a la represión de la expresión de los diferentes genes implicados en la producción de glucosa (Imagen 4). El uso de métodos que combinan trazadores y técnicas de espectroscopía, de fenotipado metabólico y de modelos *knock out* condicional en ratón; así como el empleo de técnicas basadas en el uso de resonancia magnética nuclear para estudiar los flujos de los diferentes sustratos, han permitido grandes avances a la hora de integrar y entender los diferentes mecanismos que controlan la producción hepática de glucosa [90]. Como se ha explicado en los apartados anteriores, y como desglosaremos a continuación, el glucagón, la adrenalina, el cortisol y la insulina son los principales reguladores de la producción hepática de glucosa. Pero también otros factores como los ácidos biliares, las citocinas o el ritmo circadiano tienen un impacto notable en la producción de glucosa en el hígado.

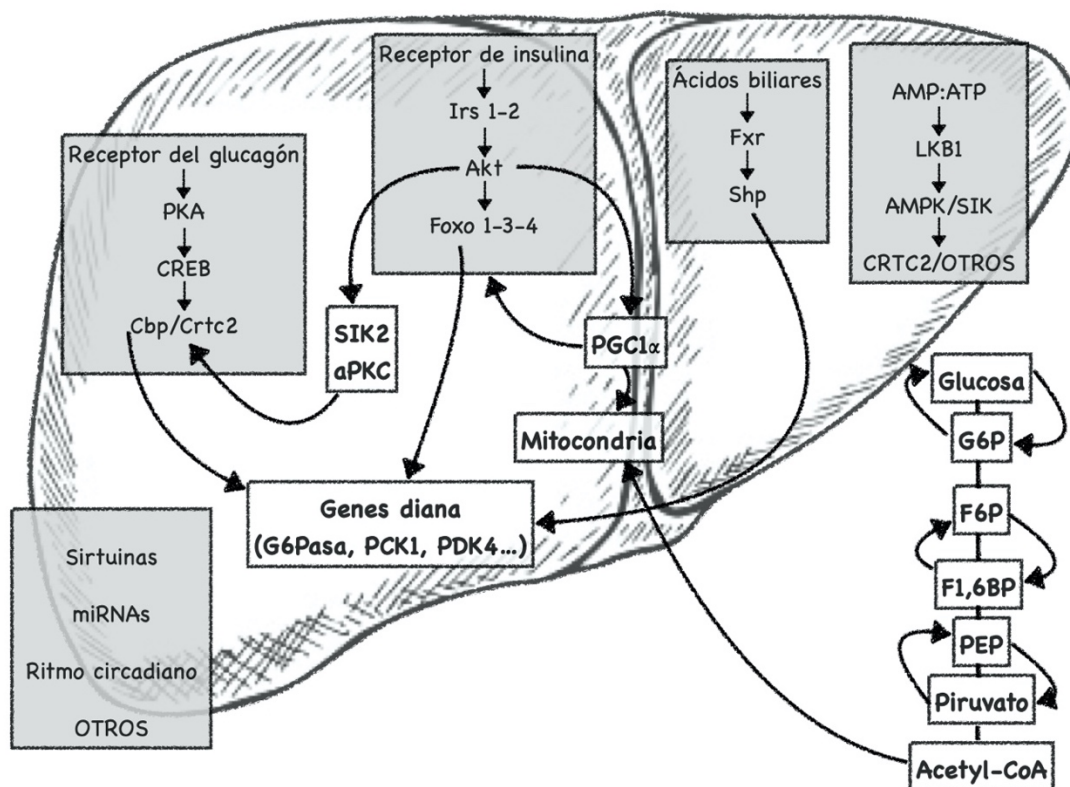


Imagen 4. Representación esquemática de algunas de las rutas más importantes de la regulación de la gluconeogénesis hepática. La insulina, el glucagón, la adrenalina y los glucocorticoides son los reguladores centrales de la producción hepática de glucosa. Sus efectos transcripcionales son mediados por Akt/Foxo y Creb. AMPK, por su capacidad de responder al estado energético de las células, tiene también un papel relevante; al igual que los miRNAs, el ritmo circadiano y los ácidos biliares, a través de mecanismos redundantes. Un segundo nivel de regulación viene representado por los cofactores, como Crtc2 y las sirtuinas. La regulación alostérica, y la ejercida por a nivel de sustrato, representada en el margen derecho, juega un papel importante en la regulación rápida del proceso gluconeogénico. Imagen de elaboración propia.

Regulación por el glucagón y la adrenalina.

El empleo de modelos animales con alteraciones en la ruta de señalización del glucagón, permitieron entender y conocer en profundidad las acciones fundamentales de esta hormona en la homeostasis de la glucosa. Los ratones que no expresan genéticamente el receptor de glucagón (*Gcgr*^{-/-}) muestran niveles de glucosa circulante más bajos que los controles *wild-type* (WT), así como una mejor tolerancia a la glucosa [91, 92]. Esta mejora en la tolerancia a la glucosa no es debida a un incremento de la secreción pancreática de insulina, sino a una mayor sensibilidad a la insulina, como demostraron los ensayos de clamps hiperinsulinémicos euglicémicos [93, 94]. Cuando se alimentan con dieta alta en grasa, los ratones *Gcgr*^{-/-} no desarrollan la característica resistencia a insulina inducida por la dieta, lo que se debe a un incremento de la sensibilidad a insulina y a la disminución de la producción hepática de glucosa. Además, los ratones *db/db* que carecen del receptor de glucagón no desarrollan hiperinsulinemia ni hiperglicemia [95]. Sin embargo, cuando se somete a los ratones *Gcgr*^{-/-} a un ayuno prolongado, estos desarrollan una severa hipoglucemia [92], lo que demuestra la importancia del glucagón en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa.

El glucagón se une en el hígado al receptor de glucagón, que es un receptor de 7 dominios transmembrana acoplado a proteínas G (Imagen 5). La unión del glucagón a su receptor induce un cambio conformacional en este último, que da lugar a la activación de las dos clases de proteínas G que están acopladas a la ruta de transducción de señales de esta hormona: $G_{s\alpha}$ y G_q . La activación de $G_{s\alpha}$ conduce a la activación de la adenilil ciclasa (AC), que produce un incremento de los niveles intracelulares de AMPc, y a la subsiguiente activación y de la proteína quinasa A (PKA). La adrenalina, uniéndose a su receptor beta adrenérgico, también desencadena el incremento intracelular de AMPc, compartiendo la misma ruta de señalización celular que el glucagón [96]. La activación de PKA resulta en la fosforilación y localización nuclear de CREB [97]. Una vez fosforilado, CREB se une a los elementos de respuesta a AMPc de los genes diana, reclutando a coactivadores, como CRTC2 [69, 98], HNF-4 α y PGC-1 α [68, 99], y a otros factores de transcripción, como Fox01 [100-102], todos ellos necesarios para la activación completa de la transducción génica inducida por el glucagón y la adrenalina [103], que tienen, como principales dianas, la expresión de la *G6Pasa* y de *PCK1*. Además de fosforilar a CREB, PKA activa otras vías que llevan a la inhibición de la glucólisis y a la activación de la glucogenólisis, potenciando así la producción hepática de glucosa.

La adrenalina promueve la producción de glucosa en el hígado no solo de forma directa, regulando la transcripción de las enzimas más importantes, sino de forma indirecta, promoviendo la lipólisis en el tejido adiposo, y aumentando la disponibilidad de sustratos, favoreciendo así el flujo gluconeogénico. De este modo, la adrenalina potencia el efecto gluconeogénico del glucagón y permite que la gluconeogénesis siga ocurriendo de forma prolongada. Se ha descrito que para que el efecto de la adrenalina tenga lugar, es preciso que tanto los niveles de insulina como de leptina circulantes sean bajos [104].

Regulación por los glucocorticoides.

Los glucocorticoides tienen un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis energética de los mamíferos. La extirpación de las glándulas adrenales compromete severamente la capacidad de los animales para resistir el ayuno [105], y disminuye en gran medida los síntomas característicos de la diabetes, como la concentración elevada de glucosa en sangre [106-108]. Por el contrario, elevadas dosis de glucocorticoides generan hiperglucemia y complicaciones diabéticas, tanto en humanos como en modelos animales [109-112], como se ejemplifica en la enfermedad o síndrome de Cushing, causado por elevados niveles de glucocorticoides circulantes, y que se caracteriza por manifestar hiperglucemia, resistencia a insulina, hígado graso e hipertensión [113].

Los glucocorticoides regulan la gluconeogénesis hepática directamente, promoviendo principalmente la expresión de *PCK1*; e indirectamente, afectando a la captación de glucosa

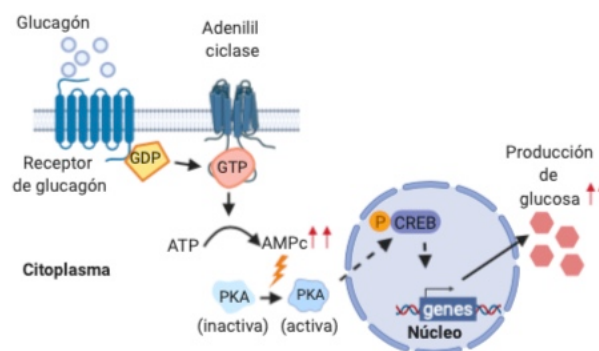


Imagen 5. Representación esquemática de la ruta molecular del glucagón en la activación de la gluconeogénesis hepática. GDP: guanósín difosfato; GTP: guanósín trifosfato; ATP: adenosín trifosfato; AMPc: AMP cíclico; PKA: proteína quinasa A; CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc. Imagen de elaboración propia.

por otros tejidos, modulando la secreción de insulina y glucagón, y promoviendo el catabolismo del músculo y el tejido adiposo, para proporcionar al hígado sustratos gluconeogénicos, como son los aminoácidos y los lípidos respectivamente [32, 90]. Los glucocorticoides se unen a su receptor intracelular, el receptor de glucocorticoides (GR), que se localiza en el citoplasma celular asociado a chaperonas. La unión de los glucocorticoides con el GR promueve su disociación de las chaperonas, y su translocación al núcleo, donde se une a secuencias genómicas específicas, denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs). Una vez unido a los GREs, el GR recluta y se une a otros coactivadores y factores de transcripción. De hecho, muchos de los GREs genómicos son en realidad GREs compuestos (llamados unidades de respuesta a glucocorticoides, GRUs), que incluyen elementos de unión para el GR y otros factores de transcripción, imprescindibles para que la respuesta transcripcional sea completa y específica a nivel de tejido, permitiendo que además pueda ser modulada por el estado metabólico [29, 114]. Hasta la actualidad se ha descrito que el GR interacciona con los elementos de respuesta a AMPc [115], y con los factores de transcripción PPAR α [116], HNF3 α , HNF3 β [117], Fox01 [118] y Fox03A [119].

Regulación por la insulina.

La insulina puede inhibir la producción hepática de glucosa de forma directa, actuando en el hígado a través de su receptor ubicado en la membrana celular, o de forma indirecta, actuando en el páncreas, el cerebro y el tejido adiposo [120].

Los mecanismos indirectos de la insulina incluyen, en primer lugar, la inhibición de la secreción de glucagón por las células α del páncreas. En este sentido, se ha demostrado que los niveles circulantes de glucagón disminuyen notablemente durante la infusión sistémica de insulina [121], y que el mantenimiento de los niveles circulantes de glucagón constantes durante la infusión sistémica de insulina, disminuyen la capacidad de esta para suprimir la producción hepática de glucosa [122]. En segundo lugar, recientemente se ha demostrado que la insulina puede también inhibir la producción de glucosa en el hígado a través de su actuación en el hipotálamo. Se ha visto que la administración de insulina en el tercer ventrículo reduce la producción hepática de glucosa de forma independiente a los niveles circulantes de insulina o de otras hormonas contrarreguladoras, incluido el glucagón [123]. Del mismo modo, se ha visto que la inhibición del receptor de insulina en los astrocitos y las neuronas provoca una producción hepática de glucosa descontrolada [124]. Se ha sugerido que, para inhibir de este modo la producción hepática de glucosa, la insulina actuaría vía neuronal a través de los canales KATP, PI3K y el nervio vago [125-128]. El último mecanismo indirecto por el cual la insulina reduce la gluconeogénesis hepática lo realizara a través de la supresión de la lipólisis en el tejido adiposo (Imagen 6). La oxidación de ácidos grasos en el hígado proporciona ATP, NADH y acetil-CoA (que activa alostéricamente a la PC), necesarios para la gluconeogénesis. De este modo, la supresión del flujo de ácidos grasos libres al hígado constituye el mecanismo indirecto principal de la insulina [129-131]. Sin embargo, el hallazgo reciente que muestra que en los ratones que no expresan el receptor de insulina en el hígado, la insulina sigue siendo capaz de inhibir la lipólisis del tejido adiposo, pero no la supresión de la producción hepática de glucosa [132] demuestran que la señalización de la insulina en el hígado es necesaria para la supresión efectiva de la gluconeogénesis. Complementariamente, se ha demostrado que la insulina es capaz de suprimir la producción hepática de glucosa si se mantienen o no sus efectos indirectos, lo que señala la gran relevancia de su acción directa en el hígado para regular la gluconeogénesis [120].

El mecanismo directo de regulación de la producción de glucosa en el hígado se inicia con la unión de la insulina al receptor de insulina, IR, que es un receptor transmembrana con actividad tirosin-kinasa (Imagen 6). Una vez activado, el IR fosforila al sustrato del receptor de insulina (IRS), que inicia una cascada de señalización molecular que implica la actividad de la PI3K y la PDK, y que culmina con la fosforilación y activación de la kinasa AKT [133, 134]. Los factores de transcripción Fox0, particularmente Fox01, son las dianas principales descritas de AKT [135, 136]. Fox01, que en asociación con con el coactivador PGC1 α , promueve la transcripción de *PCK1* y *G6Pasa*, cuando es fosforilado por AKT se trasloca del núcleo al citoplasma, inactivándose [137, 138]. AKT además inhibe la glucogenolisis y promueve la glucogenogénesis, activando a la GK y fosforilando e inactivando a la GSK3 (que inhibe a la GS) [139] (Imagen 6).

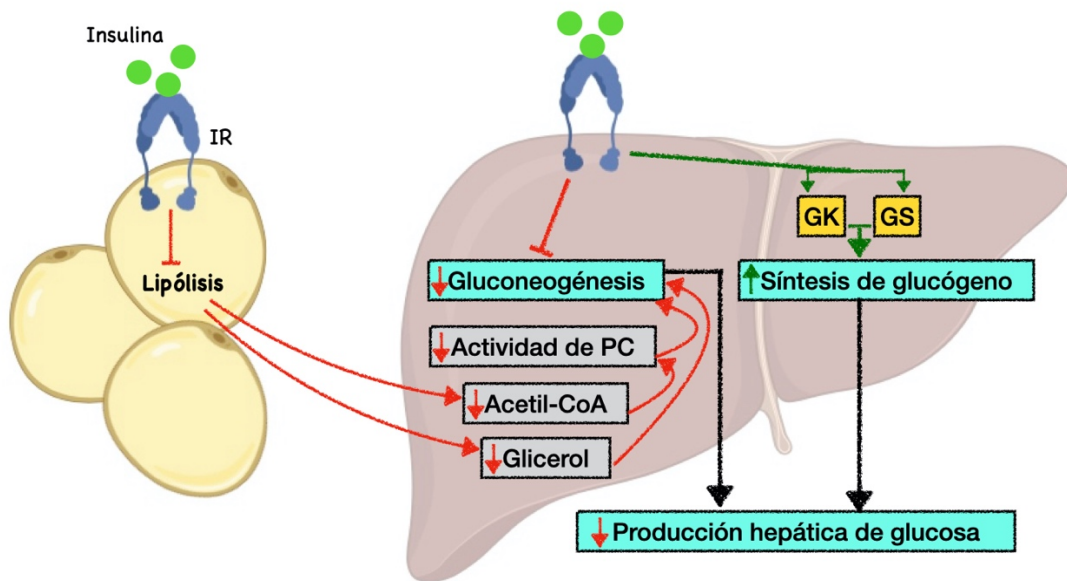


Imagen 6. Principales acciones indirectas y directas de la insulina en el control de la producción hepática de glucosa. IR: receptor de insulina; PC: piruvato carboxilasa; GK: glucocinasa; GS: glucógeno sintasa. Imagen de elaboración propia.

Regulación por el ritmo circadiano.

El reloj circadiano de los mamíferos permite la coordinación temporal de la homeostasis celular, así como la fluctuación de las funciones fisiológicas que se da entre el día y la noche, la secreción hormonal y la temperatura corporal. El sistema del reloj circadiano en los mamíferos se clasifica jerárquicamente en dos clases, que son el reloj central, ubicado en el núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo, y los relojes periféricos, ubicados en diferentes tejidos entre los que se incluyen el hígado, los riñones, el músculo, el tejido adiposo, y otras áreas del cerebro fuera del SCN [140]. A diferencia del reloj del SCN, que es activado por la luz y dirige los ritmos circadianos del comportamiento, controlando los ciclos de actividad/descanso y alimentación/ayuno, se ha demostrado que los relojes periféricos se establecen por la alimentación diaria [141, 142]. De este modo, en condiciones de alimentación *ad libitum*, el reloj del SCN se superpone, y configura los ritmos de los relojes periféricos. Sin embargo, cuando el alimento solo es accesible en diferentes momentos del día, distintos a los del ciclo diario de alimentación espontánea, son los relojes periféricos, y no el del SCN, los que

configuran los ritmos [143]. En el hígado, el reloj interno es esencial, ya que sincroniza los ritmos diurnos con la gluconeogénesis y la exportación de glucosa con los periodos habituales de ayuno [141, 144]. Se ha visto que algunos genes implicados en el metabolismo de la glucosa están sujetos a la regulación por el ritmo circadiano [145], y que los ratones con los relojes circadianos alterados exhiben la mayoría de alteraciones presentes en pacientes con diabetes tipo 2, tales como la resistencia a insulina, incremento de adiposidad, cambios en la masa de células β del páncreas, y alteraciones en la respuesta a hipoglucemia [146]. Se ha descrito además que el reloj circadiano modula la actividad de CREB y GR y, por tanto, la función del glucagón y los glucocorticoides [147, 148], así como la sensibilidad a insulina y la supresión de la producción hepática de glucosa, ya que se ha demostrado que los componentes del reloj circadiano intervienen en la degradación de FoxO1 [149].

Regulación por el sistema nervioso central.

Diferentes poblaciones neuronales ubicadas en áreas córtico-límbicas, en el tronco encefálico y en el hipotálamo, así como poblaciones no neuronales, que comprenden a los tanocitos y a los astrocitos, detectan continuamente los niveles circulantes de glucosa [150]. El hipotálamo coordina la información procedente de estas diferentes rutas de señalización, y se comunica con los tejidos periféricos para coordinar la respuesta sistémica a los niveles de glucosa circulantes. Como se explicó anteriormente, la insulina puede inhibir la producción hepática de glucosa a través de sus efectos centrales. Pero, además, el hipotálamo también está involucrado en la estimulación de la gluconeogénesis en el hígado. En este sentido se ha descrito que el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMN) regula la producción hepática de glucosa, incrementando la actividad de PCK1 y suprimiendo la actividad de la PK [151], así como la utilización de glucosa por los tejidos periféricos, a través del sistema nervioso simpático [152]. En el VMN, las neuronas SF1 son especialmente abundantes, y desarrollan una función muy importante en la respuesta contrarreguladora a la hipoglucemia, promoviendo la secreción de glucagón y glucocorticoides, e inhibiendo la liberación de insulina [153]. Concretamente, se ha visto que en esta población neuronal la actividad de la subunidad AMPK α 1 es fundamental para estos efectos, ya que su inhibición disminuye la glucemia en ratones alimentados con HFD, tanto en ayuno como en acceso *ad libitum* a la dieta. Estos ratones tienen además una mejor tolerancia a la glucosa, efecto que no se explica por una mayor sensibilidad a la insulina, sino por una respuesta contrarreguladora alterada, mostrando bajos niveles en plasma de glucagón, cortisol y adrenalina durante el ayuno, así como una disminución de la expresión hepática de las principales enzimas gluconeogénicas [154].

Regulación por los ácidos biliares.

Los ácidos biliares (BAs) son metabolitos que derivan del catabolismo del colesterol en los hepatocitos, y facilitan la absorción intestinal y el transporte, emulsión y captación de los lípidos de la dieta. Recientemente, los BAs se han reconocido como potentes moléculas de señalización implicadas en el múltiples respuestas fisiológicas, como la producción hepática de glucosa [155]. Concretamente, el interés en el papel de los BAs en el metabolismo de la glucosa vino desencadenado por el hecho de que en los pacientes diabéticos tratados con “secuestradores” de BAs (moléculas que se unen a los BAs impidiendo su reabsorción intestinal) para el tratamiento de sus dislipidemias, mejoraban su control glucémico mucho más que aquellos pacientes tratados con otros hipolipemiantes [156]. Una de las características especiales de los BAs es que pueden actuar a través de múltiples y distintos mecanismos. El receptor FXR fue el

primero en atribuirse a la señalización de los BAs, y se encuentra ampliamente expresado en el hígado. Se ha visto que la activación del FXR por los BAs induce la actividad del represor SHP, que inhibe la expresión de *Pck1* y de *G6Pasa* [157]. Los ratones *knock out* para SHP muestran una ligera hiperglicemia en estado basal y en ayuno, y en ellos los BAs son incapaces de inhibir la expresión de *Pck1* y de *G6Pasa* [157]. Por el contrario, la sobre expresión de SHP en el hígado reduce la expresión de *Pck1* y de *G6Pas*, mejorando la glicemia en ratones diabéticos [158].

Los BAs a través de la activación de su receptor FXR también activan la expresión del péptido FGF15/19 (FGF15 en ratones y FGF19 en humanos) principalmente en el intestino delgado. Los niveles de FGF15/19 se incrementan tras la ingesta, y son importantes para mantener la euglicemia, ya que se ha descrito que reducen la gluconeogénesis hepática [159]. A nivel molecular, FGF15/19 induce la desfosforilación de CREB y, en consecuencia, reprime la expresión de las enzimas glucogénicas [160]. Además, FGF15/19 puede activar, al igual que la insulina, la ruta de AKT, e inhibir la expresión de *Pck1* por la vía canónica de Fox01 [161]. FGF15/19 también puede actuar a nivel central para inhibir la gluconeogénesis, reprimiendo el eje hipotálamo-pituitaria-glándula adrenal para disminuir así la secreción de glucocorticoides, y la consiguiente lipólisis [162].

Regulación por FGF21.

Al igual que FGF15/19, FGF21 pertenece a la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), y desarrolla un papel muy importante en el balance energético [163]. FGF21 se sintetiza principalmente en el hígado, y PPAR α [164], SIRT1 y CREBH inducen e incrementan sus niveles de expresión durante el ayuno [165]. FGF21 promueve entonces la gluconeogénesis hepática, incrementando los niveles de PGC1 α . Se ha demostrado además que el FGF21 circulante puede atravesar la barrera hematoencefálica, activando el eje hipotálamo-pituitaria-glándula adrenal, reforzando así la activación de la producción de glucosa en el hígado [166].

Regulación por AMPK.

La kinasa AMPK es un complejo heterotrimérico que se activa con el incremento de la ratio AMP/ATP, por lo que actúa como un importante sensor de la energía celular. AMPK genera ATP al aumentar la oxidación de ácidos grasos, e inhibe la lipogénesis y la gluconeogénesis cuando los niveles de ATP son bajos [167]. Se ha descrito que el glucagón puede activar a AMPK, sin embargo, este efecto no ocurre en los ratones knockout para PCK1 en el hígado, lo que sugiere que los efectos del glucagón sobre AMPK están mediados por el agotamiento intracelular de los niveles de ATP a través de la gluconeogénesis [168]. El *knock out* global de AMPK α 2, la subunidad catalítica predominante en el hígado, no presenta la producción hepática de glucosa afectada, mientras que el *knock out* específico en el hígado muestra un incremento de los niveles de glucosa basales, causados por una mayor producción hepática de glucosa respecto a los ratones control [169] sin que se vea afectado el flujo gluconeogénico a partir del ciclo de Krebs [170]. Por último, cabe mencionar que la acción de AMPK en el hipotálamo tiene una gran influencia en la homeostasis de la glucosa y la gluconeogénesis hepática, habida cuenta de su papel integrador en el mecanismo de acción de distintas señales neurohormonales, incluyendo algunas tan importantes como el glucagón y el GLP-1.

Regulación por miRNA.

Los miRNAs son pequeños fragmentos de RNA no codificante, compuestos de unos 20 a 30 nucleótidos de longitud. Regulan la expresión de diferentes genes, hibridando con sus secuencias complementarias en los correspondientes mRNAs. La complementación entre los miRNAs y los mRNAs puede ser completa o parcial. Esta laxitud permite que un miRNA se pueda unir a múltiples mRNAs diferentes, siempre que compartan al menos una complementación parcial [171]. La hibridación de los miRNAs con sus mRNAs diana conduce a la degradación total del mRNA, si la complementación es perfecta; o a la inhibición parcial de la síntesis de la proteína, si la complementación es parcial. Se ha descrito que varios miRNAs desarrollan un papel muy importante en el control de la producción hepática de glucosa. El miR-23a fue el primer miRNA descrito en el control de la gluconeogénesis, e inhibe la producción de glucosa uniéndose y degradando los mRNAs de la *G6Pasa* y *PGC1 α* [172]. Desde entonces se han descrito múltiples miRNAs con funciones semejantes. Así, se ha descrito que, entre otros, el miR-33 y miR-26a se unen a los mRNAs de *Pck1* y *G6Pasa* en hepatocitos primarios humanos y en ratones, mediando las acciones de la insulina [173, 174].

Regulación no hormonal.

Los mecanismos de la regulación de la producción de glucosa no hormonales hacen referencia a los mecanismos de “auto regulación” del hígado, intrínsecos y autónomos. Inicialmente, este fenómeno o capacidad del hígado de detectar los niveles de glucosa y adaptar en consecuencia su metabolismo, se observó en los estudios de regulación de la gluconeogénesis llevados a cabo en cultivos celulares de hepatocitos o hígados aislados, donde la producción de glucosa dependía de los niveles de glucosa del medio, pero no de los niveles hormonales [175]. En este sentido, se ha visto que la infusión de glucosa es capaz por sí misma, con independencia de la regulación hormonal, de disminuir la producción hepática de glucosa [176, 177]. Cabe destacar que la capacidad de la glucosa de inhibir la gluconeogénesis *per se*, se pierde en animales diabéticos [178]. Estos resultados sugieren que, en el mecanismo no hormonal, la regulación de la producción hepática de glucosa se produce por mecanismos rápidos, mediados por sustratos gluconeogénicos o metabolitos dependientes de la glucosa [179]. Sin embargo, nuevos y adicionales estudios son necesarios para elucidar esta cuestión, ya que se desconoce por completo el mecanismo exacto por el que se lleva a cabo esta regulación.

1.2.2.4 Hiperglicemia y diabetes.

Como se ha descrito en los apartados anteriores, el mantenimiento de la normoglucemia en individuos sanos exige una respuesta coordinada a las diferentes señales del estado nutricional. Esta coordinación se pierde en los individuos con diabetes, patología que representa la principal perturbación de la homeostasis de la glucosa, y que supone una de las patologías médicas más desafiantes del siglo XXI [180]. En la actualidad, aproximadamente 1 de cada 11 adultos en el mundo sufre diabetes, y la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha catalogado a esta patología como la séptima causa de muerte. Para 2045, a nivel global, se estima que habrá 693 millones de pacientes diabéticos, y el coste de esta patología superará los 850.000 millones de dólares (cerca del 75% del PIB español), y será responsable directa de una reducción de hasta 12 años en la esperanza de vida de los pacientes, así como la causante de 5 millones de muertes anuales en todo el mundo [181]. Esta epidemia se debe principalmente al incremento en la

incidencia de la diabetes tipo 2 (DT2), una enfermedad heterogénea que se caracteriza por una secreción deficiente de insulina por las células β del páncreas, en un contexto de resistencia a insulina [181]. A diferencia de la diabetes tipo 1, que se caracteriza por ocurrir temprano en el desarrollo de los individuos, y en la que no se produce insulina por el páncreas, la DT2 se asocia fuertemente con el estilo de vida, la obesidad, el daño hepático y el síndrome metabólico.

Diferentes estudios longitudinales en humanos han demostrado que, los sujetos que acaban desarrollando DT2, muestran gradualmente un incremento en los niveles de glucosa en ayunas y glucosa postprandial, de entre 3 a 6 años antes de que se diagnostique la enfermedad [182, 183]. La sensibilidad a la insulina, que depende principalmente de la edad, el sexo y el peso corporal, empeora años antes de que se desarrolle la diabetes, y representa uno de los eventos patológicos más tempranos en la evolución de la enfermedad. En una etapa inicial, las células β del páncreas pueden compensar la resistencia a insulina, produciendo y secretando más insulina, generando así hiperinsulinemia. Recientemente se ha demostrado también que una disminución en la tasa de eliminación de la insulina circulante, actividad que se realiza principalmente en el hígado, ayuda a incrementar la hiperinsulinemia, y que este evento contribuye antes que las células β del páncreas al incremento de los niveles de insulina circulantes [184-186]. La hiperinsulinemia que se genera para controlar la glucemia, promueve colateralmente la lipogénesis hepática, esteatosis, hiperlipidemia, y la expansión del tejido adiposo, debido a su potente efecto lipogénico [187, 188]. Consecutivamente, la resistencia a insulina y la inflamación que tienen lugar en el tejido adiposo causan su disfunción, e incrementan su actividad lipolítica. Este evento provoca un aumento en la carga de lípidos en el hígado, empeorando así la condición hepática, promoviendo el desarrollo de la esteatosis hepática y la resistencia a insulina. Además, el aumento del flujo de lípidos hacia el hígado, en forma de ácidos grasos libres y glicerol, incrementa la producción hepática de glucosa, lo que empeora el perfil glucémico [189, 190].

A diferencia de la resistencia del músculo y la resistencia del tejido adiposo a la insulina, que ocurren antes de que la hiperglucemia tenga lugar, y que permanecen relativamente estables durante el curso de la enfermedad, el incremento de la producción hepática de glucosa se incrementa progresivamente durante el transcurso de la enfermedad, y se vuelve refractario al tratamiento [191]. En la T2D, la producción hepática de glucosa está incrementada en estado postprandial, debido principalmente a una excesiva gluconeogénesis, y no a una mayor tasa de glucogenolisis [192]. Esto se debe en gran medida a que la insulina no es capaz de inhibir la producción de glucosa en el hígado, característica que se observa en etapas tempranas en la evolución de la enfermedad. En consecuencia, la incapacidad para suprimir la gluconeogénesis en el hígado se considera, de forma general, una característica indicativa de la resistencia hepática a la insulina, y se utiliza como herramienta para medir la sensibilidad a la insulina en el hígado [193].

El tratamiento de la T2D tiene como objetivo alcanzar valores lo más cercanos posibles, y de la forma más segura, a los parámetros normales en los tres componentes más característicos del control glucémico: la hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}), la glucosa en ayunas y la glucosa postprandial [194]. En los humanos, se diagnostica la diabetes cuando los niveles de glucosa en ayunas son iguales o superiores a 126 mg/dl, o cuando los niveles de glucosa postprandial (después de haber ingerido una carga oral de 75 gramos de glucosa) son iguales o superiores a 200 mg/dl 2 horas después de la ingesta. Estos valores son mucho más elevados que los valores de referencia, que son aproximadamente 92 mg/dl y 97 mg/dl respectivamente. Los umbrales para definir la diabetes se eligieron debido a que permitían diferenciar de forma efectiva a las personas con elevado riesgo a sufrir patologías oculares (asociadas a la hiperglicemia) de aquellas con bajo riesgo [195]. Complementariamente, numerosos estudios muestran la fuerte

relación entre los valores de HbA_{1c} y las complicaciones cardiovasculares asociadas a la diabetes, siendo aconsejable que los valores de HbA_{1c} sean menores al 6,5 %. Los valores de la HbA_{1c} se consideran el parámetro por excelencia para la medición de la glucemia a largo plazo. Sin embargo, no aportan ninguna información sobre la frecuencia y la dimensión de los incrementos en la glucosa en sangre, ya que solo proporcionan información del valor glucémico medio general. Por el contrario, la hiperglucemia postprandial ocurre de forma frecuente en los sujetos con resistencia a insulina o en pacientes diabéticos, tratados o no tratados, teniendo lugar incluso cuando el control metabólico es aparentemente adecuado o los valores de la glucosa en ayuno son normales, convirtiéndola en una técnica muy sensible e informativa [196].

Actualmente, la diabetes es una patología que no tiene cura, pero sí se puede tratar y controlar. En el manejo de la enfermedad, el control glucémico no es el único objetivo, sino también la pérdida de peso, la mejora de la condición hepática, y la prevención del daño micro y macrovascular [197]. En la actualidad hay distintos tratamientos para la diabetes que ejercen sus efectos clínicos a través de diferentes mecanismos. Se agrupan principalmente en 5 grupos de agentes antidiabéticos: biguanidas, como la metformina, que reduce la gluconeogénesis hepática; secretagogos de la insulina, como GLP1 y GIP, que estimulan la secreción pancreática de insulina; inhibidores de SGLT2, que impiden la reabsorción de la glucosa en los riñones; sensibilizadores a la insulina, como las tiazolidinediones, que mejoran la sensibilidad a insulina en los tejidos periféricos; e insulina y sus análogos sintéticos, que proporcionan insulina exógena en forma de insulina recombinante. Actualmente, el uso de fármacos basados en la terapia combinada supone una metodología prometedora para el tratamiento no solo de la diabetes, sino de la obesidad y el síndrome metabólico asociados [198-200].

1.3 p53.

El gen *p53*, o *TP53*, codifica la proteína p53, de 43.7 KDa, descrita por primera vez en 1979 [201, 202]. Su nombre hace referencia a su masa molecular aparente: corre como una proteína de 53 KDa en un gel SDS-PAGE. Esta diferencia se debe a la gran cantidad de residuos de prolina que contiene p53 en su extremo N-terminal, haciendo que migre más lentamente en el gel, y que parezca una proteína más pesada de lo que realmente es [203]. Asimismo, p53 le da nombre a una familia de factores de transcripción que incluye a p63 y a p73, homólogos funcionales de p53, con quien comparten una elevada similitud en secuencia y estructura [204].

p53 se identificó por primera vez formando un complejo con el antígeno T del virus SV40, la oncoproteína de este virus tumoral. Este descubrimiento, junto con los sucesivos estudios que mostraban que muchos tumores exhibían elevados niveles de p53, fenómeno que no se observaba en los tejidos sanos, postularon a p53 como una proteína oncogénica [205]. Sin embargo, sucesivos hallazgos cambiaron la percepción sobre esta proteína, señalando que no se trataba de una oncoproteína, sino que actuaba como supresor tumoral, frecuentemente mutado y alterado en los tumores. En la segunda década tras su descubrimiento, se perfilaron sus funciones, señalando que se trataba de un factor de transcripción activado por estrés celular, y que desencadenaba la detención del ciclo celular, y promovía la apoptosis y la senescencia. En los últimos años, nuevos estudios han permitido profundizar en sus funciones, incluyendo el metabolismo, tanto en células alteradas como no alteradas [203].

1.3.1 Estructura de p53.

Se ha descrito que la proteína *wild-type* de p53 contiene 393 aminoácidos, y está constituida por tres dominios funcionales (Imagen 7) [206, 207]

- Dominio N-terminal (aminoácidos 1-100): es el dominio de activación. Contiene dos subdominios de transactivación y una región rica en prolina (aminoácidos 64-92). Interacciona con el complejo de transcripción, proteínas reguladoras y MDM2, una ubiquitin-ligasa E3 específica, altamente implicada en la estabilidad y degradación de p53 (Imagen 7).
- Dominio de unión a DNA (aminoácidos 101-300): necesario para su unión a las secuencias específicas de DNA para p53 (Imagen 7), que comprende motivos consenso de 2 decanucleótidos RRRCWWGYYY (R, purinas = A, G; Y, pirimidinas = C, T; W = A, T), separados por un espaciador variable, de entre 0 a 14 nucleótidos [208]. El 93% de las mutaciones de p53 encontradas en distintos tipos de cáncer en humanos se localizan en este dominio.
- Dominio C-terminal (aminoácidos 301-393), necesario para la dimerización, ya que la proteína p53 funcional es un tetrámero homodimérico. Además, en el dominio C-terminal se localiza un subdominio de regulación negativa (Imagen 7). Según el modelo alostérico, este subdominio permanece bloqueado al estar unido al dominio central, a no ser que la interacción entre el dominio C-terminal y el dominio central se vea interrumpida por modificaciones postraduccionales, que desencadenan un cambio conformacional que permite que el dominio de unión a DNA quede libre y activo, y p53 desarrolle su actividad transcripcional.

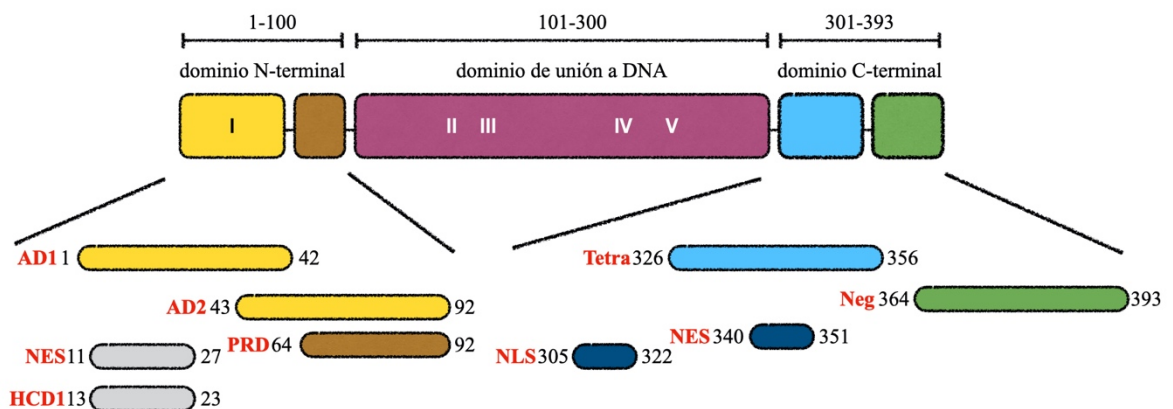


Imagen 7. Representación esquemática de la estructura proteica de p53. La proteína p53 está constituida por tres dominios funcionales: el dominio N-terminal, el dominio de unión de DNA y el dominio C-terminal. AD1: subdominio de activación 1. AD2: subdominio de activación 2. PRD: región rica en prolina. NES: secuencia de exportación nuclear. HCD: subdominio altamente conservado I. Tetra: subdominio de oligomerización. Neg: subdominio de regulación negativa. NLS: secuencia de localización nuclear. Imagen de elaboración propia.

1.3.2 Regulación de la actividad de p53.

La actividad de p53 está estrechamente ligada a un incremento intracelular de sus niveles de proteína, determinado, en mayor medida, por una disminución de la degradación de p53. En condiciones celulares normales, p53 es una proteína inestable, con una vida media corta, de 5 a 30 minutos, y que es rápidamente degradada, principalmente por MDM2. MDM2 es una E3 ligasa que promueve la ubiquitinación de p53 [209] y su degradación por el proteosoma, a la vez que inhibe la transactivación de p53 [210]. Adicionalmente, MDM2 es un gen regulado directamente por p53, por lo que generan un sistema de regulación negativa, que promueve que

la actividad y los niveles basales de p53 permanezcan bajos [211]. Aunque MDM2 es fundamental para mantener los niveles de p53, tanto en etapas embrionarias como en la adultez [212], se ha descrito que otras ubiquitin ligasas, como Pirh2, COP1, CHIP, ARF-BP1, E6-AP, TOPORS, TRIM24 y MKRN1 también contribuyen de forma importante a la degradación de p53 [213-217], actuando de forma independiente a MDM2.

La activación de p53 implica la disociación de sus reguladores negativos, principalmente MDM2 y MDMX, también llamada MDM4, que es una proteína relacionada y similar a MDM2, que al igual que ella, inhibe la transactivación de p53 [218]. Las modificaciones postraduccionales juegan un papel muy importante en el proceso de activación y función de p53, ya que ocupan los residuos que serían ubiquitinizados, permiten la disociación de p53 de sus reguladores negativos, marcan su localización celular y sirven para determinar la afinidad por los genes diana, permitiendo que se active selectivamente la expresión de diferentes genes en función del estímulo y la condición fisiológica que tenga lugar. Además, los efectos de estas modificaciones son específicos de tejido y tipo celular. En el campo de la oncología molecular, se ha descrito que p53 es la proteína en la que se han caracterizado y descrito más sitios de modificaciones postraduccionales, realizadas por diferentes enzimas [210, 219], lo cual refleja la complejidad y precisión de la regulación de la actividad de p53. Así, se ha caracterizado que la proteína p53 se modifica postranscripcionalmente por fosforilación [220], acetilación [221], metilación [222], sumoilación [223], ubiquitinación [224], ADP-ribosilación [225], nedilación [226] y *O*-GlcNAcilación [227] (Imagen 8).

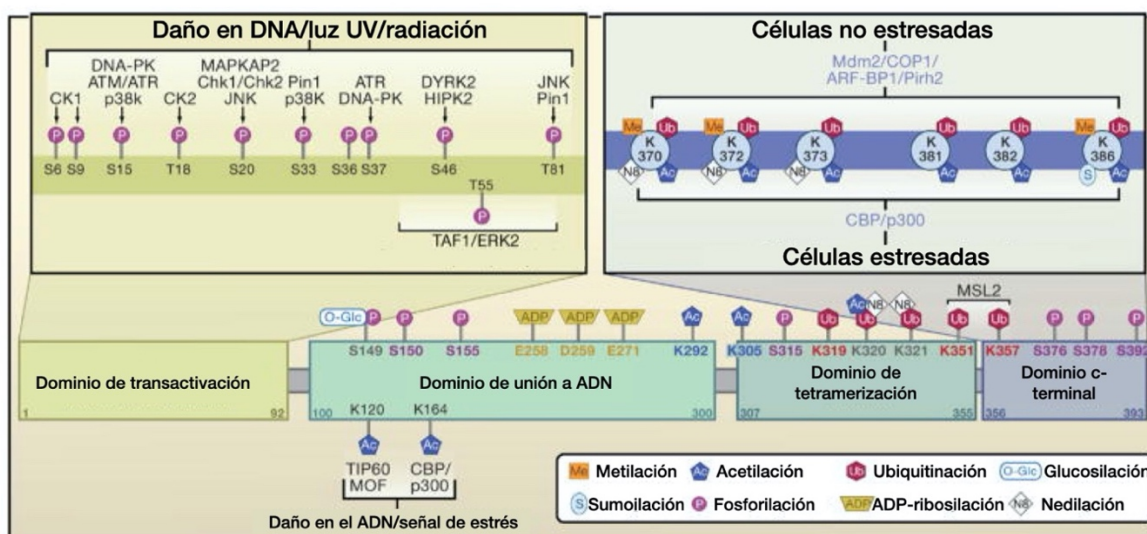


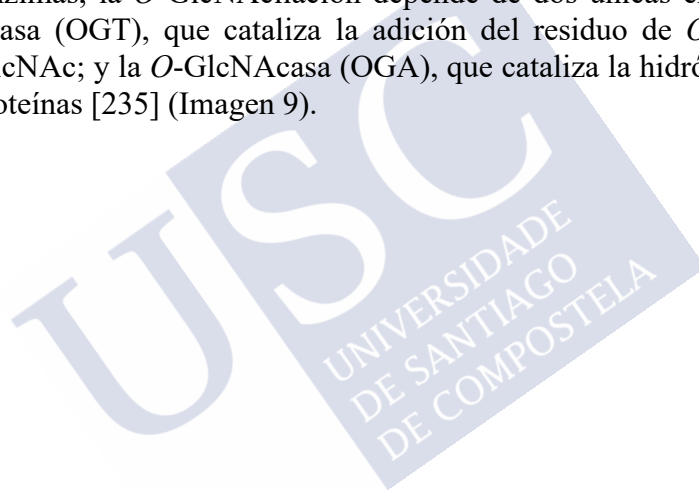
Imagen 8. Principales modificaciones de la proteína p53. Imagen de elaboración propia.

1.3.1.1 *O*-GlcNAcilación.

La *O*-GlcNAcilación es un tipo de glucosilación no canónica, que consiste en la adición de un residuo de N-Acetilglucosamina (GlcNAc) en el grupo hidroxilo de los aminoácidos serina o treonina [228]. A diferencia de otros tipos de glucosilaciones, la *O*-GlcNAcilación ocurre en el núcleo y en el citoplasma; suele consistir en la adición de uno o muy pocos residuos, que raramente se elongan o modifican para formar estructuras complejas; los residuos de *O*-GlcNAc se añaden y eliminan de las proteínas múltiples veces a lo largo de su ciclo de vida, en ciclos que suelen ser rápidos y específicos para cada residuo de la proteína; y suele tener efectos parecidos a los de la fosforilación, estando profundamente implicada en la activación y estabilización de las proteínas [228, 229].

La *O*-GlcNAcilación es un proceso influido por cambios en la disponibilidad de nutrientes, ya que su precursor, la UDP-GlcNAc, que actúa como donador del residuo glucosídico, es el resultado del metabolismo de la glucosa, de los ácidos grasos, de los ácidos nucleicos y de los aminoácidos (Imagen 9). Además de estar relacionada con el estado nutricional, se ha caracterizado que la vía de señalización de la *O*-GlcNAcilación es altamente sensible a diversos tipos de estrés celular (como el shock térmico, la hipoxia y la privación de nutrientes), por lo que la *O*-GlcNAcilación se ha propuesto como un sensor nutricional y de estrés, que regula los procesos celulares que van desde la transcripción y la traducción, hasta la transducción de señales y el metabolismo [230]. Concretamente, se ha determinado que la concentración intracelular de UDP-GlcNAc disminuye durante el ayuno o la privación de glucosa, permitiendo un incremento de la *O*-GlcNAcilación de las proteínas [231-233].

La *O*-GlcNAcilación participa en una interacción compleja con otras modificaciones postraduccionales, permitiendo que se generen “códigos” o “patrones combinatorios” dinámicos que permiten integrar y regular de forma sofisticada la estabilidad y función de las diferentes proteínas [234]. Mientras que otros tipos de modificaciones pueden ser realizadas por diferentes enzimas, la *O*-GlcNAcilación depende de dos únicas enzimas, que son la *O*-GlcNAc transferasa (OGT), que cataliza la adición del residuo de *O*-GlcNAc a partir del donador UDP-GlcNAc; y la *O*-GlcNAcasa (OGA), que cataliza la hidrólisis y eliminación del residuo de las proteínas [235] (Imagen 9).



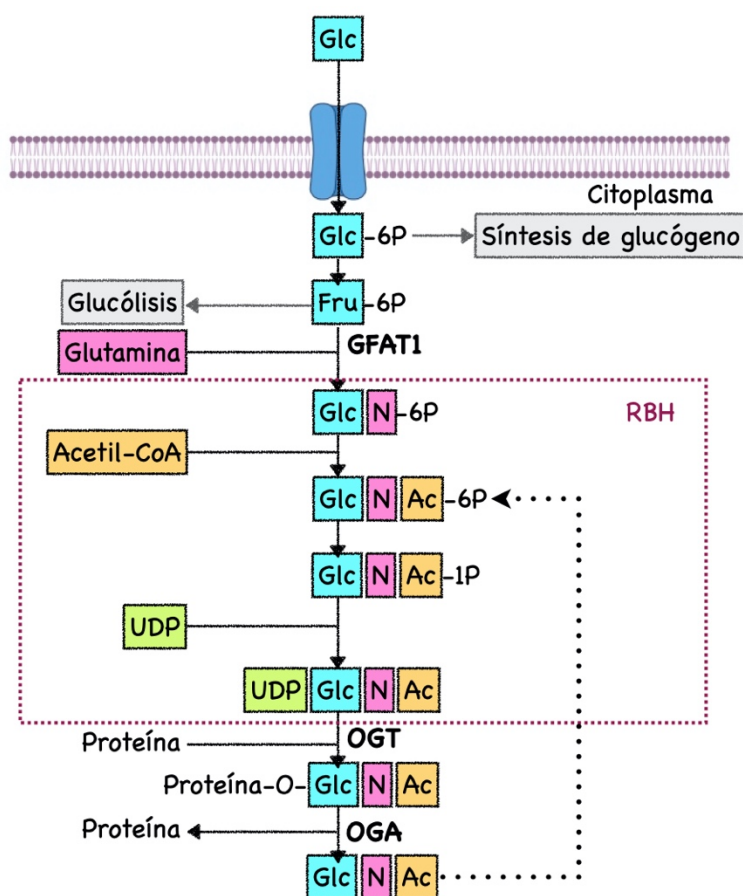


Imagen 9. Síntesis del GlcNAc a partir del flujo de nutrientes por la vía biosintética de las hexosaminas. La glucosa (Glc) entra a las células a través de los transportadores de glucosa. Mientras que la mayoría de la glucosa se deriva a la glucólisis o a la síntesis de glucógeno, aproximadamente el 2-5% de la glucosa es canalizada a la ruta biosintética de las hexosaminas (RBH). La enzima glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa 1 (GFAT1) cataliza la reacción limitante de la RBH, que convierte la fructosa-6-fosfato (Fru-6P) en glucosamina-6-fosfato (GlcN-6P). La subsecuente acetilación de la GlcN-6P (para producir N-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc-6P)) y la uridilación del GlcN-1P generan el sustrato necesario para la O-GlcNAcilación de las proteínas, el UDP-GlcNAc. Las enzimas OGT y OGA catalizan la adición y la eliminación del O-GlcNAc de las proteínas, respectivamente. El O-GlcNAc libre puede ser reciclado y reutilizado de nuevo. Imagen de elaboración propia.

Se ha descrito que la O-GlcNAcilación está implicada en numerosos procesos biológicos, como la regulación de la transcripción [236, 237], la regulación epigenética [238, 239] regulación de la señalización intracelular [240, 241] y el metabolismo, donde se ha erigido como un importante sensor nutricional. En las neuronas AgRP, la ghrelina incrementa la O-GlcNAcilación durante el ayuno, lo que incrementa su actividad neuronal a través de la activación de los canales de potasio KCNQ3, lo que reduce el gasto energético a través de la inhibición del *browning* del tejido adiposo blanco [242]. En las neuronas positivas para α CaMKII en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, la delección de OGT genera obesidad por hiperfagia, al estar dañado el mecanismo de saciedad [243]. En el tejido adiposo blanco, la inhibición de OGT promueve la lipólisis, al disminuir la O-GlcNAcilación de perilipin1 (PLIN1) y permitir que se fosforile; mientras que la sobre expresión de OGT promueve la ganancia de peso corporal inducida por la dieta, al inhibir la lipólisis del tejido adiposo [244]. En el músculo se ha observado que la O-GlcNAcilación es necesaria para la

correcta regulación metabólica del tejido, pero se encuentra desregulada en pacientes obesos con DT2. La inhibición de OGT en el músculo incrementa el gasto energético, genera un fenotipo delgado y mejora la sensibilidad a insulina [245].

En el hígado, se ha descrito que la *O*-GlcNAcilación tiene un papel muy importante en la inducción de la gluconeogénesis durante el ayuno y la resistencia a insulina. La *O*-GlcNAcilación de los coactivadores transcripcionales CRTC2 [236] y PGC1 α resulta imprescindible para su estabilidad y función gluconeogénica [246]. Este último hallazgo permitió descubrir además que, uno de los mecanismos fundamentales por los cuales PGC1 α actúa como coactivador transcripcional, es sirviendo de puente entre OGT y los factores de transcripción específicos, permitiendo que se *O*-GlcNAcilen [247]. En esta línea, se ha demostrado que la *O*-GlcNAcilación de FoxO1 y FoxO3a, mediada por PGC1 α , fomenta su actividad transcripcional [248]. También se ha visto que la *O*-GlcNAcilación está involucrada en la respuesta hepática al glucagón, participando en la vía de señalización de la activación de la autofagia mediada por el glucagón en ayuno [249]. Asimismo, se ha asociado una elevada *O*-GlcNAcilación con complicaciones diabéticas [250-253]. Sin embargo, aunque se ha documentado que la expresión específica de OGT en el hígado causa intolerancia a la glucosa y resistencia a insulina [254, 255], los estudios al respecto focalizados en el hígado son escasos, o prácticamente inexistentes, por lo que los mecanismos subyacentes responsables de la hiperglicemia y/o diabetes inducida por la *O*-GlcNAcilación específicamente en el hígado deben ser explorados en profundidad.

En lo referente a p53, se ha descrito que se *O*-GlcNAcila en líneas celulares tumorales de mama y ovario [227, 256], así como en pericitos de la retina en condiciones de hiperglicemia [257], condiciones en las cuales esta modificación postraducciona promueve su estabilización y actividad. Concretamente, gracias al trabajo de Jin Won Cho y colaboradores, se ha identificado que p53 se *O*-GlcNAcila en la serina 149, ya que cuando se muta esta serina a alanina, se pierde el efecto estabilizador de la modificación postraducciona [227]. Sin embargo, si p53 se *O*-GlcNAcila en condiciones fisiológicas, y si este proceso supone un mecanismo relevante en el metabolismo hepático, se desconoce por completo.

1.4 FUNCIONES DE P53.

p53 ha sido nombrado como el “guardián del genoma” o “guardián celular”, debido a que el daño en el ADN fue el primer factor estresante caracterizado como activador de p53 [258]. Desde entonces, se han descrito otros factores como la hipoxia, la activación de oncogenes y la restricción de nutrientes que activan también a p53, posicionándolo como un nodo central en la coordinación de la respuesta a diferentes factores y niveles de estrés celular [259, 260]. La respuesta de p53 inducida por estrés depende del tipo celular y la intensidad, duración y origen del estímulo. Un estrés severo y sostenido en el tiempo, acompañado de daños irreversibles, como el daño genotóxico o la activación de oncogenes, promueve la inducción de la muerte celular o la senescencia. Estas respuestas sirven para eliminar de forma efectiva las células dañadas, impidiendo la acumulación inapropiada de células con daños genómicos heredables y la proliferación de células malignas. Por el contrario, un estrés leve resulta en una respuesta de p53 más sutil, con el objetivo de reparar o prevenir los daños. En estos casos, p53 puede participar en procesos de reparación de daños en el DNA, al tiempo que induce una detención transitoria del ciclo celular, permitiendo así que las células sobrevivan de manera segura hasta que el daño se haya reparado. El estrés metabólico, inducido por las fluctuaciones en los niveles de oxígeno o la disponibilidad de nutrientes, desencadenan una respuesta más adaptativa, en la que p53 coordina la proliferación y el crecimiento celular con el status energético. Las

funciones metabólicas de p53 se han erigido no solo como componentes fundamentales en el control del desarrollo tumoral, sino también en el mantenimiento de la homeostasis celular normal [261]. Una vez activado, p53 ejerce sus funciones principalmente actuando como factor de transcripción, regulando la expresión de genes y miARNs [262]. Se ha descrito que p53 puede ejercer también acciones citosólicas, inhibiendo la autofagia [263] y promoviendo la apoptosis [264].

La reprogramación metabólica es una característica principal de las células tumorales, que requieren energía y una amplia variedad de sustratos para la biosíntesis, para poder proliferar a gran velocidad [265, 266]. La creciente evidencia y los datos obtenidos en los últimos años, señalan que los reguladores del ciclo celular tienen a su vez importantes acciones en el control metabólico de las células [267-270], como es el caso de p53 [271], donde se ha descrito que tiene importantes efectos en el metabolismo de lípidos, aminoácidos y glucosa, tanto en el sistema nervioso central como en los tejidos periféricos, como se desgrana a continuación.

1.4.1 Papel de p53 en el metabolismo lipídico.

Los lípidos son constituyentes principales de las membranas celulares, importantes sustratos energéticos y esenciales señalizadores celulares, por lo que su metabolismo debe estar perfectamente regulado. En muchos tipos tumorales, la síntesis *de novo* de lípidos es una característica principal, y se ha descrito que p53, como supresor tumoral, es capaz de inhibir este proceso a través de diferentes mecanismos, promoviendo la oxidación de ácidos grasos [272]. Pero p53 no solo regula el metabolismo lipídico de las células tumorales, sino que se ha visto que ejerce importantes funciones en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas [273]. En los adipocitos, se ha descrito que p53 promueve la oxidación de ácidos grasos e inhibe la lipogénesis en situaciones de estrés nutricional, tanto *in vivo* [274] como *in vitro* [275]. En el hígado, p53 promueve la oxidación de lípidos durante el ayuno, siendo fundamental para mantener la homeostasis lipídica en estas condiciones [276]. En línea con estos resultados, se ha caracterizado que los ratones p53^{-/-} ganan menos peso que los ratones p53^{+/+} cuando se alimentan con dieta alta en grasa, y sin embargo, la falta de p53 promueve la adiposidad y acumulación de lípidos en el hígado [277]. La recuperación específica de p53 en el hígado [278], así como su estimulación farmacológica [279] mejoran el perfil hepático, reduciendo la esteatosis hepática no alcohólica. La importancia de p53 en el metabolismo lipídico también se aprecia en su papel en el tejido adiposo marrón [280], donde es necesario para la actividad termogénica de ratones adultos [281]. Además, se ha demostrado que p53 media las acciones de la ghrelina sobre el metabolismo lipídico del tejido adiposo y el hígado [282, 283].

1.4.2 Papel de p53 en el metabolismo de aminoácidos.

El metabolismo de los aminoácidos está alterado con frecuencia en cáncer [284]. La enzima PHGDH es fundamental para la síntesis de serina, y se encuentra incrementada en varios tipos de cáncer, entre los que se incluyen el cáncer de mama, el melanoma y el cáncer de pulmón, promoviendo el desarrollo del tumor. Se ha descrito que p53 reprime la transcripción de PHGDH, inhibiendo así la síntesis *de novo* de serina en las células alteradas [285]. La glutamina es otro aminoácido muy importante, ya que proporciona carbono, NADPH y glutatión para las células cancerígenas y las células en proliferación, contribuyendo al control redox. La glutaminasa es una enzima fundamental en el metabolismo de la glutamina, convirtiéndola en glutatión. Se ha descrito que p53 incrementa los niveles de glutaminasa en el hígado, contribuyendo al control de la respiración mitocondrial y al equilibrio redox. La falta de p53 en

el hígado provoca un desbalance en el equilibrio redox y un incremento en el daño en el DNA, lo que promueve la progresión tumoral [286]. Asimismo, se ha demostrado que p53 en el hígado está relacionado con el catabolismo de aminoácidos durante el ayuno [287].

1.4.3 Papel de p53 en el metabolismo de la glucosa.

La mayoría de las células cancerosas muestran alteraciones en el metabolismo de la glucosa [288]. En estas, la glucólisis anaerobia es la vía preferida para la obtención de energía, mediante la descomposición de glucosa a piruvato, incluso en condiciones aeróbicas normales. El piruvato resultante es convertido entonces a lactato. Aunque por esta vía se obtiene menos energía que descomponiendo completamente la glucosa a CO₂ y H₂O, las células cancerosas obtienen así esqueletos carbonados y otros precursores para la biosíntesis, y compensan la menor obtención de energía catabolizando mayores cantidades de glucosa que las células normales. Este cambio de preferencia de la respiración mitocondrial a la glucólisis anaerobia se conoce como el efecto Warburg, y permite a las células tumorales dividirse a gran velocidad [289]. Los intermediarios obtenidos durante la glucólisis sirven como precursores para la síntesis de aminoácidos, lípidos y nucleótidos, por lo que la glucosa se posiciona como un sustrato de gran importancia, siendo de hecho, el principal sustrato que nutre de intermediarios al Ciclo de Krebs [290]. Se ha descrito que p53 desarrolla un papel fundamental en el metabolismo de la glucosa de las células cancerosas oponiéndose al efecto Warburg, inhibiendo la glucólisis anaerobia y promoviendo la respiración mitocondrial a través de diferentes mecanismos. Por un lado, p53 induce la expresión de TIGAR, que promueve la inactivación de PFK1, una de las principales enzimas glucolíticas (Imagen 1) [291, 292]. p53 también reprime la expresión de PDK2, permitiendo así la activación del complejo PDH y favoreciendo la producción de acetil-CoA (Imagen 1) a partir de piruvato, en detrimento de la producción de lactato [293]. p53 disminuye también los niveles de la hexokinasa 2, inhibiendo la glucólisis en las células de cáncer de próstata [294]. Además de regular las enzimas glucolíticas, se ha descrito que p53 disminuye la disponibilidad interna de glucosa inhibiendo la captación de glucosa, reprimiendo la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 [295], y disminuyendo los niveles de GLUT3 reprimiendo la actividad de su activador transcripcional NF-kappaB [296]. La activación de la vía molecular de PI3K/AKT promueve la glucólisis en las células cancerosas. La enzima PTEN es una fosfatasa que inhibe la activación de AKT [297]. Se ha descrito que p53 inhibe la vía PI3K/AKT activando la transcripción de PTEN y Parkin, una proteína que a su vez regula positivamente a PTEN [298-300]. Además, p53 inhibe la vía PI3K/AKT inhibiendo la expresión del receptor de insulina en las células de cáncer de mama [301]. Asimismo, se ha descrito que p53 inhibe la gluconeogénesis en células tumorales de colon [302].

Mientras que el papel de p53 en el metabolismo de la glucosa se ha estudiado en profundidad el contexto de las células tumorales, se han realizado muy pocos estudios acerca de su función en las células no tumorales. En este sentido, se ha demostrado que los niveles de proteína de p53 están elevados en los adipocitos de ratones obesos con diabetes, y que su inhibición mejora la sensibilidad a insulina [303]. Este efecto de p53 se observa también en pacientes humanos con ataxia telangiectasia, propensos a desarrollar resistencia a insulina. En estos pacientes, los niveles de p53 son elevados, ya que la proteína responsable de la enfermedad, la kinasa ATM, es una inductora de la actividad de p53 [304]. Se ha descrito también que en el páncreas de ratones diabéticos los niveles de p53 se encuentran aumentados, reprimiendo la expresión de PC y consecuentemente, disminuyendo la secreción de insulina [305]. En el hígado se ha descrito que durante el ayuno se incrementan los niveles de p53 [287, 306], así como una

asociación positiva entre los niveles de p53 y la expresión de genes relacionados con la gluconeogénesis o los niveles de glucosa [287, 307, 308]. Sin embargo, la relevancia fisiológica del papel de p53 hepático en el control de gluconeogénesis, así como el mecanismo molecular subyacente, se desconocen por completo.





OBJETIVOS





2. OBJETIVOS.

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

- Estudiar la regulación de los niveles de proteína de p53 en el hígado por el estado nutricional.
- Estudiar el papel de p53 en la gluconeogénesis hepática.
- Estudiar el papel de p53 como mecanismo de acción de las principales hormonas glucorreguladoras.





HIPÓTESIS





3. HIPÓTESIS.

Nosotros hipotetizamos que p53 podría tener un papel fundamental en la regulación de la glicemia en ayuno, así como mediando las acciones de las principales hormonas glucorreguladoras.





MATERIAL Y MÉTODOS





4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Los procedimientos experimentales con animales incluidos en esta tesis fueron aprobados por el comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela, bajo la responsabilidad del profesor Rubén Nogueiras Pozo, y registrados con los números de procedimiento: ID 15005E/12/FUN01/FIS02/RNP2 (bajo el cumplimiento del RD 1201/2005 del 10 de octubre) y el ID 15010/2017/007 (bajo el cumplimiento del actual y vigente RD 53/2013 del 1 de febrero). Dichos procedimientos se han realizado por tanto bajo el amparo del marco legislativo vigente: Directiva 2010/63/UE del Parlamento y Consejo Europeo del 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos; traspuesto a la norma española con el Real Decreto 53/2013, del 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.

Todos los procedimientos experimentales con animales incluidos en esta tesis fueron realizados en el centro usuario: ANIMALARIO DEL CIMUS y en el ANIMALARIO DEL CEBEGA.

Además, considerando las implicaciones éticas asociadas al uso de animales con fines científicos, los diseños experimentales se realizaron teniendo en cuenta el principio de las tres erres (reducción, refinamiento y reemplazo). En base a estos principios, en esta tesis doctoral se procuró usar el menor número de animales para obtener los datos suficientes que respondiesen a la cuestión investigada, y maximizar la información obtenida por animal, para así limitar o evitar potencialmente el uso de otros animales. Asimismo, se trató de minimizar el dolor y la angustia de los animales, maximizando y priorizando su bienestar. Siempre que ha sido posible, se ha valorado y empleado el uso de métodos alternativos (cultivos celulares).

4.1.1. Modelos animales.

En esta tesis doctoral se han empleado:

- Ratones macho *wild type* (WT) C57BL6/J suministrados por el Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela.
- Ratones macho con el gen p53 floxeado (cepa B6;129S4-Trp53^{tm5Tyj/J}) procedentes de la casa comercial *The Jackson Laboratory*.
- Ratones macho que expresan el gen de la recombinasa Cre bajo la expresión del promotor de la albúmina y los *enhancers* de la α -fetoproteína (transgen AlfpCre), configuración que mimetiza la organización estructural del gen de la albúmina en el ratón [309, 310].
- Ratones macho *knock out* condicionales para el gen p53 específicamente en el hígado bajo la acción del promotor de la albúmina.

Los animales fueron estabulados en condiciones estables de temperatura ($21\pm 2^\circ\text{C}$), con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (8:00 horas – 20:00 horas) y con un periodo de aclimatación a las instalaciones de unos 7 días aproximadamente, previo a cualquier procedimiento,

Durante todo ese tiempo, los animales fueron mantenidos en condiciones de acceso libre a dieta estándar y a agua, con excepción de aquellos procedimientos experimentos en los que se especifique otra condición. Para verificar el correcto bienestar de los animales, estos fueron monitorizados periódicamente mediante un seguimiento controlado de masa corporal e ingesta, además de valorar su correcto aspecto físico y conductual, y acostumarlos al manejo por el personal del laboratorio para reducir en todo lo posible el estrés generado durante los experimentos llevados a cabo.

La estabulación de los animales fue colectiva o individual en función de las características de cada procedimiento, y siempre teniendo en cuenta el comportamiento social de estos animales.

4.1.2 Procedimientos en los animales.

4.1.2.1 Monitorización de la ingesta y la masa corporal.

La determinación de la masa corporal y la ingesta se realizó mediante una balanza de precisión; los animales fueron pesados semanalmente, así como su comida, siempre el mismo día de la semana. Dado que los animales se mantuvieron en grupo en una misma caja (tanto en dieta estándar como en dieta alta en grasa), la ingesta se promedió en función del número de individuos de cada caja.

4.1.2.2. Efecto del estado nutricional en los niveles hepáticos de p53.

Para estudiar el efecto del estado nutricional en los niveles hepáticos de p53 y PCK1, los ratones WT fueron alimentados *ad libitum*, sometidos a ayuno durante 6, 12 o 24 horas; o fueron ayunados 24 horas y después realimentados *ad libitum* durante 2 o 24 horas.

El protocolo de ayuno durante 6, 12 y 24 horas, con realimentación *ad libitum* durante 2 horas después de ayuno previo de 24 horas, fue realizado en colaboración con las Doctoras Marta Varela y ML Martínez-Chantar, del grupo Liver Disease Laboratory, Center for Cooperative Research in Biosciences (CIC bioGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Bizkaia Technology Parck, Spain.

4.1.2.3. Efecto de la concentración de glucosa en sangre sobre los niveles hepáticos de p53.

Para estudiar el efecto de la glucosa sobre los niveles hepáticos de p53 *in vivo*, los ratones WT fueron alimentados *ad libitum* con dieta estándar, sometidos a ayuno durante 24 horas, o alimentados únicamente con azúcar (Ab Azucarera Iberia SL), en ausencia de otros nutrientes, para mantener la normoglicemia durante el ayuno [311].

4.1.2.4. Inyección intraperitoneal.

La administración intraperitoneal (IP) se realiza en la parte ventro-caudal del ratón, por debajo de peritoneo. Se sujeta al animal por la espalda oprimiéndole ligeramente las extremidades anteriores para inmovilizarlo. Se inclina la cabeza del animal ligeramente hacia abajo, para minimizar el riesgo de desgarro en vísceras, y se inserta la aguja (BD Microlance, 25G 5/8" 0.5x16 mm, BD Medical Surgicals Systems), acoplada a una jeringa (1 ml BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile, BD Medical Surgicals Systems), prácticamente de manera perpendicular a este, preferiblemente por su costado derecho. La inyección intraperitoneal, como se detallará con precisión en los sucesivos apartados, ha sido el método principal de administración de sustancias en el desarrollo de esta tesis.

4.1.2.5 Test de tolerancia a glucosa.

Para conocer la capacidad de los diferentes grupos experimentales de ratones para tolerar la glucosa, se realizó un test de tolerancia a glucosa (GTT, *glucose tolerance test*). Tras una noche de ayuno, se realizó la administración de D-glucosa (2 g/kg) (Sigma-Aldrich, G8270) por vía IP. Antes de realizar el test, se recogieron los valores basales de glucosa mediante la toma de una muestra de sangre de la cola, usando una tira reactiva conectada a un glucómetro (ARKRAY, USA). Tras la inyección IP de la D-glucosa, se midieron los niveles de glucosa en sangre a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección. Con los datos obtenidos se construyó una curva, de la cual se calculó el área bajo la curva (AUC) de los distintos grupos experimentales.

4.1.2.6 Test de tolerancia a insulina.

Para conocer la sensibilidad a la insulina de los diferentes grupos experimentales de ratones, se realizó un test de tolerancia a insulina (ITT, *insulin tolerance test*) (Actrapid, Novo Nordisk). Tras 6 horas diurnas de ayuno, que permiten normalizar los niveles basales de glucosa y la insulinemia, y evitar así diferencias causadas por el tiempo transcurrido tras la última ingesta de cada ratón, se realizó la administración de insulina (0.35 U/kg) por vía IP. Se midieron los niveles basales de glucosa circulante, así como los niveles de glucosa a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección. Se calculó la AUC de los distintos grupos experimentales.

4.1.2.7 Test de tolerancia a piruvato.

Para conocer la capacidad gluconeogénica de los diferentes grupos experimentales de ratones, se realizó un test de tolerancia a piruvato (PTT, *pyruvate tolerance test*) (Sigma-Aldrich, P2256), que es un inductor de la gluconeogénesis [312]. Tras un ayuno nocturno de 12 horas, se realizó la administración de piruvato (1.25 g/kg) por vía IP. Se midieron los niveles basales de glucosa, así como los niveles de glucosa a los 20, 40, 60, 80 y 120 minutos después de la inyección. Se calculó la AUC de los distintos grupos experimentales.

4.1.2.8 Test de tolerancia a glicerol.

Para conocer la capacidad de los diferentes grupos experimentales para producir glucosa a partir de glicerol, se realizó un test de tolerancia a glicerol (GlyTT, *glycerol tolerance test*), que es un inductor de la gluconeogénesis. Tras un ayuno nocturno de 12 horas, se realizó la administración de glicerol (1g/kg) por vía IP [313]. Se midieron los niveles basales de glucosa,

así como los niveles de glucosa a los 20, 40, 60, 80 y 120 minutos después de la inyección. Se calculó la AUC de los distintos grupos experimentales.

4.1.2.9. Administración de hormonas.

En el desarrollo de esta tesis se les ha administrado vía IP a los diferentes modelos animales: leptina, glucagón, cortisol, adrenalina e insulina.

4.1.2.9.1 *Leptina.*

Para estudiar el efecto de la leptina en la regulación de los niveles de proteína de p53 en el hígado, los ratones WT fueron tratados con salino o leptina recombinante (Sigma Aldrich, L-4146) en una dosis de 0.5 mg/kg cada 12 horas durante 3 días, que se les administró por vía IP [314]. Así, los ratones WT fueron divididos en tres grupos experimentales: a) ratones WT alimentados *ad libitum* con dieta estándar; b) ratones WT en ayuno y tratados con salino IP; y c) ratones WT en ayuno y tratados con leptina IP.

4.1.2.9.2 *Glucagón.*

Los ratones, mantenidos previamente en ayuno durante la noche, fueron tratados con salino o con glucagón 200 µg/kg (Sigma-Aldrich, G1774) por vía IP. Transcurridos 30 minutos tras la inyección, se midieron los niveles de glucosa en sangre [315]. Para su administración, el glucagón se diluye en salino.

4.1.2.9.3 *Cortisol.*

Los ratones, mantenidos previamente en ayuno durante la noche, fueron tratados con salino o con hydrocortisone 21-hemisuccinate sodium salt a una dosis de 20 mg/kg (Santa Cruz Biotechnology, sc-250130). La dosis se seleccionó tras realizar un ensayo de dosis-respuesta, siendo la menor de las dosis testadas capaz de inducir un incremento en la producción hepática de glucosa. Para su administración, la hydrocortisone 21-hemisuccinate sodium salt se diluye en salino. Los niveles de glucosa en sangre fueron medidos a los 15, 30, 45 y 60 minutos tras la administración de la hormona.

4.1.2.9.4 *Adrenalina.*

Los ratones, mantenidos previamente en ayuno durante la noche, fueron tratados con salino o con L-adrenaline (ThermoFisher, L04911) a una dosis de 100 µg/kg. La dosis se seleccionó tras realizar un ensayo de dosis-respuesta, siendo la menor de las dosis testadas capaz de inducir un incremento en la producción hepática de glucosa. Para su administración, la L-adrenaline se diluye en salino. Los niveles de glucosa en sangre fueron medidos con un glucómetro a los 15, 30, 45 y 60 minutos tras la administración de la hormona.

4.1.2.9.5 *Insulina.*

Para estudiar el efecto de la insulina a corto plazo en la regulación de la glucemia en los ratones que sobre expresan p53 específicamente en el hígado, los ratones fueron tratados vía IP

con salino o insulina a una dosis de 0.35 U/kg tras 6 horas diurnas de ayuno. Se midieron con un glucómetro los niveles basales de glucosa circulante, así como los niveles de glucosa a los 5, 10, 15 y 20 minutos después de la inyección.

4.1.2.10 Restricción calórica.

Para la realización del ensayo de restricción calórica, los animales fueron individualizados los 5 días previos al comienzo del ensayo, con acceso *ad libitum* a dieta estándar. Durante ese periodo, los ratones, animales de comportamiento social, fueron aclimatados a la individualización, y se les monitorizó la ingesta diaria, para calcular la ingesta promedio de ingesta diaria de cada individuo. Transcurridos esos primeros 5 días, los ratones fueron separados al azar en dos subgrupos, de los cuales uno siguió con acceso *ad libitum* a dieta estándar, mientras el otro se sometió a una restricción calórica del 60%. Todos los ratones sometidos a restricción calórica recibieron su porción diaria de alimento, el 40% de su ingesta diaria durante los días de aclimatación, a las 18:00 horas. El peso corporal y los niveles de glucosa en sangre de todos los grupos experimentales, se midieron cada día a las 17:30 horas, antes de recibir su porción diaria de alimento [37]. En el tercer día de la restricción calórica, se midieron los niveles de glucosa en sangre a las 20:00 h, 2 horas después de la ingesta, ya que los animales, hambrientos, consumen su porción de alimento con rapidez. Esta medida de los niveles de glucosa en sangre se realizó para evaluar la capacidad de los diferentes modelos experimentales para restablecer los niveles de glucosa tras la ingesta, y averiguar si las diferencias en los niveles de glucosa circulante que se detectaron en los ratones que no expresan p53 en el hígado, se debían a una incapacidad de restablecer los niveles de glucosa en sangre tras la ingesta, o a un deterioro en la capacidad gluconeogénica, encargada de mantener los niveles de glucosa circulantes hasta la siguiente ingesta.

Los ratones fueron sacrificados a las 17:30 horas (antes de la ingesta) en el cuarto día de restricción calórica. El suero y el hígado fueron recogidos para su posterior análisis.

4.1.2.11 Test de tolerancia a la glucosa postprandial.

El test de tolerancia a la glucosa postprandial es una técnica muy sensible e informativa acerca de la capacidad de control glucémico de los diferentes individuos. Los niveles de glucosa elevados después de la ingesta son un indicativo de un control glucémico inadecuado, y es una de las anomalías de la homeostasis de la glucosa que aparecen temprano en el desarrollo de la DMT2 [316].

Para la realización del ensayo del test de tolerancia a la glucosa postprandial, los ratones se sometieron a ayuno durante toda la noche, y después tuvieron acceso *ad libitum* a dieta estándar. Los niveles de glucosa basales, así como la concentración de glucosa en sangre a los 30, 60, 120 y 240 minutos tras el inicio de la ingesta, fueron medidos con un glucómetro [317]. La ingesta fue monitorizadas a los mismos tiempos, empleando una balanza de precisión.

Para generar resistencia a insulina sin provocar cambios significativos en la masa corporal ni el desarrollo del fenotipo de hígado graso no alcohólico, los diferentes modelos de ratón fueron alimentados con dieta alta en grasa (60% fat, Research Diets, D12492) durante 4 días [318]. Transcurridos los 4 días de alimentación con dieta alta en grasa, los diferentes grupos experimentales fueron sometidos a ayuno durante toda la noche, transcurrido el cual tuvieron acceso *ad libitum* a dieta alta en grasa, y sus niveles de glucosa circulante fueron medidos con un glucómetro antes del inicio de la ingesta, y a los 30, 60, 120 y 240 minutos después del inicio

de la misma, para evaluar la capacidad de control glucémico de los diferentes grupos experimentales.

4.1.2.12 Inyección en la vena de la cola.

La inyección en la vena lateral de la cola del ratón (TVI, *tail vein injection*) es el método más común y eficiente de administrar vectores virales en el hígado [319]. Se han identificado al menos 12 serotipos diferentes de AAVs (virus adeno-asociados), 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, los AAV8 pueden infectar entre el 90 y el 95% de los hepatocitos tras la inyección a través de la vena [320]. Esta vía de administración no requiere anestesia, pero sí la utilización de un cepo para inmovilizar de forma correcta al ratón. Los cepos utilizados se adquirieron en la casa comercial BIOSEB, Francia (modelo: TV-150-STD). Antes de administrar las sustancias, es necesario dilatar la vena de la cola del ratón para facilitar la inyección. Para ello, se pueden utilizar varios métodos, como las lámparas térmicas 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 (5-10 segundos). Las inyecciones se realizaron con agujas de 27G x 3/8" (0.4 mm x 10 mm) BD Plastipak syringe (1112678990) un volumen de 100 µl. Las sustancias se inyectan en las venas laterales de la cola, que se localizan a ambos laterales 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.

En esta tesis, se ha utilizado esta vía de administración para inyectar los diferentes virus que modifican la expresión génica de p53:

Virus	Casa comercial y referencia	Dosis (UV/ml)	Vehículo
AAV8-Cre-GFP	Signagen Laboratories; #SL100,835	10 ¹⁰	Suero salino
AAV8-GFP	Signagen Laboratories; #SL100,833	10 ¹⁰	Suero salino
AAV-DIO-p53-EGFP	Vector Builder	10 ¹⁰	Suero salino
AAV-DIO-EGFP	Vector Builder	10 ¹⁰	Suero salino
Ad-p53	Signagen Laboratories; #SL100,777	10 ⁹	Suero salino
Ad-GFP	Signagen Laboratories; #SL100,833	10 ⁹	Suero salino

Tabla 1. Lista de virus inyectados por la vena de la cola de los ratones.

El virus AAV8-Cre-GFP expresa la recombinasa Cre junto con el gen marcador GFP. En el desarrollo de esta tesis, el virus AAV8-Cre-GFP fue inyectado por la vena de la cola de nuestros ratones Floxp53. En estos ratones, los sitios loxP se disponen en parejas flanqueando el segmento de DNA situado entre los exones 2 y 10 del gen p53. Este mecanismo de escisión del gen de interés se basa en la acción de la recombinasa Cre que, cuando se expresa, se une a sus dianas definidas, denominadas sitios *loxP* (*locus crossover (x) in P1*, ya que se caracterizaron en el fago P1, donde Cre provoca la recombinación de estos fragmentos), los corta por la mitad y después une las dos mitades restantes tras haber eliminado el segmento de DNA flanqueado [321]. Con este método, y apoyándonos en la administración de los virus por la vena de la cola, obtenemos ratones en los que vamos a disminuir de forma parcial y específica la expresión de p53 en el hígado. El virus AAV8-GFP, que no expresan los genes para la

recombinasa Cre, se inyecta como control de nuestros experimentos. Se espera un mes tras la inyección de los virus para realizar los experimentos, ya que de esta manera nos aseguramos de que la disminución en la expresión de p53 sea significativa y efectiva.

El virus AAV-DIO (*double floxed gene with inverted orientation*)-p53-EGFP es un virus adeno-asociado cuya actividad es inducible por la acción de la recombinasa Cre [321]. De este modo, inyectados en la vena de la cola de los ratones que expresen la recombinasa Cre bajo la acción del promotor de la albúmina (ratones AlfpCre y ratones Floxp53 AlfpCre), nos permiten manipular los niveles de p53 específicamente en los hepatocitos del hígado de nuestros modelos animales. En el desarrollo de esta tesis, se han empleado los virus AAV-DIO-p53-EGFP para recuperar la expresión de p53 de forma específica en los hepatocitos de los ratones *knock out* condicionales de p53 en el hígado (ratones Floxp53 AlfpCre), y para sobre expresar p53 específicamente en el hígado de ratones con niveles basales de p53 normales (en los ratones AlfpCre). El virus AAV-DIO-EGFP, que expresa GFP como resultado de la actividad de la recombinasa Cre, se inyecta como control de nuestros experimentos.

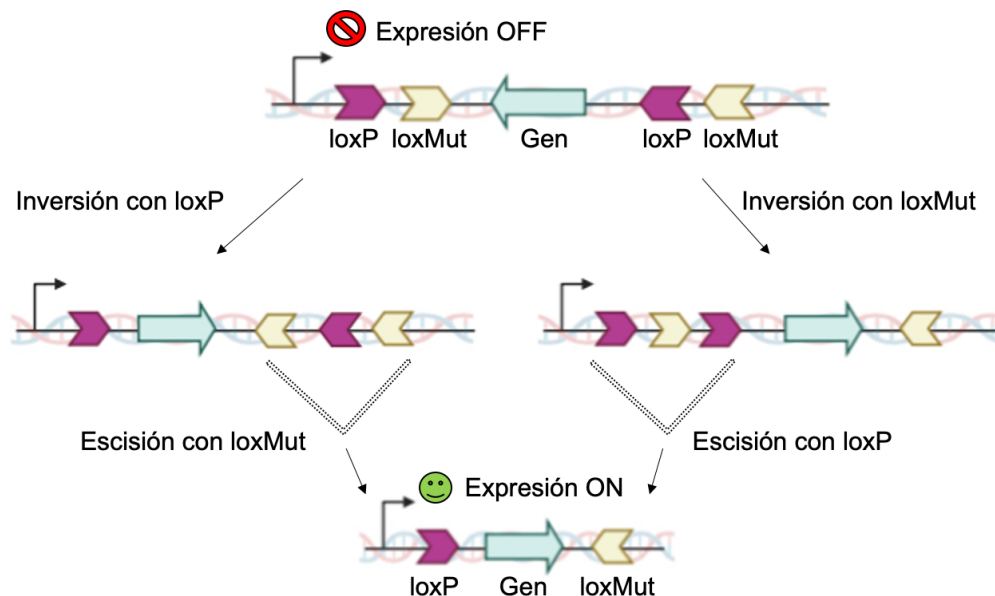


Imagen 10. Representación esquemática de un vector DIO (*Double-floxed gene with Inverted Orientation*) y su funcionamiento. La inversión puede ocurrir tanto con los loxP como con los loxMut, seguido de una escisión de dos sitios lox. El vector DIO permite la expresión del gen solo en presencia de la recombinasa Cre. Imagen de elaboración propia.

El funcionamiento de estos virus DIO se basa de nuevo en la actividad de la recombinasa Cre, y en la dualidad de sus funciones ya que, una vez que reconoce sus lugares de unión lox, antes de escindir el fragmento flanqueado por los mismos, lo que hace es corregir su orientación si este se encuentra invertido, en orientación 3'→5'. Esta capacidad de la recombinasa Cre se explota a la hora de utilizar los virus DIO. En ellos, tal y como se representa en la Imagen 10, la secuencia del gen de interés se encuentra invertida, de modo que no se puede expresar, y está flanqueada por dos sets de sitios lox: un par de secuencias loxP, que es la secuencia silvestre, y un par de secuencias loxMutantes. Los loxMutantes son variantes generadas de loxP, y algunos muy empleados con frecuencia son lox511, lox2272 y lox5171. La recombinasa Cre es capaz de reconocer a las secuencias silvestres y a las mutantes con la misma afinidad, sin embargo, no puede generar recombinación entre las regiones silvestres y las mutantes. De este modo,

como se muestra en la Imagen 10, con los vectores DIO ocurren dos etapas de recombinación: la primera consiste en la inversión de la secuencia flanqueada, usando uno de los sets de regiones lox, que deja dos sitios lox idénticos y con la misma orientación a un lado del gen; y la segunda recombinación produce la escisión de la secuencia intermedia, como se muestra en la Imagen 10. El orden en el que los sitios lox sufren recombinación se produce al azar, pero el producto final siempre es el mismo, con el gen en sentido 5'→3', capaz, de este modo, de ser expresado.

Finalmente, los vectores adenovirus (Ad) permiten la sobre expresión del gen que portan de modo inmediato, con un efecto transitorio de 7 días. En el desarrollo de esta tesis, el Adp53 se ha utilizado para recuperar de forma aguda la expresión hepática de p53 en los ratones Floxp53 previamente inyectados con los virus AAV8-Cre-GFP, así como para sobre expresar p53 en el hígado de ratones WT. El AdGFP fue inyectado como control de nuestros experimentos.

4.1.2.13 Estudio de la sensibilidad a insulina en el hígado.

Para estudiar la vía de señalización de la insulina y la sensibilidad a insulina específicamente en el hígado, se realizó un ensayo de administración de insulina en la vena cava, tras inducir anestesia general a todos los animales. Este procedimiento fue el único que requirió de analgesia y anestesia en el desarrollo de la tesis. La composición de la anestesia fue de 42.5% de ketamina (Imalgene 1000 inyectable, Merial), 20% mg/kg de xilazina (Rompún 2%, Bayer Health Care) y 37.5% de suero salino fisiológico (suero fisiológico isotónico, Physan), a una dosis de 200 µl/100 gramos de masa corporal, administrado por vía IP. La confirmación del estado de anestesia de cada animal se comprobó mediante el reflejo podal y palpebral, siendo su ausencia un indicativo de un estado de anestesia óptimo. Tras la anestesia general de los animales, se realizó una laparotomía para acceder a la vena cava. Dos minutos después de la inyección de la insulina en la vena cava (5 unidades de insulina diluidas en 125 µl de salino), se diseccionó el hígado para su posterior análisis [322].

4.1.2.14 Determinación de la producción hepática de glucosa.

La medición de la producción hepática de glucosa se realizó en ratones conscientes cateterizados. Los catéteres (Instech Laboratories Inc, BTSIL-035) fueron implantados quirúrgicamente, bajo el efecto anestésico del isoflurano, 7 días antes del comienzo del experimento. Los catéteres se insertan en la vena yugular derecha, y se exteriorizan sobre el cuello conectándose con el botón de acceso vascular (Instech Laboratories Inc, VAB62BS/25). Los catéteres se lavan todos los días con suero salino fisiológico heparinizado (NaCl 0.9%, 200 IU/ml de heparina) para la administración de los reactivos. Dado que los animales estaban en restricción calórica y terminaron su ración de comida a las 19:00 horas del día anterior, no fue necesario someterlos a ayuno el día de la perfusión (cuarto día de restricción calórica). Durante la perfusión, los ratones recibieron una infusión de [3-³H]-glucosa (0.05 µCi/min) (Perkin Elmer, Waltham, MA). Se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola (10 µl) a los 90, 100 y 110 minutos, y fueron tratadas con 0.3N ZnSO₄ y 0.3N Ba(OH)₂. Se midió la concentración de glucosa mediante el método de la glucosa oxidasa (GLU, Roche Diagnostics), y las mediciones de [3-³H]-glucosa se realizaron con o sin secado durante la noche para la evaluación del agua tritiada para la determinación de la glucólisis.

El protocolo experimental de la medición de la producción hepática de glucosa fue realizado en colaboración con los Doctores Christelle Veyrat-Durebex y Roberto Coppari,

Department of Cell Physiology and Metabolism, Faculty of Medicine, University of Geneva, 1211 Geneva, Switzerland.

4.1.2.15 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en muestras de hígado.

Para estudiar la interacción entre el factor de transcripción p53 y el promotor de PCK1 *in vivo*, se realizó un ChIP en ratones WT alimentados *ad libitum* o sometidos a restricción calórica del 60%. Para ello, se homogenizaron 5 mg de tejido (previamente congelado en nitrógeno líquido) en hielo y en un homogeneizador Dounce (indicado para conservar los núcleos celulares tras la homogeneización) [KIMBLE Dounce tissue grinder set, Sigma-Aldrich; #D8938, pistilo A (10 veces) y pistilo B (20 veces)] usando 1.5 ml de PBS-P [PBS suplementado con inhibidores de proteasas (Roche; #000000011873580001-Merck)]. Posteriormente, se realizó el *crosslinking* de 1 ml de la suspensión celular añadiendo 100 μ l de una solución fresca de formaldehído al 11% (50 mM de Hepes-KOH, pH 7.5, 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 0.5 mM de EGTA y 11% de formaldehído) en agitación ligera durante 8 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, el *crosslinking* se detiene añadiendo glicina a una concentración final de 0.125 M durante 5 minutos, y la suspensión se centrifuga a 9000 g y 4°C durante 5 minutos. A continuación, se lava con PBS-P 1X, y se vuelve a centrifugar, y el pellet resultante se congela inmediatamente en nitrógeno líquido. El paso siguiente consiste en resuspender dos veces el pellet obtenido en 2 ml de buffer de lisis celular [20 mM Tris-HCl pH 8.0, 85 mM KCl, 0.5% Igepal (Sigma-Aldrich, #I8896) suplementado con 1X de inhibidores de proteasas], se agita intensamente y se deja en hielo durante 10 minutos, transcurridos los cuales se centrifuga a 9000 g durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, el pellet se disgrega en 200 μ l de buffer de lisis nuclear (10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% SDS, suplementado con 1X de inhibidor de proteasas) utilizando el homogeneizador Dounce (pistilo B, 20 veces). Una vez realizado este procedimiento, se deja en hielo durante 10 minutos, y después se agita intensamente y se congela en nitrógeno líquido.

Una vez realizado el procedimiento anteriormente descrito, se toman 200 μ l del extracto nuclear y se diluyen con 800 μ l de TE, y 500 μ l del mix resultante se sonicar en el sonicador Bioruptor™ Plus (Diagenode) en 30 ciclos (ciclos de sonicación: 30 segundos ON, 30 segundos OFF), y después se centrifugan a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante contiene la cromatina, y este se guarda a -80°C hasta su posterior uso. Para evaluar la eficiencia del *crosslinking*, se toman 25 μ l del sobrenadante que contiene la cromatina, y se deja a 65°C toda la noche en una disolución de buffer de elución (50mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM de EDTA, 1% de SDS) y NaCl 0.2 M. Al día siguiente se añaden a la disolución 250 μ l de TE y RNase A (0.2 mg/ml), y se incuba a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, se añade proteinasa K (0.2 μ l/ml) y se incuba a 56°C durante 2 horas. El DNA eluido se purifica usando un kit de purificación (Quiagen QIAquick PCR purification kit; #28104), y se evalúa la fragmentación de la cromatina (100 ng – 500 ng) en un gel de agarosa del 1%.

La inmunoprecipitación de la cromatina se lleva a cabo utilizando el Kit de Inmunoprecipitación de la Cromatina Magna ChIP A/G (Merck; #17-10085) siguiendo las instrucciones del fabricante. De este modo, las muestras se inmunoprecipitan con 5 μ l de anti-p53 (1C12) (Cell Signaling Technology; #2524), incubando con el anticuerpo durante toda la noche a 4°C. Seguidamente, las muestras se lavan una vez con el buffer LiCl y con el buffer TE con bajo contenido en sal y con alto contenido en sal, y el DNA eluido se purifica usando un Kit de purificación de PCR (Qiagen). El DNA inmunoprecipitado se amplifica por PCR, y la abundancia del DNA diana (en esta tesis el promotor de PCK1) se calcula como el porcentaje respecto a input. Los primers utilizados para amplificar la región del promotor de PCK1 fueron

los siguientes: Forward (CAACAGGCAGGGTCAAAGT) y Reverse (GCACGGTTTGGAAGTACTGACTT).

El protocolo experimental del ChIP en muestras de hígado de ratón fue realizado en colaboración con los Doctores Ashwin Woodhoo y Marta Varela, Center for Cooperative Research in Biosciences (CIC bioGUNE, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Bizkaia Technology Park, Spain).

4.1.2.16 Análisis histológico del tejido hepático.

En la realización de esta tesis, se realizaron tinciones histológicas para estudiar el posible efecto de la manipulación específica de p53 en el hígado. Una vez obtenidas las tinciones, se observaron y fotografiaron los cortes histológicos con un microscopio (Zeiss) utilizando los objetivos de 10, 20 y 40 aumentos. Se analizaron al menos 8 animales por grupo experimental, y se tomaron 3 fotografías por muestra.

- Hematoxilina/eosina: para realizar esta tinción, el tejido previamente fijado con formalina se incluye en parafina para ser seccionado en un micrótopo. Los cortes de parafina se tratan con xilol para eliminar los excesos de la misma. A continuación, los cortes se pasan por un proceso de rehidratación, consistente en alcoholes de concentración decreciente (100, 95 y 70°). Tras un lavado con H₂O destilada, se sumergen en hematoxilina (Bio Óptica) durante 10 minutos, se lavan e inmediatamente de pasar por un alcohol ácido. Tras el lavado, se sumergen 30 segundos en eosina (Bio Óptica). Para deshidratar la muestra, los cortes se pasan por los mismos alcoholes en graduación creciente y, antes de montar, se dejan sumergidos 10 minutos en xilol. Los portaobjetos se montan en medio de montaje acuoso. Esta técnica nos permite visualizar la estructura general del tejido y, dado que la hematoxilina es de naturaleza catiónica (básica), tiñe de azul las estructuras basófilas (ácidas) como los núcleos celulares; y la eosina, que es de naturaleza ácida, tiñe de rosa las estructuras de naturaleza básica, como el citoplasma.
- Inmunohistoquímica: esta técnica nos permite detectar en el propio tejido la presencia y localización de determinadas proteínas. En el desarrollo de este proyecto de investigación, se utilizó la inmunohistoquímica para el estudio y determinación del estado del ciclo celular y el daño celular que pudiese ocasionar la delección de p53 específicamente en el hígado. Para ello se estudiaron los niveles de CC3 (*cleaved caspase 3*) y ki67.

4.1.2.17 Sacrificio, recogida de tejidos y muestras.

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

4.2 CULTIVOS CELULARES.

4.2.1 THLE-2 (Transformed Human Liver Epithelial-2).

Las células THLE-2 se obtuvieron de ATCC (*The Global Bioresource Center*; CRL-2706). Se trata de una línea celular humana que muestra las características fenotípicas de las células epiteliales de un hígado adulto normal (las células epiteliales son las mayoritarias en el hígado, y entre las cuales los hepatocitos constituyen la fracción más importante). Las THLE-2 derivan de un cultivo primario de hepatocitos procedente del lóbulo izquierdo de un paciente adulto (en el que no se encontraron evidencias de tumor), y posteriormente infectadas con el antígeno T largo del SV40 (*Simian virus 40*) [323].

El medio de cultivo empleado para el mantenimiento de estas células fue BEGM (*Bronchial Epithelial cell Basal Medium*), de la casa comercial Lonza. Es necesario suplementar este medio basal con unos aditivos del Bullekit (Lonza/Clonecites Corporation, BEGM Bullekit; CC-3170), y 70 ng/ml de fosfoetanolamina (Sigma-Aldrich; P05039), 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 10% de suero bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*) (Gibco; #1027016) y un 1% de la solución Glutamina-Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich; #A4503). Las THLE-2 se mantienen en condiciones de 5% de CO₂ a 37°C. En la rutina de mantenimiento de la línea celular, las THLE-2 se pasan a nuevas placas cuando alcanzan la confluencia del 70-80%, diluyéndose en proporción 1:4, lo que equivale a 5x10000 células/cm², usando tripsina/EDTA al 0.25%. Para sembrar las células es necesario realizar un tratamiento previo en las placas, para conseguir una mejor adherencia celular. Para ello se aplica un recubrimiento en las placas que consta de una mezcla de 0.01 mg/ml de fibronectina (Gibco; #33010-018), 0.03 mg/ml de colágeno tipo I (Santa Cruz Biotechnology, #sc-136157) y 0.01 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA, *bovine serum albumin*) (Sigma-Aldrich; A4503) disuelto en medio basal.

Para la realización de todos los experimentos se sembraron 1.5 x 10⁵ células en cada pocillo de una placa de cultivo celular Multiwell™ de 6 pocillos (Fisher Scientific). El mantenimiento, congelación/descongelación, y contaje celular se realizaron siguiendo el procedimiento estándar de cultivo celular. Fueron testadas semanalmente para detectar la posible presencia de micoplasma.

4.2.2 Hep3B.

Las células Hep3B se obtuvieron de ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Sigma; #86062703). Se trata de una línea celular humana obtenida de un hepatocarcinoma de un varón de los Estados Unidos de 8 años de edad [324]. Esta línea celular se caracteriza porque carece de la expresión de p53 [325, 326]. Las células Hep3B se mantienen con medio EMEM (*Minimum Essential Medium Eagle*) (Sigma-Aldrich; #M2279) suplementado con FBS al 10%, un 1% de la solución Glutamina-Penicilina-Estreptomicina y un 1% de amino ácidos no esenciales (Sigma-Aldrich; #M7145). Las Hep3B se mantienen en condiciones de 5% de CO₂ a 37°C. En la rutina de mantenimiento de la línea celular, las Hep3B se pasan a nuevas placas cuando alcanzan la confluencia del 70-80%, diluyéndose en proporción 1:4, lo que equivale a 5x10000 células/cm², usando tripsina/EDTA al 0.25%.

Para la realización de todos los experimentos se sembraron 3 x 10⁵ células en cada pocillo de una placa de cultivo celular Multiwell™ de 6 pocillos (Fisher Scientific). El mantenimiento, congelación/descongelación, y contaje celular se realizaron siguiendo el procedimiento estándar de cultivo celular. Fueron testadas semanalmente para detectar la posible presencia de micoplasma.

4.3 TRATAMIENTOS CELULARES.

4.3.1 Transfecciones transitorias.

Para el estudio del efecto de p53 en el metabolismo de la glucosa en hepatocitos, utilizamos dos tipos de aproximaciones: sobre expresión del gen p53, PCK1 y pp53S149A con plásmido, y silenciamiento de p53 y PCK1 con ARN interferente (siRNA, *small-interfering RNA*).

4.3.1.1 Silenciamiento de p53 y PCK1 en las células THLE-2.

Para silenciar la expresión del gen p53 en las células THLE-2, las células fueron transfectadas con un siRNA específico para p53 (sip53) [Dharmacon; SMARTpool: ON-TARGET plus Human TP53 (7157) siRNA #L-003329-00-0020] o un siRNA específico para PCK1 (Dharmacon; SMARTpool: ON-TARGETplus PCK1 siRNA #L-006796-00-0005). Como control negativo se utilizó un *non-targeting* siRNA (si0) (Dharmacon; #D-001810-10-05). Para realizar la transfección, se empleó DharmaFECT (Dharmacon; #T-2001-03) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. De este modo, se sembraron 1.5×10^5 en placas de 6 pocillos, y tras 24 horas en cultivo se procedió a la transfección siguiendo el siguiente protocolo: se mezclaron 50 pmol de sip53 diluidos en 200 μ l de Opti-MEM (Life Technologies; #31985-070) con 6.5 μ l de DharmaFECT diluido en 193.5 μ l de Opti-MEM. Esta mezcla se añade posteriormente a cada pocillo, completando con el medio BEGM hasta un volumen final de 1.5 ml por pocillo. Transcurridas 6 horas, se reemplaza el medio de las células por medio BEGM fresco, hasta que se realicen los experimentos o tratamientos, 48 horas después del inicio de la transfección con los siRNAs.

4.3.1.2 Sobre expresión de p53, PCK1 y pA149S en las células THLE-2.

Para sobre expresar el gen p53 en las células THLE-2, las células fueron transfectadas con el plásmido pCMV-Neo-Bam-p53-wt (pp53) (Addgene; plasmid #16434), y para sobre expresar PCK1 se empleó el plásmido pCMV6-(Myc-DDK-tagged)-Human phosphoenolpyruvate-carboxykinase1 (Origene; plasmid #RC204758). Para sobre expresar la versión de p53 con la serina 149 mutada a alanina, se empleó el plásmido pA149S, amablemente cedido por Jin Won Cho, quien fue el primero en generarlo y describir que p53 se O-GlcNAcila en esa posición [227]. Como control negativo se utilizó el plásmido pCMV-Neo-Bam (p0) (Addgene; plasmid #16440). Para realizar la transfección se empleó Lipofectamine 2000 (Invitrogen; #11668-019) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. De este modo, se sembraron 1.5×10^5 en placas de 6 pocillos, y tras 24 horas en cultivo se procedió a la transfección siguiendo el siguiente protocolo: se mezclaron 4 μ l de Lipofectamine 2000 diluidos en 150 μ l de Opti-MEM con 2.5 μ g de DNA de plásmido diluidos en 150 μ l de Opti-MEM. Esta mezcla se añade posteriormente a cada pocillo, completando con el medio BEGM hasta un volumen final de 1.5 ml por pocillo. Transcurridas 6 horas, se reemplaza el medio de las células por medio BEGM fresco, hasta que se realicen los experimentos o tratamientos, 24 horas después de inicio de la transfección con los plásmidos.

4.3.1.3 Sobre expresión de p53 y pA149S en las células Hep3B.

Para recuperar la expresión del gen p53 en las células Hep3B, las células fueron transfectadas con el plásmido pCMV-Neo-Bam-p53-wt (pp53) o con el plásmido pA149S. Como control negativo se utilizó el plásmido pCMV-Neo-Bam (p0). Para realizar la

transfección, se empleó Lipofectamine 2000 siguiendo las indicaciones de la casa comercial. De este modo, se sembraron 3×10^5 en placas de 6 pocillos, y tras 24 horas en cultivo se procedió a la transfección siguiendo el siguiente protocolo: se mezclaron 8 μ l de Lipofectamine 2000 diluidos en 150 μ l de Opti-MEM con 8 μ g de DNA de plásmido diluidos en 150 μ l de Opti-MEM. Esta mezcla se añade posteriormente a cada pocillo, completando con el medio EMEM hasta un volumen final de 1.5 ml por pocillo. Transcurridas 6 horas, se reemplaza el medio de las células por medio EMEM fresco, hasta que se realicen los experimentos tratamientos, 24 horas después de inicio de la transfección con los plásmidos.

4.3.2 Efecto del estado nutricional.

En todos los experimentos en los que las células THLE-2 o Hep3B fueron sometidas a ayuno, se utilizó el *buffer* Krebs-Henseleit-HEPES (KHH), compuesto por: NaCl 120 mmol/l, KCl 4.7 mmol/l, CaCl₂ 2.5 mmol/l, MgSO₄ 1.2 mmol/l, KH₂PO₄ 1.2 mmol/l, NaHCO₃ 25 mmol/l, HEPES pH 7.4 25 mmol/l). El KHH constituye un medio de ayuno muy relevante para el estudio de la gluconeogénesis [327, 328], y no contiene nutrientes ni hormonas.

Para estudiar el efecto de la glucosa en la regulación de los niveles de proteína de p53 *in vitro*, las células THLE-2 fueron incubadas en medio KHH durante 6 horas, en presencia o ausencia de glucosa (D-glucose, Sigma Aldrich; #G8270) 1 mM o 10 mM [329].

4.3.3 Estudio de la O-GlcNacilación de p53.

Para estudiar el efecto de la O-GlcNacilación en p53, las células THLE-2 se trataron con PUGNAc (Sigma Aldrich; #A7229) o con OSMI-1 (Sigma Aldrich; #SML1621). PUGNAc es un inhibidor de OGA [330], la enzima que hidroliza el O-GlcNAc de las proteínas O-GlcNAcizadas, por lo que incrementa la O-GlcNAcización de las proteínas. El PUGNAc, soluble en DMSO (35 mg/ml), fue añadido al medio celular durante 6 horas, en dosis de 5, 25 y 75 μ M [331]. En los sucesivos experimentos, se utilizó la dosis de 75 μ M. El grupo control recibió el DMSO vehículo disuelto en salino. OSMI-1 es un inhibidor de OGT [332], la enzima que cataliza la adición de un O-GlcNAc a un residuo de serina o treonina de las proteínas sustrato, mediante un enlace O-glicosídico, o a un residuo de cisteína mediante un enlace S-glucosídico. El OSMI-1, soluble en DMSO (20 mg/ml), fue añadido al medio celular durante 6 horas, en dosis de 10, 40 y 100 μ M [332]. En los sucesivos experimentos se utilizó la dosis de 100 μ M. El grupo control recibió el DMSO vehículo disuelto en salino.

4.3.4 Estudio del efecto de las principales hormonas glucorreguladoras.

Para estudiar el efecto del glucagón en la regulación de los niveles de proteína de p53 *in vitro*, las células se mantuvieron en medio KHH y se trataron con glucagón (Sigma Aldrich; #G1774) durante 6 horas. El glucagón, disuelto en salino, se administró a dosis de 0.1, 10 y 25 nM [333]. En los sucesivos experimentos, se utilizó la dosis de 10 nM. Las células también fueron tratadas con forskolina (Santa Cruz Biotechnology; #sc-3562), que es un activador de AMPc [334], y mimetiza los efectos del glucagón al activar su ruta molecular. La forskolina, soluble en DMSO (5 mg/ml), se administró a una dosis de 2 μ M en medio completo durante 30 minutos. El grupo control recibió el DMSO vehículo disuelto en salino.

Para estudiar el efecto de la adrenalina en la regulación de p53 *in vitro*, las células se mantuvieron en medio KHH y se trataron con L-adrenaline (Thermofisher; #L04911), disuelta

en salino, a concentraciones de 1, 10 y 20 μM [335] durante 6 horas. En los sucesivos experimentos se utilizó la dosis de 10 μM .

Para el estudio del efecto del cortisol en la regulación de los niveles de proteína y la actividad de p53, las células se mantuvieron en medio KHH y se trataron con una solución de hidrocortisona (Sigma Aldrich; #H6909). La hidrocortisona, disuelta en salino, se administró al medio celular a dosis de 0.1, 1 y 10 μM [336] durante 6 horas. En los sucesivos experimentos se utilizó la dosis de 1 μM .

Para estudiar el efecto regulatorio de la insulina *in vitro*, las células fueron tratadas con insulina en una dosis de 1 y 10 nM [337] durante 6 horas. En los sucesivos experimentos se utilizó la dosis de 10 nM. Las células también fueron tratadas con SC79 Akt Activator II (Merk Millipore; #123871), que es un activador de Akt [338], y mimetiza los efectos inhibitorios de la insulina sobre la gluconeogénesis [339]. El SC79 Akt Activator II, soluble en DMSO (50 mg/ml), se administró al medio celular en una dosis de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ [340] durante 6 horas. El grupo control recibió el DMSO vehículo disuelto en salino.

4.3.5 Medición de la glucosa en medio.

Para evaluar la producción hepática de glucosa *in vitro*, las células fueron incubadas en medio KHH suplementado con lactato 20 mM y piruvato 2 mM [341-343], al que se denominó “medio de producción de glucosa”. Las células se mantuvieron 6 horas en medio de producción de glucosa para realizar los ensayos donde se inhibió PCK1; y donde se sobre expresó p53, en ausencia o presencia de insulina; y se mantuvieron 30 minutos en medio de producción de glucosa para realizar los ensayos con forskolina. La cantidad de glucosa producida por los hepatocitos y liberada al medio extracelular, se cuantificó utilizando el High Sensitivity Glucose Assay Kit (Sigma Aldrich; #MAK181-1KT). Se trata de un kit fluorimético muy sensible, capaz de detectar cantidades de glucosa en un rango de 20-100 pmol/pocillo. En la realización de este ensayo, se añadió 1 ml de medio de producción de glucosa (suplementado o no con insulina o forskolina) a cada pocillo de una placa de 6 pocillos, donde las células se sembraron siguiendo el proceso habitual. La adición de 1 ml de medio, en lugar del 1.5 ml habitual, facilita la concentración de la glucosa producida por las células hepáticas, y su posterior determinación. Posteriormente, se realiza el protocolo siguiendo las instrucciones del fabricante, cargando 50 μl de medio por muestra, y por duplicado, en una placa de 96 pocillos, para su posterior análisis. La concentración de glucosa de cada muestra se determina mediante un ensayo enzimático acoplado, que da como resultado un producto fluorimétrico ($\lambda_{\text{ex}} = 535/\lambda_{\text{em}} = 587 \text{ nm}$) proporcional a la glucosa presente. Finalmente, los resultados se normalizan por la cantidad de proteína del lisado celular [313].

4.3.6 Medición del contenido celular de oxaloacetato.

Las células se incubaron en medio completo o medio KHH durante 6 horas, y posteriormente se determinó el contenido intracelular de oxaloacetato utilizando el Oxaloacetate Assay Kit (Sigma Aldrich; #MAK070-1KT), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trata de un kit que puede realizar la determinación fluorimétrica ($\lambda_{\text{ex}} = 535/\lambda_{\text{em}} = 587 \text{ nm}$) del producto resultante de un ensayo enzimático acoplado, proporcional a la cantidad de oxaloacetato presente en la muestra [344]. Las muestras celulares se homogenizaron con 100 μl del OAA Assay Buffer, y se mantuvieron 10 minutos en hielo. Después de centrifugar las muestras a 10000 g a 4°C durante 10 minutos, se recogió el sobrenadante y se determinó la

cantidad de proteína y la cantidad de oxaloacetato por separado. Los resultados se normalizaron por la cantidad de proteína del lisado celular.

4.3.7 Determinación de la actividad enzimática de PCK1.

La actividad enzimática de PCK1 es proporcional a la cantidad de proteína de PCK1 presente en la muestra. La actividad de PCK1 se determinó utilizando el Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Activity Assay Kit (BioVision; #K359-100), siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, las muestras celulares se homogenizaron con 200 μ l del Assay Buffer, y se mantuvieron 10 minutos en hielo. Después de centrifugar las muestras a 10000 g a 4°C durante 10 minutos, se recogió el sobrenadante y se determinó la cantidad de proteína y la actividad enzimática por separado. En este kit, la PCK se combina con un conjunto de enzimas que convierten el PEP y el carbonato en una serie de intermediarios y peróxido de hidrógeno, que a su vez, reacciona con una sonda y se convierte generando una señal colorimétrica (OD: 570 nm), que es proporcional a la cantidad de PCK activo presente en las muestras. Los resultados se normalizaron por la cantidad de proteína total del lisado celular.

4.3.8 Inmunoprecipitación de p53.

La inmunoprecipitación de p53 en células THLE-2 se realizó utilizando el Pierce™ Direct IP Kit (ThermoFisher Scientific; #26148). Este método permite realizar un *crosslink* entre el anticuerpo primario y la resina, y al inmovilizar el anticuerpo primario, el antígeno queda libre de las cadenas desnaturalizadas del anticuerpo, lo que resulta de especial importancia, ya que las cadenas pesadas del anticuerpo primario coinciden en el peso molecular con p53 cuando se realiza el análisis por *western blot*. En la realización del protocolo, se siguieron las indicaciones del fabricante, en relación a las cuales 5 μ g de anticuerpo primario contra p53 humano (DO-1) (Santa Cruz Biotechnology; #sc-126) se acoplaron químicamente a la resina AminoLink durante 120 minutos. Se utilizó un tubo adicional en el que se acopló a la resina el control isotópico apropiado para el anticuerpo primario (normal mouse IgG_{2a}, Santa Cruz Biotechnology; sc-3878). Posteriormente, se añadieron 750 μ g del lisado de THLE-2, pretratado con buffer de lisis suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas y PUGNAc 1 μ M, para impedir la pérdida de la modificación postraduccional durante el proceso de extracción de proteína [231]. Los extractos de proteína se incubaron con el complejo anticuerpo-resina durante toda la noche, a 4°C y rotando suavemente, para permitir la unión del antígeno con el anticuerpo inmovilizado. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se lavaron con las soluciones proporcionadas en el Pierce™ Direct IP Kit, hasta ser finalmente eluidas en un volumen de 40 μ l con el tampón de elución, en un tubo de recolección con una cantidad adecuada de Tris 1M y pH 9.5 para neutralizar el pH y evitar la degradación del antígeno. Finalmente, las muestras se prepararon para ser analizadas por *western blot* siguiendo el procedimiento habitual. La membrana se incubó en primer lugar con el anticuerpo para la modificación de la O-GlcNAcilación Anti-O-Linked N-Acetylglucosamine primary antibody [RL2] (Abcam; #ab2739). Posteriormente, se realizó un protocolo de *stripping* de la membrana y se incubó con el anticuerpo para detectar p53 (Cell Signalling; #9282). Los métodos para la realización del *western blot* y del *stripping* se detallan con detalle en el apartado dedicado a explicar la técnica del *western blot*.

4.3.9 Ensayo de la actividad luciferasa.

El ensayo de la actividad luciferasa se realizó en las células Hep3B. Para llevarlo a cabo, las células se sembraron en placas multipocillo de 6 pocillos, y se transfectaron durante 48 horas con 6 μ l del agente de transfección jetPRIME Polyplus (PolyPlusTransfection, Illkirch); 2 μ g del plásmido pp53 o su plásmido control p0; 1 μ g de cada uno de los plásmidos indicadores de actividad luciferasa, el plásmido pADTrack-1330-pck1, pADTrack-490-pck1 (que contienen, respectivamente, los -1300 y los -490 pares de bases de la región del promotor de PCK1) o su plásmido control pADTrack; y 50 ng de pRL-TK-Renilla, como control de la transfección. Las células se lisaron en 200 μ l de tampón de lisis (Promega Corporation, WI), y la actividad luciferasa se midió empleando el lector de luminiscencia Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad).

El protocolo experimental del ensayo de la actividad luciferasa en las células Hep3B fue realizado en colaboración con los Doctores Román Pérez y Samuel Seoane, del grupo Endocrine Oncology, CIMUS, Universidade de Santiago de Compostela, España.

4.3.10 Inmunoprecipitación de la cromatina *in vitro*.

El ensayo de la inmunoprecipitación de la cromatina *in vitro* se realizó en las células Hep3B. Para la realización del mismo, se siguió el protocolo de Upstate [345]. Se sembraron 1.5×10^7 células en placas de 100 mm, y se transfectaron con el plásmido pp53, o su control p0, como se describió anteriormente. Transcurridas 24 horas desde la transfección, se realizó el *crosslinking* añadiendo formaldehído a una concentración final del 1%, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS frío (con inhibidores de proteasas: 1 mM PMSF, 1 μ g/ml apoprotinina, y 1 μ g/ml pepstatina A), y se recogieron las células con un *scraper*, para centrifugarlas durante 4 minutos a 4°C a 2000 rpm. El pellet, constituido por las células, se lavó con PBS y se resuspendió en el tampón de lisis del ChIP (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) con los inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 1 μ g/ml apoprotinina, y 1 μ g/ml pepstatina A). Después de incubar durante 10 minutos en hielo, las muestras de las células se sonicán hasta obtener fragmentos de ADN de un tamaño comprendido entre los 200 y los 1000 pares de bases.

Las fracciones de cromatina se inmunoprecipitaron con 1 μ g de anticuerpo anti-p53 (Cell Signaling; #9282) o el anticuerpo anti-inmoglobulina G humana (IgG) como control (Sigma-Aldrich; #AP309P). El *crosslink* entre el ADN y las histonas se revierte mediante la incubación a 65°C durante 4 horas. Finalmente, se realizó una PCR para analizar los fragmentos de ADN obtenidos en el ensayo de la inmunoprecipitación de la cromatina. El protocolo de la PCR utilizado consistió en 1 minuto a 95, 58 y 72°C en cada ciclo, con un total de 35 ciclos. Los *primers* utilizados para amplificar el ADN se recogen en la siguiente tabla (Tabla 2) y diagrama (Imagen 11):

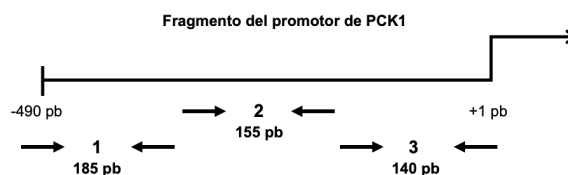


Imagen 11. Representación esquemática del fragmento del promotor de PCK1 analizado en el ChIP y las regiones amplificadas.

Nombre	Secuencia de los primers 5'→3'
Región 1: Forward (-477/-457 pb) Reverse (-312/-292 pb) Producto de PCR obtenido de 185 pb	FW: TGGCTCAGAGCTGAATTTCC RV: GCAGGCTCTTGCCTTAATTG
Región 2: Forward (-280/-260 pb) Reverse (-145/-125 pb) Producto de PCR obtenido de 155 pb	FW: CAACAGGCAGGGTCAAAGTT RV: GCACGGTTTGGAACTGACTT
Región 3: Forward (-122/-107 pb) Reverse (-1/+18 pb) Producto de PCR obtenido de 140 pb	FW: CCATGGCTATGATCCAAAGG RV: CAGAGGGAAGGCCAACTGT

Tabla 2. Relación de primers utilizados para amplificar las tres regiones en las que se subdividió el fragmento del promotor de PCK1.

El protocolo experimental la inmunoprecipitación de la cromatina *in vitro* fue realizado en colaboración con los Doctores Román Pérez y Samuel Seoane, del grupo Endocrine Oncology, CIMUS, Universidade de Santiago de Compostela, España.

4.4 MUESTRAS DE HÍGADO DE PACIENTES HUMANOS.

Todo el proceso de investigación con muestras de pacientes humanos se llevó a cabo con conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki, revisada en 2013, y aprobada por el Comité Ético del Hospital responsable de la investigación (protocolo 2017.104). Se obtuvo el consentimiento por escrito de todos los participantes. Las muestras de hígado de pacientes humanos se obtuvieron de pacientes con obesidad mórbida sometidos a cirugía bariátrica (n=60) en la Clínica Universidad de Navarra. Se definió la obesidad como IMC (índice de masa corporal) ≥ 30 kg/m² y un porcentaje de grasa corporal $\geq 35\%$. El IMC se calculó como el peso en kilogramos dividido por la altura al cuadrado en metros, y el porcentaje de grasa corporal se estimó por el método de la pletismografía por desplazamiento de aire (Bod-Pod®, Life Measurements, Concord, CA, USA). Los pacientes con obesidad fueron clasificados en dos grupos, normoglucémicos (NG) o diabéticos tipo 2 (DT2), siguiendo el criterio del Comité de Expertos en Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes [346]. Los criterios de inclusión abarcaron una evaluación diagnóstica completa, que incluyó un examen físico, investigación en el laboratorio, ecografía por ultrasonido y biopsia hepática consistente con el diagnóstico de enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) por un patólogo experto, siguiendo los criterios de Kleiner y Brunt [347]. Los criterios de exclusión fueron: a) consumo de alcohol excesivo (≥ 20 gramos para mujeres y ≥ 30 gramos para hombres); b) la presencia del antígeno

de superficie del virus de la hepatitis B o la presencia de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C en pacientes con ausencia de antecedentes de vacunación; c) uso de drogas relacionadas con la EHGNA, donde se incluyen la amiodarona, valproato, tamoxifeno, metotrexato, corticosteroides o antiretrovirales; d) evidencia de otras enfermedades hepáticas específicas, como la hepatitis autoinmune, hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, o la deficiencia de α -1 antitripsina. Los pacientes con diabetes tipo 2 no estaban en tratamiento con insulina u otros fármacos que pudiesen influir en los niveles endógenos de insulina. Cabe destacar que los pacientes con diabetes tipo 2 no presentaban un diagnóstico de diabetes superior a los 3 años previos (menos de 2-3 años de diagnóstico, e incluso diagnóstico *de novo*, como se evidencia por sus anamnesis y determinaciones bioquímicas).

Los datos recopilados incluyen información demográfica (edad, sexo y etnia), medidas antropométricas, historial sobre alcoholismo y tabaquismo y otras condiciones médicas o fármacos utilizados.

Las muestras de tejido hepático de pacientes humanos fueron cedidas por las doctoras Amaia Rodríguez y Gema Fruhbeck, Metabolic Research Laboratory, Clínica Universidad de Navarra and IdiSNA, Pamplona, Spain. Las Doctoras Rodríguez y Fruhbeck también supervisaron y colaboraron con el análisis estadístico de los resultados.

4.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS.

4.5.1 Detección de metabolitos en suero.

La detección en suero de ácidos grasos libres (WAKO; #424-91795) y cuerpos cetónicos (WAKO, #413-73601 y #415-73301) de ratones alimentados *ad libitum* o sometidos a restricción calórica del 60%, se llevó a cabo mediante kits comerciales específicos siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

4.5.2 Análisis de la expresión de genes mediante PCR a tiempo real.

El proceso para la determinación de los niveles de expresión génica se realizó a través de la medición de los niveles de ARNm presentes en muestras de tejido congelado (-80) o extracto celular. Para ello se utilizó 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 señalar que la H₂O que se utiliza en este protocolo debe ser pretratada a 37°C en agitación durante una hora con dietilpirocarbonato 0.1% (DEPC). Posteriormente, para desactivar los restos del DEPC se autoclava la mezcla.

4.5.2.1 Extracción del ARN.

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

Se toma un pequeño fragmento de cada muestra de tejido congelado (-80°C), y se homogeniza mecánicamente con 650 μ l de Trizol durante 3 minutos en un homogeneizador

(Tissue Lyser, Quiagen), con ayuda de una bola de acero añadida a cada tubo de polipropileno de 2 ml. A continuación, se centrifuga durante 10 minutos a 13200 rpm, y se transfiere todo el homogeneizado a un nuevo tubo de 1.5 ml. A continuación, se procede al aislamiento del ARN, para lo cual se siguen los pasos que se describen a continuación:

- Se añaden 250 μl de cloroformo y se agita vigorosamente.
- Se deja reposar las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugan las muestras durante 15 minutos a 4°C. Esta centrifugación nos permitirá separar una interfase acuosa (ARN), una fase orgánica (lípidos y proteínas) y una fase donde se queda el ADN. Se toma la fase que contiene el ARN y se pasa a un nuevo tubo.
- Se añaden 3 volúmenes más de isopropanol, para favorecer la precipitación del ARN. Se agita vigorosamente y se deja 10 minutos a -20°C.
- Se centrifuga durante 10 minutos a 4°C a 13200 rpm.

Una vez eliminado el sobrenadante, se lava el precipitado de ARN añadiendo 1 ml 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, y por último se resuspende el precipitado en agua DEPC (300 μl en muestras de hígado, y 10-20 μl en cultivos celulares), y se calienta a 60°C durante 3 minutos para facilitar su disolución.

4.5.2.2 Cuantificación de ARN.

Para determinar la concentración y la pureza del ARN, se emplea un espectrofotómetro de gota en pedestal (NanoDrop 2000), que determina el cociente de absorbancia del ARN (260 nm) y el 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: 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A partir de estas muestras se realizará la retrotranscripción.

4.5.2.3 Retrotranscripción.

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

Reactivo	Casa comercial	Volumen (μl)
H ₂ O DEPC	--	5.08
Tampón de reversotranscripción (5X first strand buffer)	Invitrogen	6
Mezcla de dNTPs 100 mM (dTTP, dCTP, dGTP, dATP)	Invitrogen	6
MgCl ₂ 50 mM	Invitrogen	1.5
Cebadores aleatorios (Random primers 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Invitrogen	0.17
Inhibidor de RNAsas (RNAsa OUT™ 40 U/ μl)	Invitrogen	0.25
Reverso transcriptasa (M-MLV 200 U/ μl)	Invitrogen	1
Muestra de ARN 10 μl		

Tabla 3. Cantidad de reactivos para la reacción de reversotranscripción (RT).

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

4.5.2.4 PCR en tiempo real.

Una vez obtenido el ADN complementario, se determinan 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 expresan 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 (amplificación) en cada ciclo, utilizando la fluorescencia. En esta tesis se utilizó el método del SYBR Green para la detección de los productos de PCR.

El método de SYBR Green 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 esta aumenta de forma proporcional al producto de PCR. La mezcla de PCR para realizar el SYBR Green se muestra en la siguiente tabla; calculándose para un volumen final de 12 μl por pocillo.

Reactivo	Casa comercial	Volumen (μl)
H ₂ O	--	3.1
Master mix	Agilent	6
Dye (1:500)	Agilent	0.18
Cebador directo 10 μM	EurofinsDNA	0.36
Cebador inverso 10 μM	EurofinsDNA	0.36
Muestra de ADNc 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$		

Tabla 4. Cantidad de reactivos para la PCR tiempo real utilizando el método de SYBR Green.

El protocolo utilizado para la amplificación consistió en un paso inicial de 3 minutos a 95°C, 40 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). La relación de los *primers* utilizados en esta tesis se recogen en la siguiente tabla:

Nombre	Secuencia de los primers 5'→3'
p53 <i>Homo sapiens</i>	FW: GTTCCGAGAGCTGAATGAGG RV: TCTGAGTCAGGCCCTTCTGT
PCK1 <i>Homo sapiens</i>	FW: CATGATGGAGCTTTTCAGCA RV: GAACACTTGCCCTCTCTTGC
OGT <i>Homo sapiens</i>	FW: CATCGAGAATATCAGGCAGGAG RV: CCTTCGACACTGGAAGTGTATAG
MGEA 5 (OGA) <i>Homo sapiens</i>	FW: TTCACTGAAGGCTAATGGCTCCCG RV: ATGTCACAGGCTCCGACCAAGT
GFAT1 (GFPT1) <i>Homo sapiens</i>	FW: CGGGAAAGTCAAGATACCAGC RV: CGTACACCAATCAACAGAGGG
GFAT2 (GFPT2) <i>Homo sapiens</i>	FW: GATACAGAGACCATCGCCAAG RV: GACACTCTTGAAAACCAGCG
HPRT <i>Homo sapiens</i>	FW: ACCCCACGAAGTGTGGATA RV: AAGCAGATGGCCACAGAACT
p53 <i>Mus musculus</i>	FW: CCTGTGCAGTTGTGGGTCAG RV: GCTCTCTTTGCGCTCCCTG
PCK1 <i>Mus musculus</i>	FW: CACCATCACCTCCTGGAAGA RV: GGGTGCAGAATCTCGAGTTG
HPRT <i>Mus musculus</i>	FW: AAGCTTGCTGGTGAAGGA RV: TTGCGCTCATCTTAGGCTTT

Tabla 5. Listado de primers y secuencias utilizados para la PCR tiempo real utilizando el método de SYBR Green.

4.5.3 Análisis de la expresión mediante *western blot*.

4.5.3.1 Extracción de proteína.

De las muestras de tejido conservadas a -80°C , se obtiene una pequeña porción para su procesamiento. Las muestras deben mantenerse en hielo durante todo el proceso, 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 homogenizan en el *Tissue lyser* durante 4 minutos a 25 rpm. El tampón de lisis 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 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 de proteasas (ROCHE)	1 pastilla/50 ml

Tabla 6. 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.

Para la extracción de proteína a partir de cultivo celular, se realiza el siguiente protocolo:

- Se retira el medio de cultivo de las células y se lava con PBS frío (4°C).
- Se sitúan las placas de cultivo en hielo y se añade tampón de lisis. Se despegan las células mediante el uso de un *scraper* o rascador (BD Falcon), y se recogen en un tubo de polipropileno de 1.5 ml.
- Se mantienen en hielo 10 minutos, agitando cada 5 minutos.
- Se centrifuga durante 10 minutos a 13000 rpm a 4°C, y se lleva el sobrenadante a un nuevo tubo. El extracto resultante se almacena a -80°C o se lleva a análisis.

4.5.3.2 Cuantificación de los extractos proteicos.

Para la cuantificación de la proteína contenida en el extracto, se realiza 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 los 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, se realiza una curva patrón de sero-albúmina bovina (BSA), con diluciones seriadas a partir de la máxima concentración, 1:50 en el caso de muestras de hígado y 1:5 para la proteína extraída a partir del cultivo celular de THLE-2 y Hep3B. Todas las muestras se miden por duplicado junto a 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.

4.5.3.3 Preparación de las muestras para la electroforesis SDS-PAGE.

Tras la cuantificación, se preparan las muestras junto con el tampón de carga (tampón de Laemmli, Tabla 7). 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 la desnaturalización gracias al β -mercaptoetanol, que elimina los puentes disulfuro, volviendo a las proteínas a su estructura primaria, y facilitando que, una vez cargadas en el gel, estas puedan separarse en función de su peso molecular, sin que la conformación espacial, dada por las estructuras secundaria y terciaria, interfiera en la migración a través de los poros del gel. 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, y al menos 2 μ g de proteína de extracto de cultivos celulares. Tras añadir el tampón de carga, y siempre de forma previa a realizar la electroforesis, las muestras se calientan a 95°C durante 5 minutos para su completa desnaturalización.

Tampón Laemmli	
Tris-HCl 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 7. Componentes del tampón de Laemmli disuelto en agua destilada.

4.5.3.4 Electroforesis en SDS-PAGE.

La electroforesis SDS-PAGE permite 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/Bisacrilamida 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 resolución de las proteínas. El gel está formado por dos fracciones:

- Gel concentrador: se localiza en la parte superior, y en él 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 8).
- 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 a estudiar. En el desarrollo de esta tesis se utilizaron geles del 8, 10 y 12% (Tabla 9).

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 8. Composición del gel SDS PAGE concentrador.

Gel separado	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 8.8	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 9. 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 10), 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 entre 80-120 V.

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

Tabla 10. Composición del tampón de electroforesis disuelto en agua destilada.

4.5.3.5 Transferencia semi-humeda.

Una vez que las proteínas se separan 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, inmovilizadas, y sean accesibles a los anticuerpos en las posteriores incubaciones. 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 las membranas y el gel, acotados por papel absorbente empapado en tampón de transferencia (Tabla 11), que favorece la transmisión de corriente durante el proceso. La transferencia se realiza a amperaje constante de 0.8 mA/cm² durante 1 h y 40 minutos.

Tampón de transferencia	
Tris-HCl	40 mM
Glicina	40 mM
SDS	0.36% peso/vol
Metanol	20% vol/vol

Tabla 11. Composición del tampón de transferencia disuelto en agua destilada.

4.5.3.6 Inmunodetección.

Realizada la transferencia de las proteínas del gel a la membrana, se sigue el siguiente proceso:

- Bloqueo de la membrana: este proceso consiste en incubar la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación con una solución de BSA o leche en polvo al 5% disuelto en tampón de lavado (TBS-T). 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 podría unirse a dichos lugares y dificultar la detección del complejo antígeno-anticuerpo deseada, dando lugar a uniones inespecíficas y ruido de fondo. Con dichas soluciones proteicas, se rellenan los sitios libres y los anticuerpos específicos no se unen a ellos.
- Anticuerpo primario: tras el bloqueo de la membrana, se incuba con el anticuerpo específico contra la proteína de estudio (tabla x). El anticuerpo primario se diluye según las instrucciones del fabricante (1:5000/1:10000) en TBS-T al 3%, y se deja incubar en agitación 1 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. En la Tabla 12 se recogen los anticuerpos primarios utilizados en la realización de esta tesis.
- 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. En la Tabla 13 se recogen los anticuerpos secundarios utilizados en la realización de esta tesis.
- 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. 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 fijación 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 (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 (GAPDH), que debe ser detectada por cada gel de electroforesis. El valor final es relativo respecto al grupo control de cada experimento.

Proteína diana	Casa comercial (referencia)	Especie	Dilución
p53	Cell Signaling (2524)	Monoclonal de ratón	1:1000
PCK1	Abcam (ab70358)	Policlonal de conejo	1:1000
O-GlcNAc	Abcam (ab2739)	Monoclonal	1:1000
GAPDH	Merck (CB1001)	Monoclonal	1:1000
pCREB (serina 133)	Cell Signaling (9198)	Policlonal de conejo	1:1000
pAKT (serina 473)	Cell Signaling (9271)	Policlonal de conejo	1:1000
pPDH (subunidad E1 α)	Abcam (ab177461)	Policlonal de conejo	1:1000
PC	Abcam (ab128952)	Policlonal de conejo	1:1000
G6Pasa	Abcam (ab83690)	Policlonal de conejo	1:1000

Tabla 12. Lista de anticuerpos primarios utilizados en la realización de esta tesis.

Anticuerpo secundario	Casa comercial (referencia)	Dilución
Conejo policlonal anti-ratón	DAKO (P0260)	1:5000
Cabra policlonal anti-conejo	DAKO (P0448)	1:5000

Tabla 13. Lista de anticuerpos secundarios utilizados en la realización de esta tesis.

4.6 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 estándar [348], 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 de Kolgomorv-Smirnof cuando el $n \leq 6$ [349, 350]. Cuando las poblaciones analizadas muestran una distribución normal, se realizan test estadísticos paramétricos, y cuando no, test non paramétricos.

En los test paramétricos, se realizan:

- Anova: determina si hay diferencias 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. En la realización de esta tesis se empleo el test post hoc Bonferroni, ya que tiene una gran potencia estadística, y se recomienda su uso cuando se realizan comparaciones entre más de tres grupos experimentales [351].
- T-test: compara las medias de dos muestras independientes, asumiendo que siguen una distribución normal. Es un test robusto, puesto que es capaz de comparar poblaciones con un $n \leq 5$ [352, 353]. 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 el t-test de dos colas.

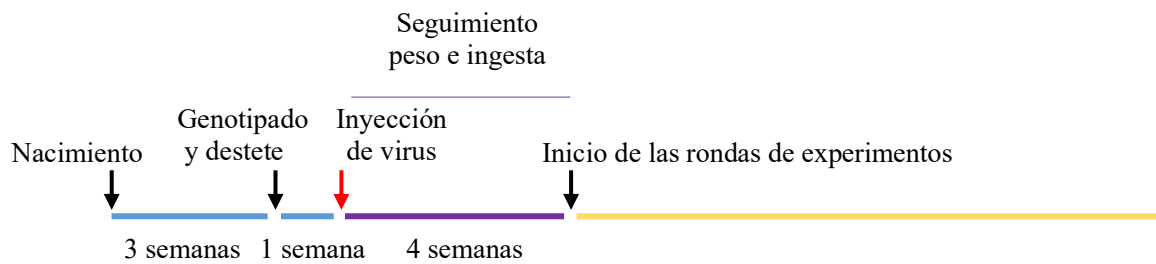
Correlaciones entre variables

En el desarrollo de esta tesis se realizaron correlaciones entre los niveles de proteína p53 y los niveles de proteína y mRNA de PCK1, así como correlaciones entre los niveles de proteína de p53, niveles de mRNA de *gfat1* y *gfat2* con el parámetro OGTT (test de tolerancia a la glucosa oral) en los estudios de humanos. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, ya que los datos mostraron una distribución normal.

4.7 DISEÑO EXPERIMENTAL.

4.7.1 Disminución de los niveles de p53 en el hígado.

Para estudiar de forma específica los efectos de la disminución de p53 en el hígado, se utilizaron ratones con el gen p53 floxeado. Se administraron, a través de la vena de la cola, virus adenoasociados que codifican para la recombinasa Cre (Tabla 1), y su control AAV8-GFP (Tabla 1). La especificidad de la técnica se demuestra por una mayor infección en el hígado con respecto a otros órganos [354-356]. Para la realización de los experimentos con estos ratones, se espera un mes desde la inyección de los virus, para asegurar una infección suficiente y una reducción clara y significativa de los niveles hepáticos de p53. En el desarrollo de esta tesis, se ha seguido siempre el siguiente esquema de trabajo con los ratones floxp53, de modo que, al inicio de las diferentes rondas experimentales, que se desarrollarán con detalle en los sucesivos apartados, los animales tenían 8 semanas de edad:



Durante las 4 semanas comprendidas entre la inyección de los virus y el comienzo de la ronda de experimentos, se realizó un seguimiento semanal del peso y de la ingesta de los diferentes ratones. Los grupos experimentales son:

- Ratones floxp53 + AAV8-GFP
- Ratones floxp53 + AAV8-Cre

4.7.2 Ratones knock out para p53 en el hígado.

Para estudiar de forma específica el efecto de la delección de p53 en los hepatocitos, se generaron ratones floxp53 que expresan la recombinasa Cre bajo la acción del promotor de la albúmina. Se ha seguido siempre el siguiente esquema de trabajo con los ratones Alfp-Cre floxp53, de modo que, al inicio de las diferentes rondas experimentales, los animales tenían 8 semanas de edad:



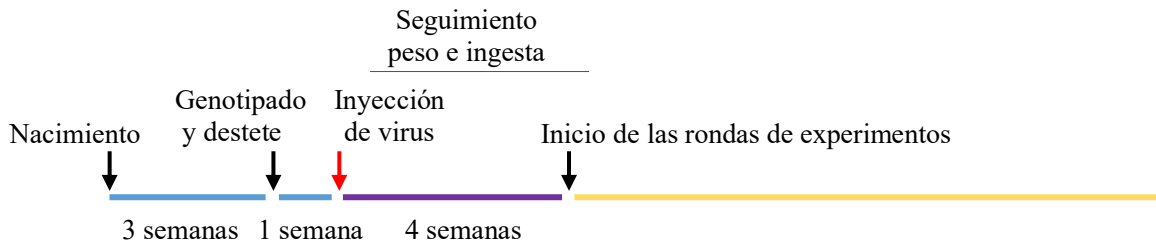
Durante el mes comprendido entre las 4 y las 8 semanas de edad, se realizó el seguimiento del peso y de la ingesta de los diferentes ratones. Los ratones *knock-out* para p53 son aquellos con el genotipo Alfp-Cre^{+/-} floxp53^{+/+}, mientras que los ratones del grupo control fueron siempre hermanos de camada con el genotipo Alfp-Cre^{-/-} floxp53^{+/+}. Los grupos experimentales son:

- Ratones control
- Ratones p53 HKO

4.7.3. Sobre expresión de p53 en ratones Alfp-Cre.

Con el fin de estudiar el efecto de la sobre expresión de los niveles de p53 específicamente en los hepatocitos de los ratones, se utilizaron ratones Alfp-Cre, a los que se les administró por la vena de la cola virus adenoasociados que expresan p53 de forma dependiente de la actividad de la recombinasa Cre (Tabla 1). Para la realización de los experimentos con estos ratones, se espera un mes desde la inyección de los virus, para asegurar una infección suficiente y un

incremento claro de los niveles hepáticos de p53. Al igual que en los modelos de ratón comentados con anterioridad, con los ratones Alfp-Cre se ha seguido siempre el siguiente esquema de trabajo, de modo que, al inicio de las diferentes rondas experimentales, los animales tenían 8 semanas de edad:

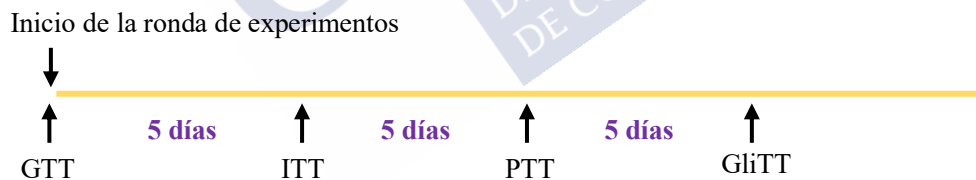


Durante las 4 semanas comprendidas entre la inyección de los virus y el comienzo de la ronda de experimentos, se realizó un seguimiento semanal del peso y de la ingesta de los diferentes ratones. Los grupos experimentales son:

- Ratones Alfp-Cre + AAV-DIO-EGFP
- Ratones Alfp-Cre + AAV-DIO-p53-EGFP

4.7.4 Realización de GTT, ITT, PTT y GliTT.

Con todos los modelos animales explicados con anterioridad, se siguió el siguiente esquema de trabajo para la realización de las pruebas de tolerancia a glucosa, insulina, piruvato y glicerol, dejando siempre, entre prueba y prueba, al menos 5 días de descanso:



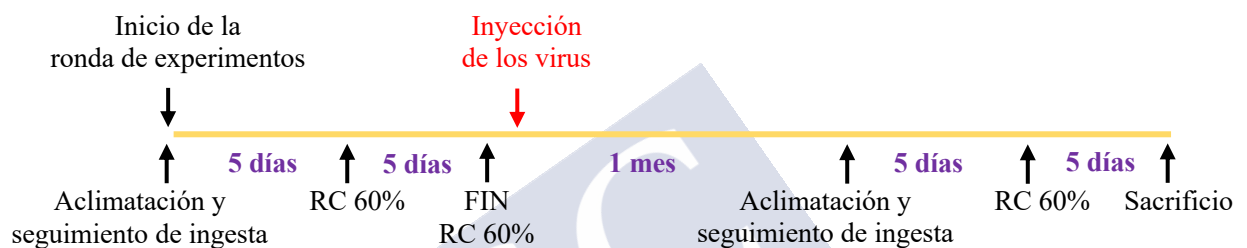
4.7.5 Realización de la restricción calórica y recuperación de la expresión de los niveles hepáticos de p53 en los ratones Alfp-Cre floxp53.

Los ratones fueron sometidos a una restricción calórica del 60% durante 5 días, con un periodo previo de 5 días de aclimatación a las condiciones de individualización. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- Ratones control *ad libitum*
- Ratones p53 HKO *ad libitum*
- Ratones control RC 60%
- Ratones p53 HKO RC 60%

Una vez realizado este primer ensayo, los ratones p53 HKO previamente sometidos a restricción calórica, se subdividieron en dos grupos, para recuperar la expresión de p53 en uno de ellos, mediante la inyección del virus AAV-DIO-p53 a través de la vena de la cola. Se esperó un mes desde la inyección de los virus, y se repitió de nuevo el ensayo de restricción calórica. En este ensayo, los grupos experimentales fueron los siguientes:

- Ratones control ad libitum
- Ratones p53 HKO ad libitum
- Ratones control RC 60% + AAV-DIO-EGFP
- Ratones p53 HKO RC 60% + AAV-DIO-EGFP
- Ratones p53 HKO RC 60% + AAV-DIO-p53



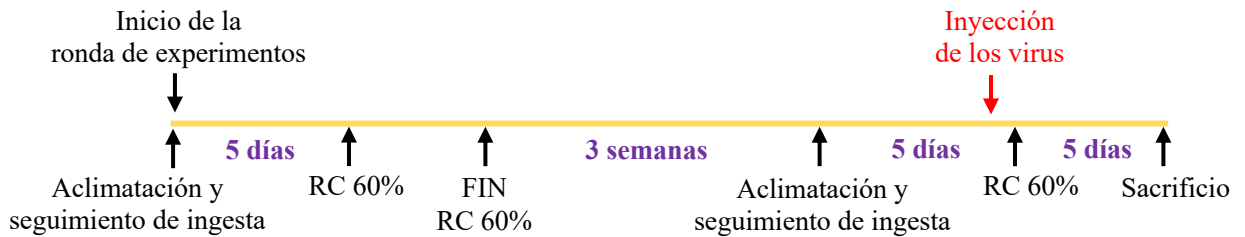
4.7.6 Realización de la restricción calórica y recuperación de la expresión de los niveles de p53 en los ratones floxp53 + AAV8-Cre.

Los ratones fueron sometidos a una restricción calórica del 60% durante 5 días, con un periodo previo de 5 días de aclimatación a las condiciones de individualización. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- Ratones floxp53 + AAV8-GFP *ad libitum*
- Ratones floxp53 + AAV8-Cre *ad libitum*
- Ratones floxp53 + AAV8-GFP RC 60%
- Ratones floxp53 + AAV8-Cre RC 60%

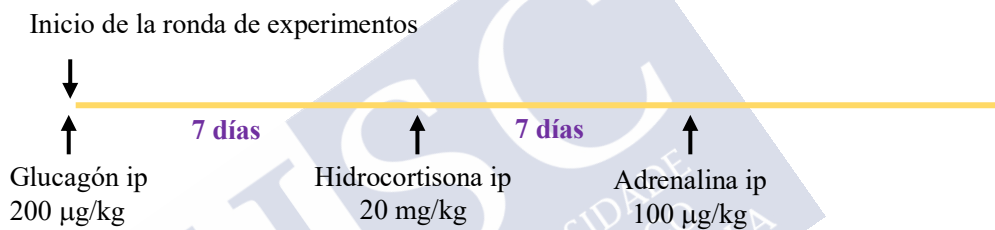
Una vez realizado este primer ensayo, los ratones floxp53 + AAV8-Cre previamente sometidos a restricción calórica se subdividieron en dos grupos, para recuperar la expresión de p53 en uno de ellos, mediante la inyección del virus Ad-p53 a través de la vena de la cola. Se les dejó descansar 3 semanas, y se repitió de nuevo el ensayo de restricción calórica. Los virus fueron inyectados el último día del periodo de aclimatación y adaptación, el día previo al comienzo de la restricción calórica. En este ensayo, los grupos experimentales fueron los siguientes:

- Ratones floxp53 + AAV8-GFP *ad libitum*
- Ratones floxp53 + AAV8-Cre *ad libitum*
- Ratones floxp53 + AAV8-GFP RC 60% + Ad-GFP
- Ratones floxp53 + AAV8-Cre RC 60% + Ad-GFP
- Ratones floxp53 + AAV8-Cre RC 60% + Ad-p53



4.7.7 Administración de hormonas hiperglucemiantes.

Con todos los modelos animales explicados con anterioridad se siguió el siguiente esquema de trabajo para la realización de los ensayos de administración de las hormonas hiperglucemiantes. Siempre se mantuvo el mismo orden, realizando primero el ensayo con glucagón, luego cortisol, y por último adrenalina, dejando siempre 7 días de descanso entre cada ensayo:



Los grupos experimentales fueron:

- Ratones floxp53 + AAV8-GFP + salino
- Ratones floxp53 + AAV8-Cre + salino
- Ratones floxp53 + AAV8-GFP + hormona hiperglicemiante
- Ratones floxp53 + AAV8-Cre + hormona hiperglucemiante

- Ratones control + salino
- Ratones p53 HKO + salino
- Ratones control + hormona hiperglicemiante
- Ratones p53 HKO + hormona hiperglicemiante

4.7.8 Estudio del efecto del estado nutricional en la regulación de los niveles de p53 *in vitro*.

Para realizar este estudio, las células THLE-2 y las Hep3B fueron sometidas a 6 horas de ayuno, empleando el medio KHH. Las células del grupo control permanecieron en medio completo durante todo el ensayo. Con ambas líneas celulares se siguió el mismo esquema de trabajo:



Los grupos experimentales:

- THLE-2 en medio completo
- THLE-2 en KHH
- Hep3B en medio completo
- Hep3B en KHH.

Para estudiar el efecto de las principales hormonas hiperglucemiantes sobre los niveles de p53 *in vitro*, se trató a las células THLE-2 y a las Hep3B con glucagón, hidrocortisona y adrenalina (e insulina en las células THLE-2). En cada ensayo, la hormona correspondiente se añadió al medio KHH al inicio del ensayo, y se mantuvo a las células en este medio durante 6 horas. Con ambas líneas celulares se siguió el mismo esquema de trabajo:

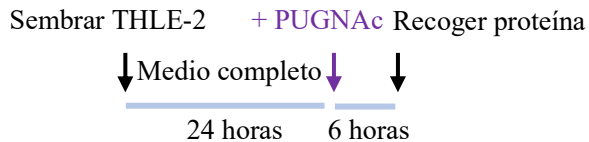


Los grupos experimentales fueron:

- THLE-2 en medio completo
- THLE-2 en KHH
- THLE-2 en KHH + hormona (glucagón, hidrocortisona, adrenalina o insulina)
- Hep3B en medio normal
- Hep3B en KHH
- Hep3B en KHH + hormona (glucagón, hidrocortisona o adrenalina)

4.7.9 Estudio de la O-GlcNAcilación de p53 *in vitro*.

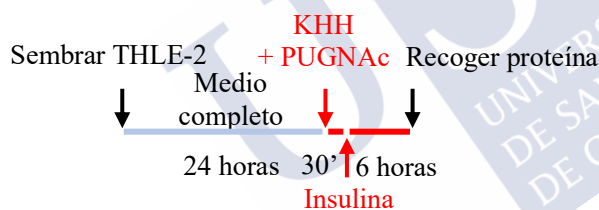
El estudio de la *O*-GlcNAcilación de p53 *in vitro* se realizó en las células THLE-2. Para ello se llevaron a cabo dos ensayos diferentes. En primer lugar, las células THLE-2 se mantuvieron en medio completo y se trataron con el activador de la *O*-GlcNAcilación PUGNAc durante 6 horas:



Los grupos experimentales fueron:

- THLE-2 en medio normal
- THLE-2 en medio normal + PUGNAc

Se realizó este mismo ensayo para estudiar si el incremento de los niveles de proteína de p53 inducido por el aumento de la *O*-GlcNAcilación tras la administración de PUGNAc podría provocar resistencia a insulina. Para ello, las células se mantuvieron en KHH, y fueron tratadas simultáneamente con PUGNAc y con insulina durante 6 horas, añadiéndose el PUGNAc 30 minutos antes de la adición de la insulina al medio:



Los grupos experimentales fueron:

- THLE-2 en KHH
- THLE-2 en KHH + insulina
- THLE-2 en KHH + insulina + PUGNAc

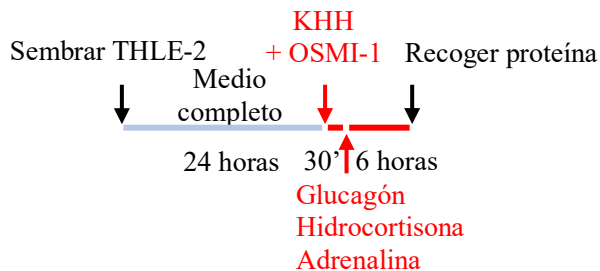
En segundo lugar, las células THLE-2 fueron mantenidas en KHH durante 6 horas, en presencia o ausencia del inhibidor de la *O*-GlcNAcilación OSMI-1:



Los grupos experimentales fueron:

- THLE-2 en medio completo
- THLE-2 en KHH
- THLE-2 en KHH + OSMI-1

Se realizó este mismo ensayo para estudiar si la inhibición de la *O*-GlcNAcilación, inducida por el tratamiento con OSMI-1, podría impedir el incremento de los niveles de proteína de p53 en respuesta al tratamiento con las hormonas hiperglucemiantes. Para ello, las células se mantuvieron en KHH, y fueron tratadas simultáneamente con OSMI-1 y con las hormonas hiperglucemiantes (glucagón, hidrocortisona y adrenalina) durante 6 horas, añadiéndose el OSMI-1 30 minutos antes de la adición de las hormonas hiperglucemiantes al medio:

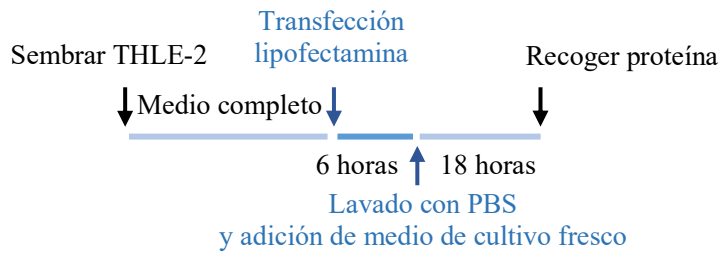


Los grupos experimentales fueron:

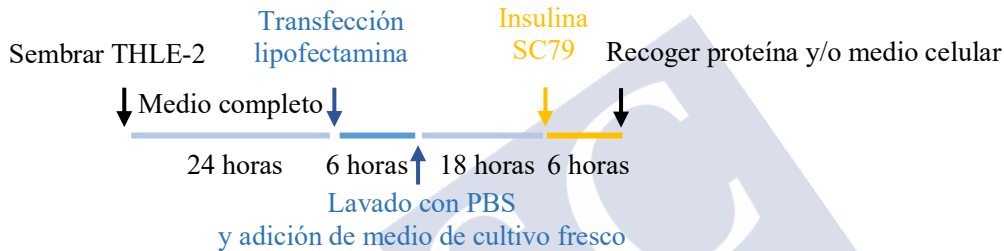
- THLE-2 en KHH
- THLE-2 en KHH + OSMI-1
- THLE-2 en KHH + glucagón
- THLE-2 en KHH + OSMI-1 + glucagón
- THLE-2 en medio completo
- THLE-2 en KHH + hidrocortisona
- THLE-2 en KHH + OSMI-1 + hidrocortisona
- THLE-2 en medio completo
- THLE-2 en KHH + adrenalina
- THLE-2 en KHH + OSMI-1 + adrenalina

4.7.10 Sobre expresión de p53 en la línea celular THLE-2.

Para incrementar los niveles de proteína de p53 en las células THLE-2 se utilizaron vectores de ADN contenidos en plásmidos (Addgene). Para la transfección, se utilizó Lipofectamine 2000, incubando 4 µl de Lipofectamine 2000 diluidos en 150 µl de Opti-MEM con 2.5 µg de DNA de plásmido diluidos en 150 µl de Opti-MEM en placas de 6 pocillos, donde se sembraron 1.5×10^5 células/pocillo. Como prueba de que la transfección ha sido exitosa, se realiza un *western blot* para comprobar el aumento de los niveles de proteína de p53 transcurridas 24 horas desde la transfección.



Este mismo experimento se realizó para estudiar si la sobre expresión de p53 podría generar resistencia a insulina. Para ello, 24 horas después de la transfección con lipofectamina, las células se trataron con insulina o SC79 (un activador químico de AKT) durante 6 horas, al término de las cuales se recogió el extracto celular y/o el medio de cultivo, en los casos requeridos, para realizar el posterior análisis de *western blot* o cuantificación de la glucosa en medio:



Los grupos experimentales fueron:

- THLE-2 + p0
- THLE-2 + pp53
- THLE-2 + p0 + insulina
- THLE-2 + pp53 + insulina

Este experimento se realizó para el análisis por *western blot*.

- THLE-2 + p0
- THLE-2 + p0 + insulina
- THLE-2 + pp53 + insulina

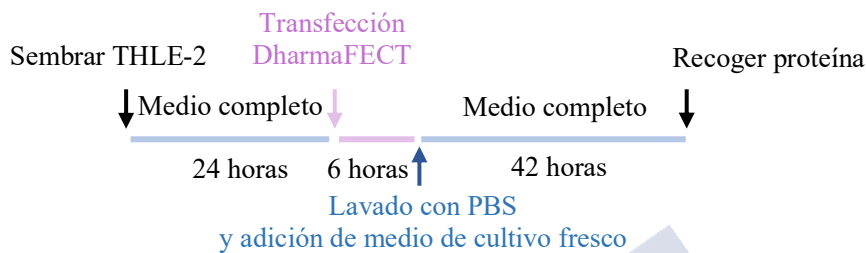
Este experimento se realizó para cuantificar la producción de glucosa, por lo que todos los grupos experimentales se incubaron en el medio gluconeogénico (medio KHH suplementado con lactato 20 mM y piruvato 2 mM).

- THLE-2 + p0
- THLE-2 + p0 + SC79
- THLE-2 + pp53 + SC79

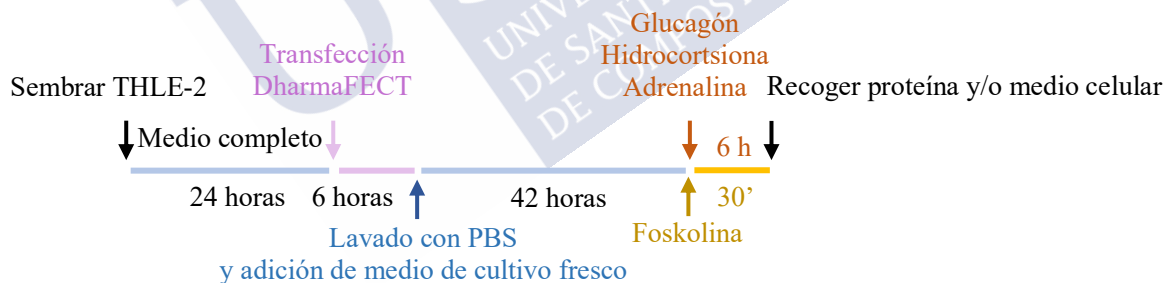
Este experimento se realizó para el análisis por *western blot*.

4.7.11 Inhibición de p53 en la línea celular THLE-2.

Para disminuir la expresión de p53 en las células THLE-2 utilizamos un pequeño ARN interferente específico para p53 (sip53). Como control negativo se utilizó un *non-targeting siRNA* (si0). Para llevar a cabo la transfección se utilizó DharmaFECT 1 (Dharmacon), de modo que se mezclan 50 pmol de sip53 diluidos en 200 μ l de Opti-MEM con 6.5 μ l de DharmaFECT diluido en 193.5 μ l de Opti-MEM. Se sembraron 1.5×10^5 células/pocillo, en placas de 6 pocillos. Como prueba de que la transfección ha sido exitosa, se realiza un *western blot* para comprobar la disminución de los niveles de proteína de p53 transcurridas 48 horas desde la transfección:



Este mismo procedimiento se realizó para estudiar si la disminución de los niveles de proteína de p53 podría bloquear el efecto gluconeogénico del glucagón, la hidrocortisona y el cortisol. Para ello, 48 horas después de la transfección con DharmaFECT, las células se trataron con glucagón, hidrocortisona o adrenalina durante 6 horas, o forskolina durante 30'. Finalmente se recogió el extracto celular y/o el medio de cultivo, en los casos requeridos, para realizar el posterior análisis de *western blot*, cuantificación de la glucosa en medio o estudio de la actividad enzimática de PCK1.



Los grupos experimentales fueron:

- THLE-2 + si0 en medio completo
- THLE-2 + sip53 en medio completo
- THLE-2 + si0 en KHH
- THLE-2 + sip53 en KHH
- THLE-2 + si0 en KHH + glucagón
- THLE-2 + sip53 en KHH + glucagón

Este experimento se realizó para su posterior análisis por *western blot*.

- THLE-2 + si0 en KHH
- THLE-2 + si0 en KHH + glucagón

- THLE-2 + sip53 en KHH + glucagón

Este experimento se realizó para estudiar la actividad enzimática de PCK1.

- THLE-2 + si0 + vehículo
- THLE-2 + sip53 + vehículo
- THLE-2 + si0 + forskolina
- THLE-2 + sip53 + forskolina

Este experimento se realizó tanto para su posterior análisis por *western blot*.

- THLE-2 + si0 + vehículo
- THLE-2 + sip53 + vehículo
- THLE-2 + si0 + forskolina
- THLE-2 + sip53 + forskolina

Este ensayo se realizó para estudiar la producción de glucosa, donde todos los grupos experimentales se incubaron en el medio gluconeogénico (medio KHH suplementado con lactato 20 mM y piruvato 2 mM).

- THLE-2 + si0 en medio completo
- THLE-2 + sip53 en medio completo
- THLE-2 + si0 en KHH + adrenalina
- THLE-2 + sip53 en KHH + adrenalina

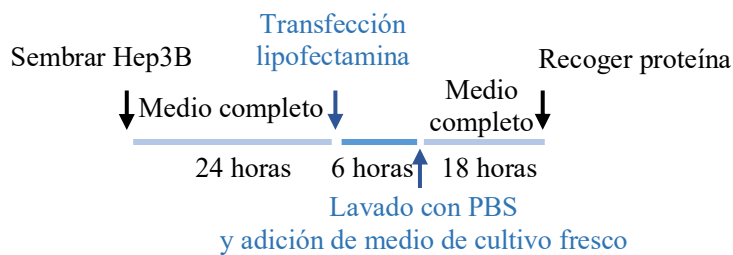
Este experimento se realizó para su posterior análisis por *western blot*.

- THLE-2 + si0 en medio completo
- THLE-2 + sip53 en medio completo
- THLE-2 + si0 en KHH + hidrocortisona
- THLE-2 + sip53 en KHH + hidrocortisona

Este experimento se realizó para su posterior análisis por *western blot*.

4.7.12 Sobre expresión de p53 en la línea celular Hep3B.

Para incrementar los niveles de proteína de p53 en las células Hep3B se utilizaron vectores de ADN contenidos en plásmidos (Addgene). Para la transfección se utilizó Lipofectamina 2000, incubando 8 μ l de Lipofectamine 2000 diluidos en 150 μ l de Opti-MEM con 8 μ g de DNA de plásmido diluidos en 150 μ l de Opti-MEM en placas de 6 pocillos, donde se sembraron 3×10^5 células/pocillo. Como prueba de que la transfección ha sido exitosa, se realiza un *western blot* para comprobar la presencia de proteína de p53. Se sigue el mismo procedimiento con el plásmido WT de p53 (pp53) como con la versión mutada en la serina 149, pA149S.



Los grupos experimentales fueron:

- Hep3B + p0
- Hep3B + pp53/pA149S

Este mismo experimento se realizó para comprobar si la recuperación de la expresión de p53 en las células Hep3B era suficiente para recuperar, asimismo, la acción de la forskolina (activador químico de CREB, y por ende, activador de la ruta molecular del glucagón y la adrenalina). Para ello, transcurridas 24 horas tras la transfección con lipofectamina, las células se trataron durante 30 minutos con forskolina, al término de las cuales se recogió el extracto celular y/o el medio de cultivo, para realizar el posterior análisis de *western blot* o cuantificación de la glucosa en medio:



Los grupos experimentales fueron:

- Hep3B + p0
- Hep3B + pp53/pA149S
- Hep3B + p0 + forskolina
- Hep3B + pp53/ pA149S + forskolina

Este experimento se realizó para el análisis por *western blot*.

- Hep3B + p0
- Hep3B + pp53
- Hep3B + p0 + forskolina
- Hep3B + pp53 + forskolina

Este experimento se realizó para cuantificar la producción de glucosa, por lo que todos los grupos experimentales se incubaron en el medio gluconeogénico (medio KHH suplementado con lactato 20 mM y piruvato 2 mM).

4.7.13 Sobre expresión de p53 e inhibición de PCK1 en las células THLE-2.

Para realizar este ensayo, en primer lugar, se realizó el silenciamiento de PCK1, utilizando un ARN interferente específico para PCK1 (siPCK1). Como control negativo se utilizó un *non-targeting siRNA* (si0). Para llevar a cabo la transfección se utilizó DharmaFECT 1, siguiendo el protocolo explicado con anterioridad (50 pmol de sipPCK1 diluidos en 200 μ l de Opti-MEM con 6.5 μ l de DharmaFECT diluido en 193.5 μ l de Opti-MEM. Se sembraron 1.5×10^5 células/pocillo, en placas de 6 pocillos). Transcurridas 24 horas desde la transfección, se procedió con la sobre expresión de p53, incubando 4 μ l de Lipofectamine 2000 diluidos en 150 μ l de Opti-MEM con 2.5 μ g de DNA de plásmido diluidos en 150 μ l de Opti-MEM. Transcurridas 24 horas desde esta última transfección (y 48 desde la primera), las células se mantuvieron durante 6 horas en medio KHH suplementado con lactato 20 mM y piruvato 2 mM, para posteriormente determinar la producción de glucosa en los diferentes grupos experimentales.



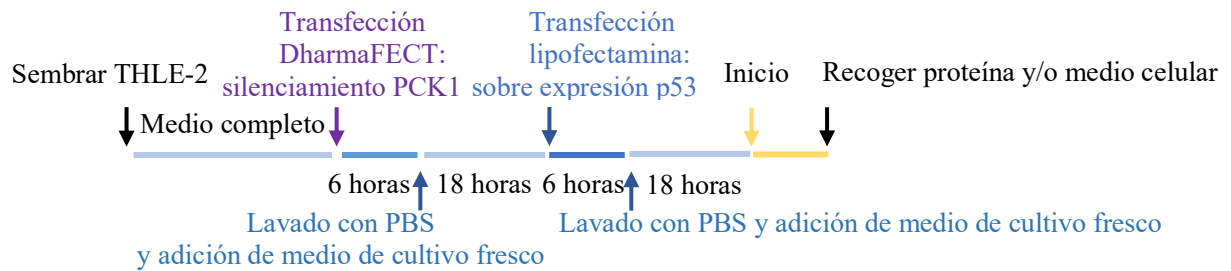
Los grupos experimentales fueron:

- THLE-2 + p0 + si0
- THLE-2 + pp53 + si0
- THLE-2 + pp53 + si0

4.7.14 Inhibición de p53 y sobre expresión de PCK1.

Para realizar este ensayo, en primer lugar, se realizó el silenciamiento de p53, utilizando un ARN interferente específico para p53 (sip53). Como control negativo se utilizó un *non-targeting siRNA* (si0). Para llevar a cabo la transfección se utilizó DharmaFECT 1, siguiendo el protocolo explicado con anterioridad (50 pmol de sipPCK1 diluidos en 200 μ l de Opti-MEM con 6.5 μ l de DharmaFECT diluido en 193.5 μ l de Opti-MEM. Se sembraron 1.5×10^5 células/pocillo, en placas de 6 pocillos). Transcurridas 24 horas desde la transfección, se

procedió con la sobre expresión de PCK1, incubando 4 μ l de Lipofectamine 2000 diluidos en 150 μ l de Opti-MEM con 2.5 μ g de DNA de plásmido diluidos en 150 μ l de Opti-MEM. Transcurridas 24 horas desde esta última transfección (y 48 desde la primera), las células se mantuvieron durante 6 horas en medio KHH suplementado con lactato 20 mM y piruvato 2 mM, para posteriormente determinar la producción de glucosa en los diferentes grupos experimentales.



Los grupos experimentales fueron:

- THLE-2 + p0 + si0
- THLE-2 + p0 + sip53
- THLE-2 + pp53 + siPCK1





RESULTADOS





5. RESULTADOS.

5.1 EL ESTADO NUTRICIONAL REGULA LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE p53 EN EL HÍGADO A TRAVÉS DE SU O-GLCNACILACIÓN.

5.1.1 Los niveles de proteína de p53 en el hígado se incrementan durante el ayuno sin cambios en los niveles de mRNA de p53.

Para estudiar si los niveles de proteína de p53 en el hígado se regulan por el estado nutricional, sometimos a nuestros ratones *wild type* (WT) a un ayuno de 24 horas, con una posterior realimentación *ad libitum* de otras 24 horas. Los animales del grupo control permanecieron con acceso *ad libitum* a dieta estándar durante todo el proceso experimental. Se observó un incremento significativo de los niveles de proteína de p53 en los hígados de los ratones que permanecieron en ayuno, que retorna a los niveles basales tras la realimentación (Figura 1A). Para estudiar en profundidad esta regulación de los niveles de proteína de p53, realizamos un minucioso estudio temporal, donde se observa que el incremento de los niveles de proteína de p53 tiene lugar ya a las 6 horas de ayuno, manteniéndose hasta las 24 horas de ayuno (Figura 1B). Cabe destacar que, durante todo el estudio temporal, los niveles de mRNA de p53 permanecieron inalterados (Figura 1B).

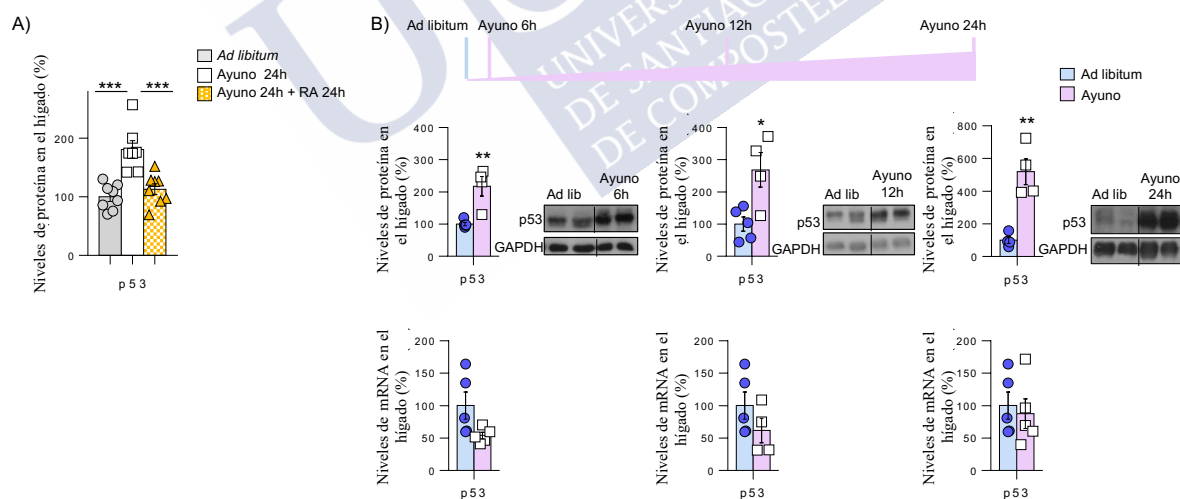


Figura 1. Regulación de los niveles de proteína de p53 por el estado nutricional. A) Niveles de proteína en el hígado de ratones WT alimentados *ad libitum*, en ayuno durante 24 horas, o realimentados (RA) durante 24 horas tras haber sido sometidos a un ayuno previo de 24 horas (n= 7-8). B) Niveles de proteína y mRNA en el hígado de ratones WT alimentados *ad libitum*, o en ayuno durante 6, 12 o 24 horas. La expresión de GAPDH (*western blot*) y la de HPRT (qRT-PCR) han sido empleadas como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05; **P<0.01 y ***P<0.001.

5.1.2 Los niveles de proteína de p53 se regulan por la glucosa *in vivo* e *in vitro*.

El siguiente propósito fue identificar qué señal o componente del estado nutricional es el responsable de la regulación de los niveles hepáticos de p53. Dado que la leptina es una hormona metabólica muy importante, estrechamente regulada por el estado nutricional (el exceso calórico produce hiperleptinemia, mientras que el déficit calórico induce hipoleptinemia [357]), realizamos un ensayo para estudiar su posible papel en la regulación de los niveles de p53. Para ello, nuestros ratones WT sometidos a ayuno recibieron, simultáneamente, una dosis fisiológica de leptina. El tratamiento con leptina fue incapaz de revertir el incremento de los niveles de proteína de p53 que tiene lugar durante el ayuno en el hígado (Figura 2A), reflejando que la leptina no es responsable de la regulación de p53.

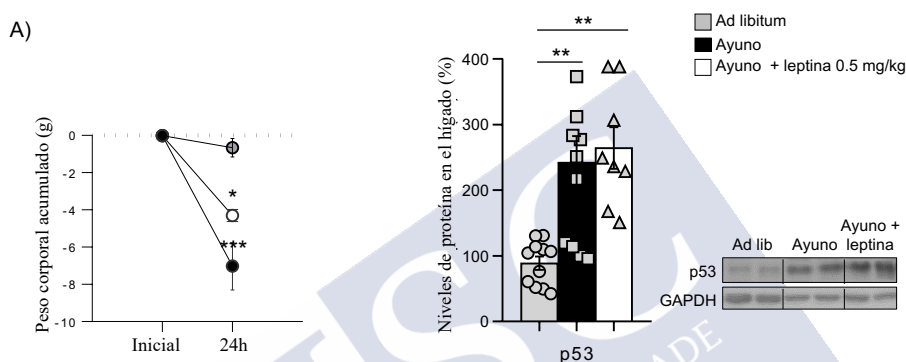


Figura 2. La leptina no regula los niveles de p53 en el hígado en estado de ayuno. Los ratones WT fueron tratados con salino, o con leptina recombinante (a una dosis de 0.5 mg/kg cada 12 horas durante 3 días). A) Peso corporal acumulado (izquierda) y niveles de proteína de p53 en el hígado (derecha) (n=8-12 animales por grupo). La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

Debido a estos resultados negativos, quisimos estudiar si los niveles de glucosa circulante, afectados también de forma severa por el estado nutricional, podrían ser los responsables de la regulación de los niveles hepáticos de p53. Con este objetivo, parte de nuestros ratones sometidos a ayuno recibieron glucosa (mediante la ingesta de azucarillos), método que, tal y como se había descrito con anterioridad [311], permite que los animales mantengan unos niveles de glucemia similares a los de los ratones alimentados *ad libitum*, mientras experimentan una pérdida de peso característica del estado de ayuno (Figura 3A). A nivel hepático, observamos que el incremento de los niveles de proteína de p53 que tiene lugar durante el ayuno, disminuye por completo en los ratones que mantienen la euglicemia (Figura 3A), sin que ocurran cambios a nivel de la expresión de mRNA (Figura 3A). Estos resultados obtenidos *in vivo*, se corroboraron *in vitro*, en la línea celular de hepatocitos humanos THLE-2, donde se observó que la adición de glucosa al medio de las células sometidas a condiciones de ayuno revierte el incremento de los niveles de proteína de p53 en un modo dependiente de la dosis (Figura 3B). Colectivamente, nuestros resultados sugieren que los niveles hepáticos de p53 son regulados negativamente por la glucosa.

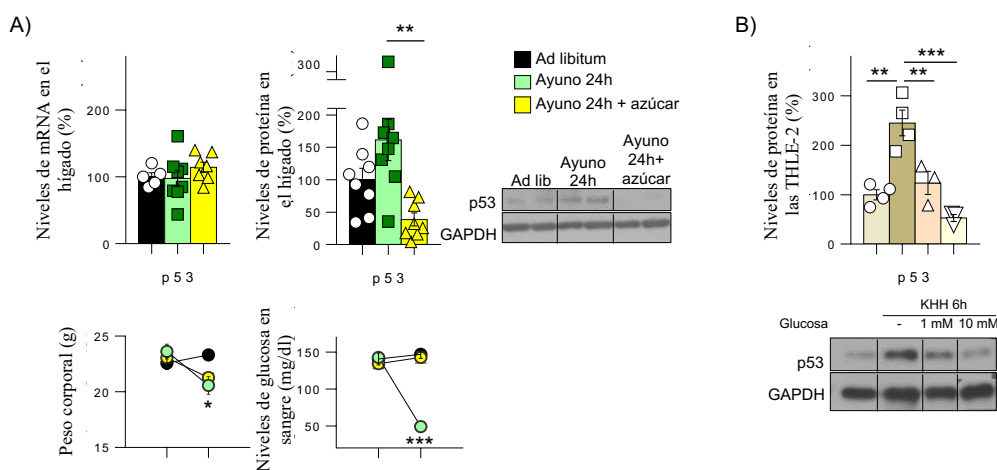


Figura 3. La glucosa regula los niveles de p53 en el hígado. A) Peso corporal, niveles de glucosa en sangre, niveles de mRNA y niveles de proteína de p53 en el hígado de ratones alimentados *ad libitum*, en ayuno durante 24 horas, o con acceso libre a azúcares (en ausencia de cualquier otro nutriente) (n= 6-8 animales por grupo). B) Niveles de proteína de p53 en las células THLE2 mantenidas en medio completo o ayunadas durante 6 horas en el medio KHH, suplementado o no con glucosa 1mM o 10 mM (n=4 por grupo). La expresión de GAPDH (*western blot*) y la de HPRT (qRT-PCR) han sido empleadas como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05; **P<0.01 y ***P<0.001.

5.1.3 La *O*-GlcNAcilación estabiliza a p53 durante el ayuno.

Se ha descrito en detalle que la actividad y la función de p53 está fuertemente controlada por la estabilidad de su proteína que, en condiciones normales, tiene una vida media muy corta y se degrada rápidamente [219, 259, 358]. Dado que nuestros resultados indicaban que el incremento de los niveles de proteína de p53 en el hígado no se debían a un incremento de la expresión del gen, nos propusimos identificar el mecanismo postranscripcional implicado en la estabilización de p53 durante el ayuno. Estudios previos realizados en *C. elegans* señalan que la *O*-GlcNAcilación es un proceso muy relevante en eventos biológicos en los que p53 también juega un papel fundamental, como la transcripción, la regulación del ciclo celular y la respuesta a estrés [359]. Además, se ha encontrado que la *O*-GlcNAcilación estabiliza y regula los niveles de proteína de p53 en líneas celulares tumorales de mama y ovario [227, 256], identificándose la serina 149 como la ubicación de esta modificación en p53 [227]. Esta modificación postranscripcional actúa además como sensor nutricional, ya que su precursor, el UDP-GlcNAc, deriva de las rutas metabólicas de la glucosa, los ácidos grasos, los ácidos nucleicos y el nitrógeno [229]. Tomando en conjunto nuestros resultados con los datos recogidos en la bibliografía previa, nos propusimos investigar si la *O*-GlcNAcilación podría ser la modificación responsable de la estabilización de p53 durante el ayuno, actuando como sensor nutricional y participando en los efectos de p53 en la homeostasis de la glucosa. Para ello, realizamos una inmunoprecipitación de p53 en las células THLE-2, que mostró un incremento de la *O*-GlcNAcilación de p53 durante el ayuno (Figura 4A). En consonancia, el tratamiento de las células con PUGNAc (inhibidor farmacológico de la enzima OGA, que promueve la *O*-GlcNAcilación de las proteínas) incrementó los niveles de proteína de p53 en un modo dependiente de la dosis (Figura 4B), mientras que el tratamiento con OSMI-1 (inhibidor

farmacológico de la enzima OGT, que inhibe la *O*-GlcNAcilación de las proteínas) disminuyó los niveles de p53 durante el ayuno, retornándolos a los niveles basales (Figura 4C).

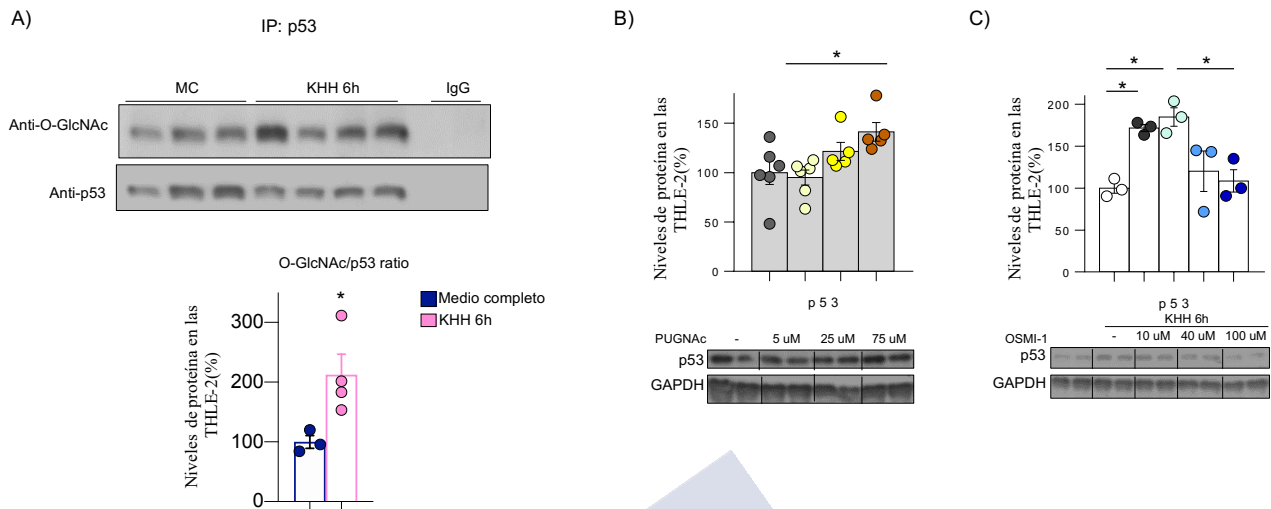


Figura 4. La *O*-GlcNAcilación está implicada en la estabilización de p53 durante el ayuno. A) *O*-GlcNAcilación de p53 en las células THLE-2 en medio completo o KHH durante 6 horas (n=3-4 por grupo). B) Niveles de proteína de p53 en las células THLE-2 mantenidas en el medio completo, suplementado o no con PUGNAc 5, 25 o 75 μM (n=5-6) durante 6 horas. C) Niveles de proteína de p53 en las células THLE-2 mantenidas en medio completo o medio KHH, suplementado o no con OSMI-1 10, 40 o 100 μM (n=3 por grupo) durante 6 horas. La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media ± SEM. *P<0.05.

5.2 p53 SE UNE AL PROMOTOR DE PCK1 Y REGULA SU EXPRESIÓN.

5.2.1 p53 promueve la expresión de PCK1.

Una vez demostrado que los niveles de p53 en el hígado se regulan por la glucemia, mediante un mecanismo dependiente de la *O*-GlcNAcilación, nuestro siguiente propósito fue estudiar la función de p53 en la homeostasis de la glucosa. Al someter a condiciones de ayuno a las células THLE-2, observamos un incremento significativo en los niveles de proteína de p53 y PCK1 (Figura 5A) que, como se explicó en el apartado de la introducción, es una de las principales enzimas limitantes de la gluconeogénesis, encargada de convertir el oxaloacetato en fosfoenolpiruvato y dióxido de carbono. Asimismo, los niveles de proteína de PCK1 y su actividad enzimática aumentan durante el ayuno, pero disminuyen drásticamente al silenciar p53 (Figura 5B-C), mientras que la sobre expresión de p53 incrementa la actividad enzimática de PCK1 (Figura 5D). Sin embargo, la sobre expresión de p53 con la mutación A149S, que no se puede *O*-GlcNAcilarse en la serina 149, no produce un incremento significativo de la actividad PCK1 (Figura 5E), resaltando la importancia de esta modificación en los efectos gluconeogénicos de p53.

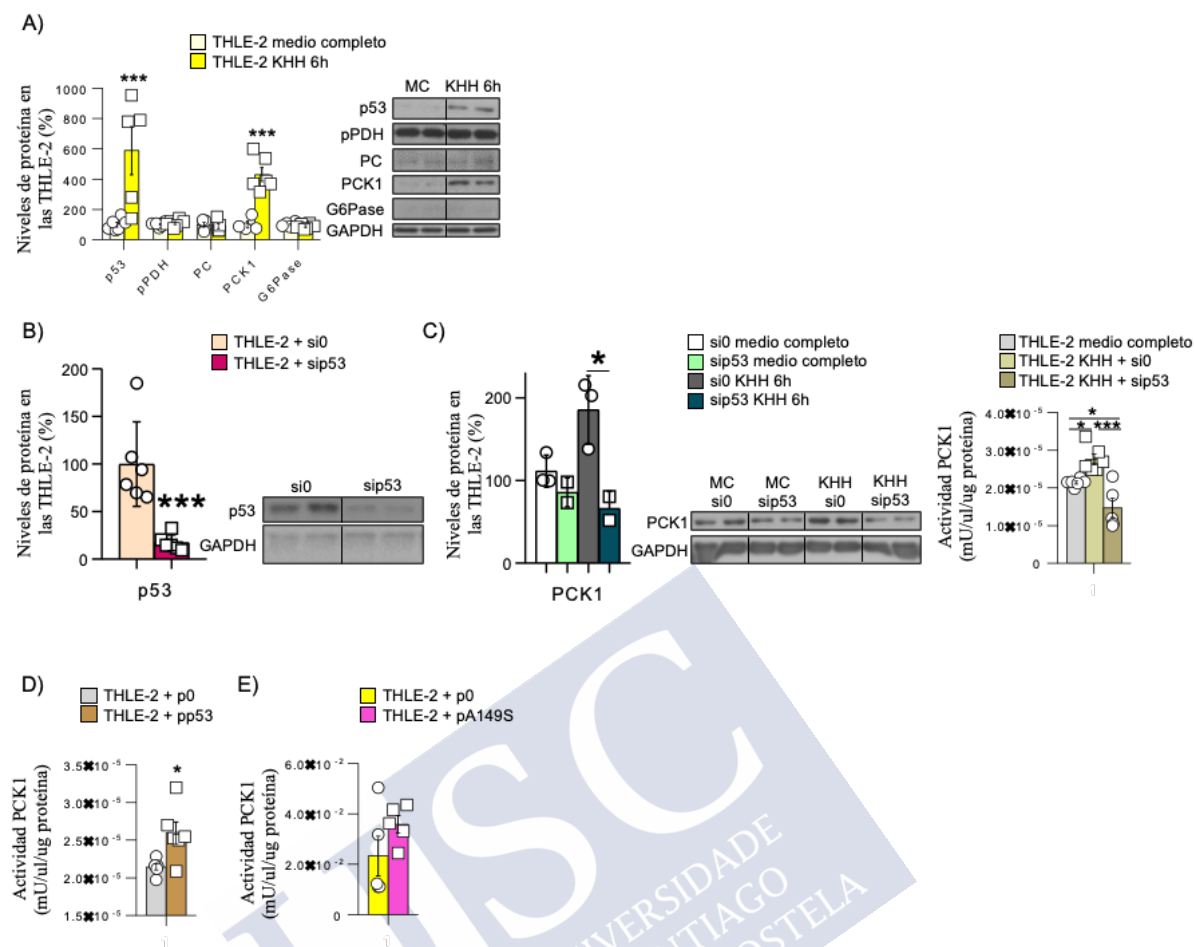


Figura 5. p53 promueve la expresión y actividad de PCK1. A) Niveles de proteína de p53, pPDH, PC, PCK1 y G6Pase en las células THLE-2 mantenidas en medio completo o en KHH durante 6 horas (n=6 por grupo). B) Comprobación de la eficiencia del silenciamiento de p53 en las células THLE-2 (n=6 por grupo). C) Niveles de proteína y actividad enzimática de PCK1 en las células THLE-2 mantenidas en medio completo o en KHH durante 6 horas, tratadas con si0 o sip53 (n=3-6 por grupo). D) Actividad enzimática de PCK1 en las células THLE-2 tratadas con p0 o pp53 para sobre expresar p53 (n=6 por grupo). E) Actividad enzimática de PCK1 en las células THLE-2 tratadas con p0 o pA149S para sobre expresar p53 (n=5 por grupo). La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001.

De acuerdo con estos resultados, encontramos que la sobre expresión de p53 induce un incremento en la producción de glucosa, y que este efecto es dependiente de la actividad de PCK1, ya que desaparece al silenciar PCK1 (Figura 6A). Del mismo modo, la sobre expresión de PCK1 en las células con el gen de p53 silenciado, recupera la producción de glucosa durante el ayuno (Figura 6B).

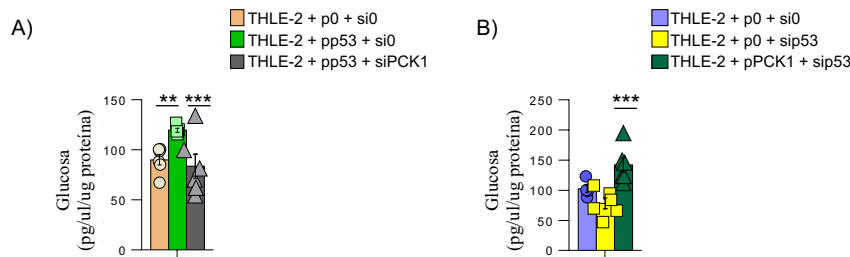


Figura 6. PCK1 media los efectos de p53 en la producción hepática de glucosa *in vitro*. A) Determinación de la producción de glucosa tras la sobre expresión de p53 (pp53) y el silenciamiento de PCK1 (siPCK1) (n=6 por grupo). B) Determinación de la producción de glucosa tras la inhibición de p53 (sip53) y la sobre expresión de PCK1 (pPCK1) (n=6 por grupo). Los datos se presentan como media \pm SEM. **P<0.01 y ***P<0.001.

Para corroborar los resultados obtenidos al silenciar p53 en las células THLE-2, utilizamos un segundo modelo *in vitro*, las células Hep3B, que son hepatocitos humanos que no expresan p53. Al someter a estas células a condiciones de ayuno, los niveles de PCK1 permanecieron inalterados (Figura 7A), mientras que se produjo un incremento de los niveles de oxaloacetato, indicando una acumulación debida a un flujo descompensado, al no ser descarboxilado y fosforilado por PCK1 (Figura 7B). La recuperación de la expresión de p53 en las células Hep3B (Figura 7C) produjo un incremento de los niveles de PCK1, tanto de *mRNA* (Figura 7D) como de proteína (Figura 7E).

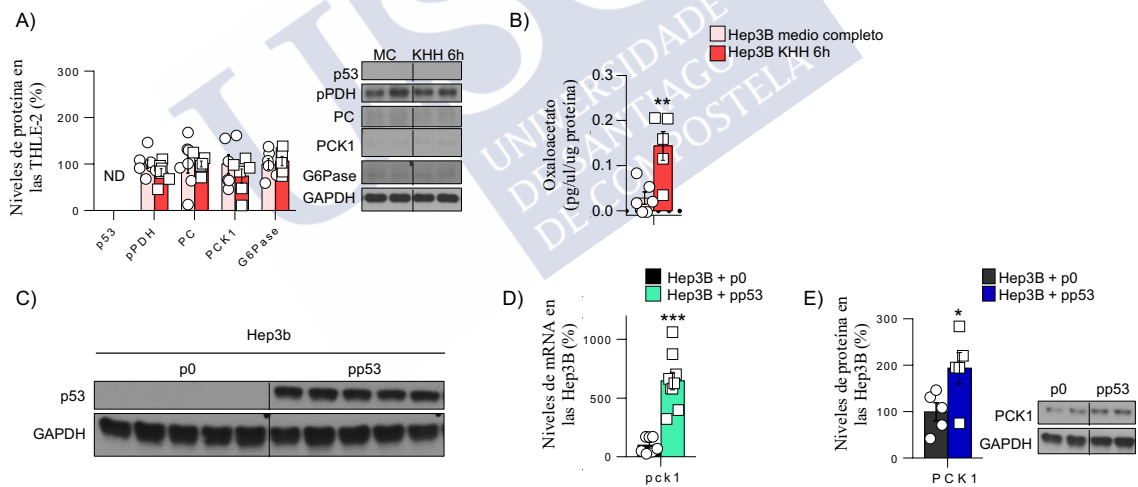


Figura 7. PCK1 no se regula durante el ayuno en las células Hep3B. A) Niveles de proteína de p53, pPDH, PC, PCK1 y G6Pase en las células Hep3B mantenidas en medio completo o en KHH durante 6 horas (n=6 por grupo). B) Niveles de oxaloacetato en las células Hep3B mantenidas en medio completo o KHH durante 6 horas (n=6 por grupo). C) Comprobación de la eficiencia de la sobre expresión de p53 en las células Hep3B (n=5 por grupo). D) Niveles de mRNA y E) proteína de PCK1 en las células Hep3B tras la sobre expresión de p53 (n=5-8 por grupo). La expresión de GAPDH (*western blot*) y la de HPRT (qRT-PCR) han sido empleadas como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05; **P<0.01 y ***P<0.001. ND: no detectado.

Cabe destacar que cuando se recupera la expresión de p53 en las células Hep3B con el plásmido pA149S, que no se puede *O*-GlcNAcilar en la serina 149, a pesar de que se restablecen los niveles de proteína de p53 (Figura 8A), no tiene lugar la regulación de la expresión PCK1 (Figura 8B), efecto que solo ocurre con el plásmido de p53 WT (Figura 8B).

Observamos además que el incremento en los niveles de p53 que induce el ayuno no tiene lugar cuando la serina 149 está mutada y no se puede *O*-GlcNAcilar, ni tampoco la activación de la expresión de PCK1 (Figura 8C).

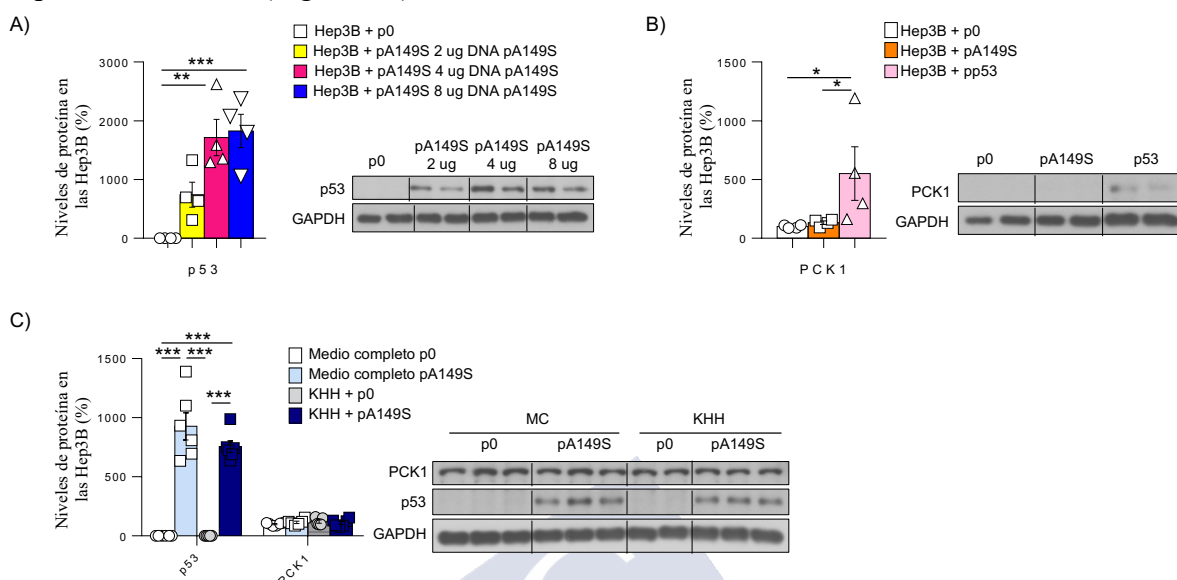


Figura 8. La *O*-GlcNAcilarción de p53 es necesaria para sus efectos sobre PCK1. A) Comprobación de la eficiencia de la recuperación de los niveles de proteína de p53 al sobre expresar el plásmido pA149S (n=4 por grupo). B) Niveles de proteína de PCK1 en las células Hep3B al recuperar los niveles de proteína de p53 con el plásmido pA149S o con el plásmido de p53 WT (pp53) (n=4 por grupo). C) Niveles de proteína de p53 y PCK1, en medio completo y en KHH, al recuperar la expresión de p53 en las células Hep3B con el plásmido pA149S (n=6 por grupo). La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05; **P<0.01 y ***P<0.001.

5.2.2 Los niveles de p53 y PCK1 correlacionan durante el ayuno *in vivo*.

En los ratones WT, los niveles de *mRNA* y de proteína de PCK1 se incrementan de forma notable a las 6 horas de ayuno, y persisten elevados hasta las 24 horas de ayuno, disminuyendo hacia los niveles basales tras la realimentación (Figura 9A). Encontramos, además, que los niveles hepáticos de p53 correlacionan positivamente con los niveles de *mRNA* y de proteína de PCK1 a las 6 horas de ayuno, y que esta correlación se mantiene positiva durante las 12 y las 24 de ayuno, hasta que finalmente desaparece tras la realimentación (Figura 9B).

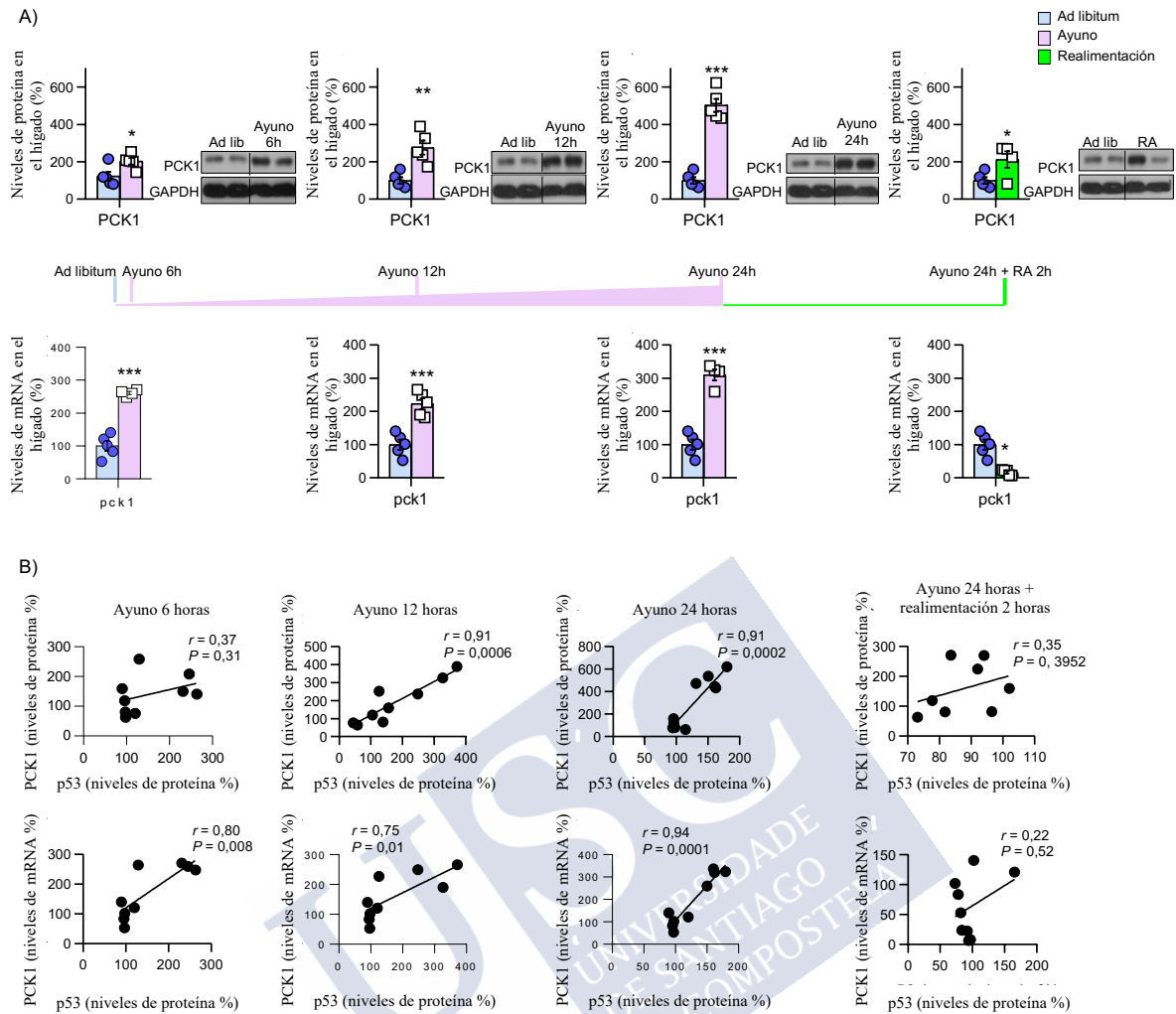


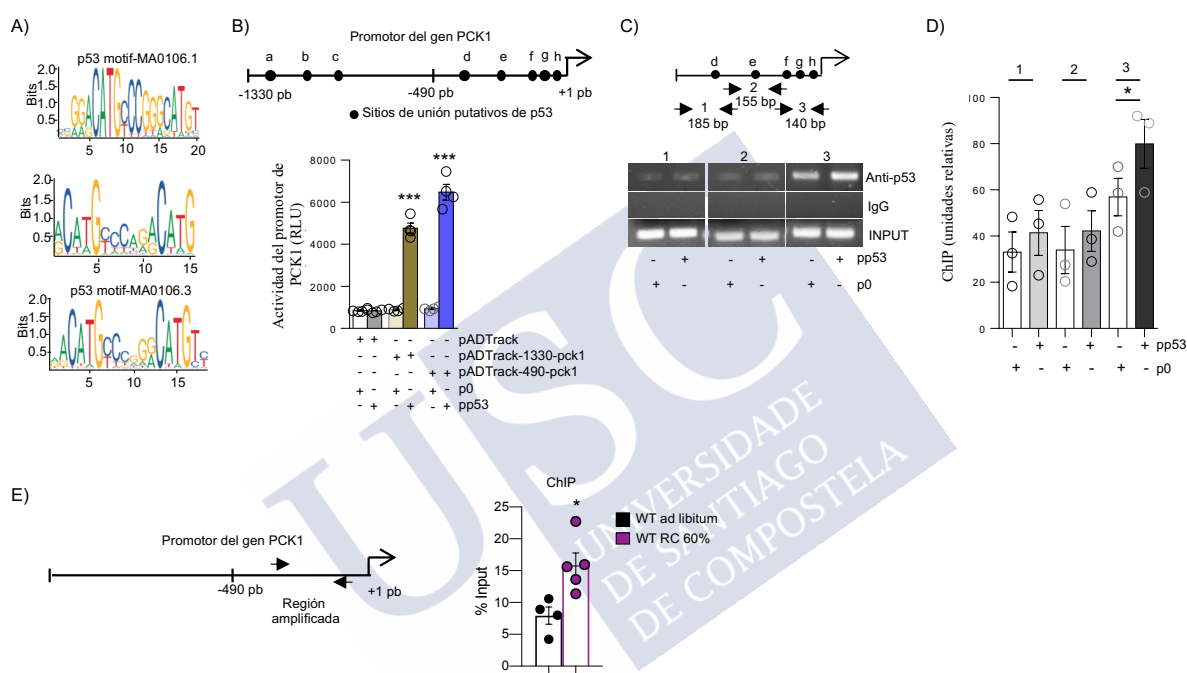
Figura 9. Los niveles de p53 y PCK1 correlacionan durante el ayuno *in vivo*. A) Niveles de proteína y mRNA en el hígado de ratones WT alimentados ad libitum, o en ayuno durante 6, 12 o 24 horas (n=4-6 por grupo). B) Correlaciones entre los niveles de proteína de p53 y los niveles de proteína y de mRNA de PCK1 durante el ayuno. La expresión de GAPDH (*western blot*) y la de HPRT (qRT-PCR) han sido empleadas como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media ± SEM. *P<0.05; **P<0.01 y ***P<0.001.

5.2.3 p53 se une al promotor de PCK1.

La correlación positiva entre los niveles de p53 y PCK1 sugieren que p53, como factor de transcripción, podría regular la expresión de PCK1. Motivados por estas evidencias, buscamos los potenciales sitios de unión para p53 localizados en la región del promotor del gen de PCK1 utilizando la base de datos de JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>), donde encontramos 3 motivos putativos para p53 (Figura 10A). Encontramos 8 elementos consenso para p53 en la región de las primeras -1330 pares de bases (pb) localizadas antes del lugar de inicio de la transcripción del promotor de PCK1 (Figura 10B). Para evaluar la capacidad de p53 para regular la transcripción de PCK1, realizamos un ensayo de actividad luciferasa en las células Hep3B, en presencia o ausencia de p53. Para ello, utilizamos dos plásmidos que expresaban la luciferasa bajo la actividad de dos fragmentos de diferente tamaño del promotor de PCK1, el plásmido pADTrack-1330-pck1 y el plásmido

pADTrack-490-pck1 [360]. Encontramos que la cotransfección de p53 con ambos plásmidos del promotor de PCK1 incrementa significativamente la actividad de la luciferasa (Figura 10B), lo que indica que el lugar de unión para p53 debe estar localizado en la región compartida por ambos plásmidos del fragmento del promotor de PCK1. Para evaluar la interacción directa entre p53 y PCK1, realizamos una inmunoprecipitación de la cromatina, que confirmó la interacción en la región más proximal del promotor de PCK1 (10C-D).

Para corroborar estos resultados obtenidos *in vitro*, realizamos un nuevo ChIP *in vivo*, en ratones WT alimentados *ad libitum* o sometidos a una restricción calórica del 60%, una condición fisiológica que promueve la gluconeogénesis hepática [41]. Encontramos que, en estas condiciones, hay un enriquecimiento en la unión de p53 al promotor de PCK1 (Figura 8E).



5.2.4 La O-GlcNAcilación promueve la gluconeogénesis a través de p53.

Para investigar en detalle la relevancia de la O-GlcNAcilación de p53 en la regulación de los niveles de PCK1, tratamos a nuestras células THLE-2 con PUGNAc, encontrando un incremento significativo de los niveles de PCK1 que, en contraste, no tiene lugar cuando silenciamos p53 (Figura 11A). De acuerdo a estos resultados, la estimulación de la O-GlcNAcilación en las células Hep3B no afecta a los niveles de PCK1, mientras que la

recuperación de la expresión de p53 en estas células permite que el efecto estimulador de PUGNAc sobre PCK1 tenga lugar (Figura 11B). En línea con estos resultados, observamos que cuando recuperamos la expresión de p53 en las células Hep3B con el plásmido pA149S, y tratamos a las células con PUGNAc, no tienen lugar ni el incremento en los niveles de p53 estimulados por el tratamiento, ni el incremento en los niveles de PCK1 (Figura 11C). Tomando nuestros datos en conjunto, observamos que p53 se une al promotor de PCK1 modulando su transcripción, siendo para ello necesaria la estabilización de p53 mediante su *O*-GlcNAcilación.

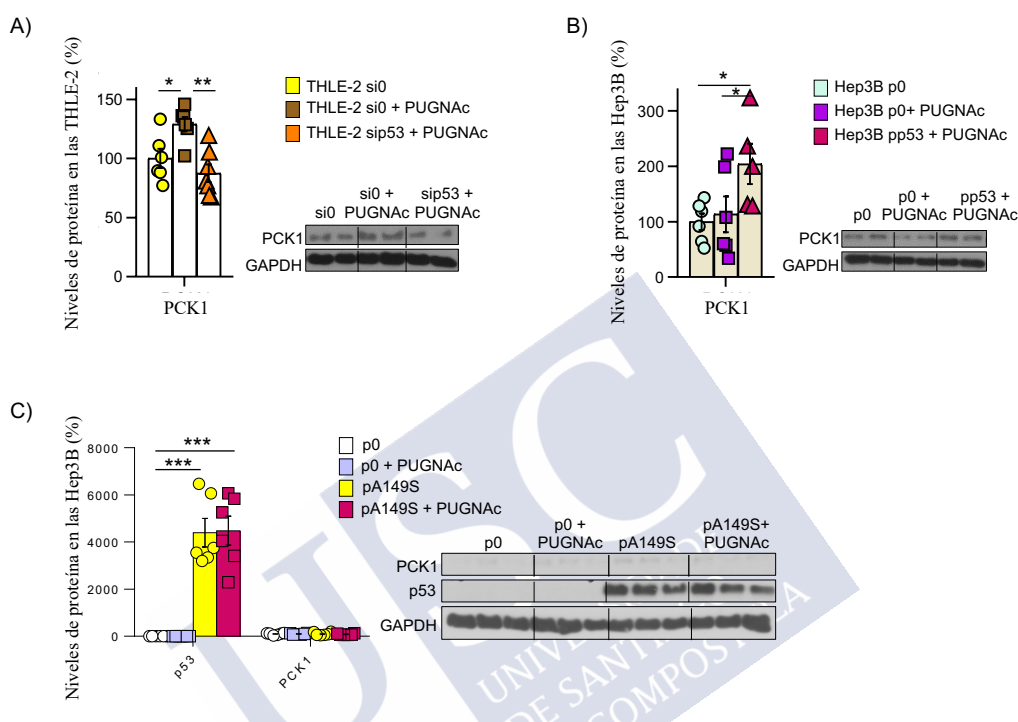


Figura 11. La *O*-GlcNAcilación promueve la expresión de PCK1 a través de p53. A) Niveles de proteína de PCK1 en las células THLE-2 tratadas con PUGNAc 75 μ M, transfectadas con el siRNA control o el siRNA para silenciar p53 (n=6 por grupo). B) Niveles de proteína de PCK1 en las células Hep3B tratadas con PUGNAc 75 μ M, transfectadas con el plásmido control o el plásmido que sobre expresa p53 (n=6 por grupo). C) Niveles de proteína de p53 y PCK1 en las células Hep3B tratadas con pugnac 75 μ M, transfectadas con el plásmido control o el plásmido pA149S (n=6 por grupo). La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

5.3 LOS RATONES QUE NO EXPRESAN P53 EN EL HÍGADO MUESTRAN UNA CAPACIDAD GLUCONEOGENÉTICA DETERIORADA.

5.3.1 Los ratones que no expresan p53 producen menos glucosa hepática.

La relación entre p53 y PCK1 que mostraron nuestros datos, nos condujo a generar dos modelos animales que no expresan p53 en el hígado, para estudiar en profundidad el papel del p53 endógeno en el metabolismo de la glucosa. Para ello, un modelo animal se generó inyectando el virus AAV8-Cre en la vena de la cola de los ratones adultos con el gen p53 floxeado (ratones floxp53) (Figura 12A-B). El otro modelo animal se generó cruzando ratones floxp53 con ratones que genéticamente expresan la recombinasa Cre bajo el control del promotor de la albúmina y el *enhancer* de la α -fetoproteína (ratones Alfp-Cre), que generan

una descendencia que carece del gen p53 específicamente en el hígado (ratones p53 HKO) (12D-E).

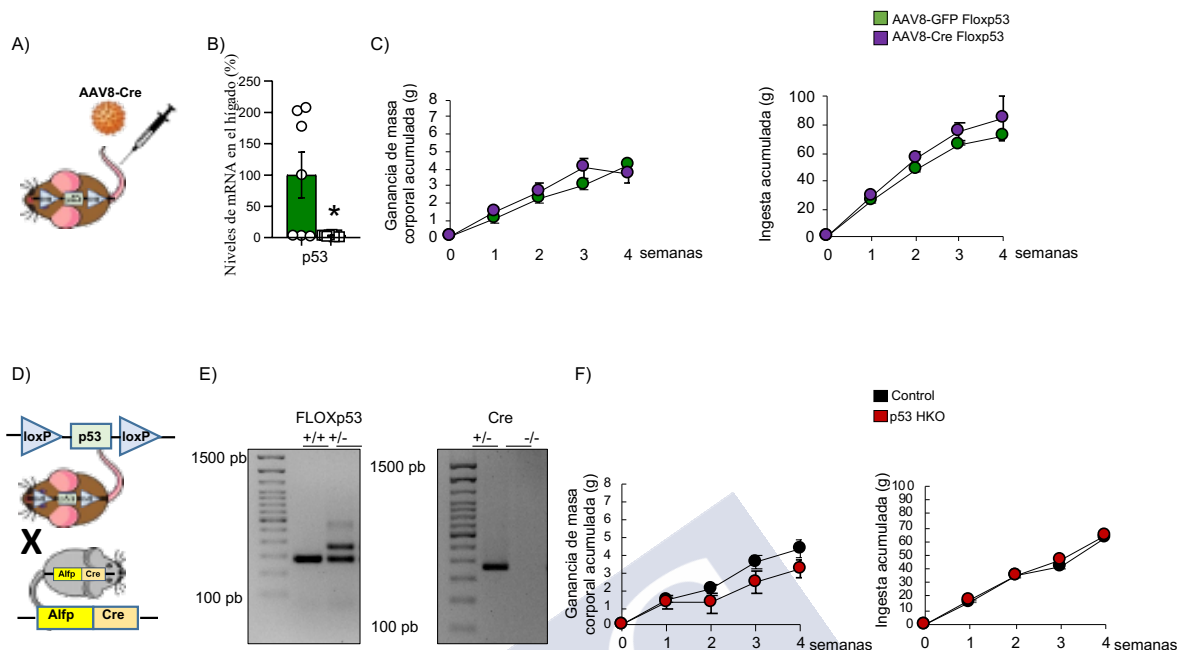


Figura 12. Generación de los modelos animales deficientes para p53 en el hígado. A) Esquema ilustrativo de la estrategia seguida para generar el modelo animal en el que se disminuyen los niveles de p53 en el hígado inyectando el virus AAV8-Cre en los ratones Floxp53. B) Niveles de p53 en los ratones Floxp53 inyectados con el virus AAV8-GFP o el AAV8-Cre un mes después de la inyección (n=8-10). C) Ganancia de masa corporal e ingesta acumulada durante las 4 semanas posteriores a la inyección de los virus. D) Esquema ilustrativo de la estrategia seguida para generar el modelo animal AlfpCre Floxp53, denominado p53 HKO, en el que los ratones Floxp53 expresan genéticamente el gen de la recombinasa Cre bajo el promotor de la albúmina. E) Genotipado de los ratones p53 HKO. F) Ganancia de masa corporal e ingesta acumulada durante las 4 semanas posteriores al destete. La expresión de HPRT ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $P < 0.05$.

Estos dos modelos animales no mostraron diferencias en ingesta ni en ganancia de masa corporal (Figura 12C y 12F), ni en la tolerancia a glucosa ni en la sensibilidad a insulina (Figura 13A-B y Figura 13E-F) respecto a sus grupos control. Sin embargo, mostraron bajos niveles de glucosa en sangre tras la administración del piruvato (Figura 13C y Figura 13G), mostrando una capacidad gluconeogénica deteriorada. Como se explicó en el apartado de la introducción, el piruvato es un sustrato gluconeogénico que se integra en la vía molecular de la gluconeogénesis a nivel del complejo de la piruvato deshidrogenasa, que lo descarboxila para generar acetil-CoA. Posteriormente, es carboxilado para generar oxaloacetato (sustrato directo de PCK1) por la piruvato carboxilasa. Para estudiar si los bajos niveles de glucosa en sangre durante la PTT se debían a un deterioro general de la gluconeogénesis, o a una disminución de la actividad de PCK1, realizamos un ensayo en el que administramos glicerol a nuestros ratones, que es un sustrato gluconeogénico que se integra en la vía molecular de la producción de glucosa en una etapa posterior a PCK1, por lo que no necesita de su actividad para estimular la producción de glucosa. No se observaron diferencias en los niveles de glucosa en sangre en nuestros modelos animales durante la GlTT (Figura 13D y Figura 13H).

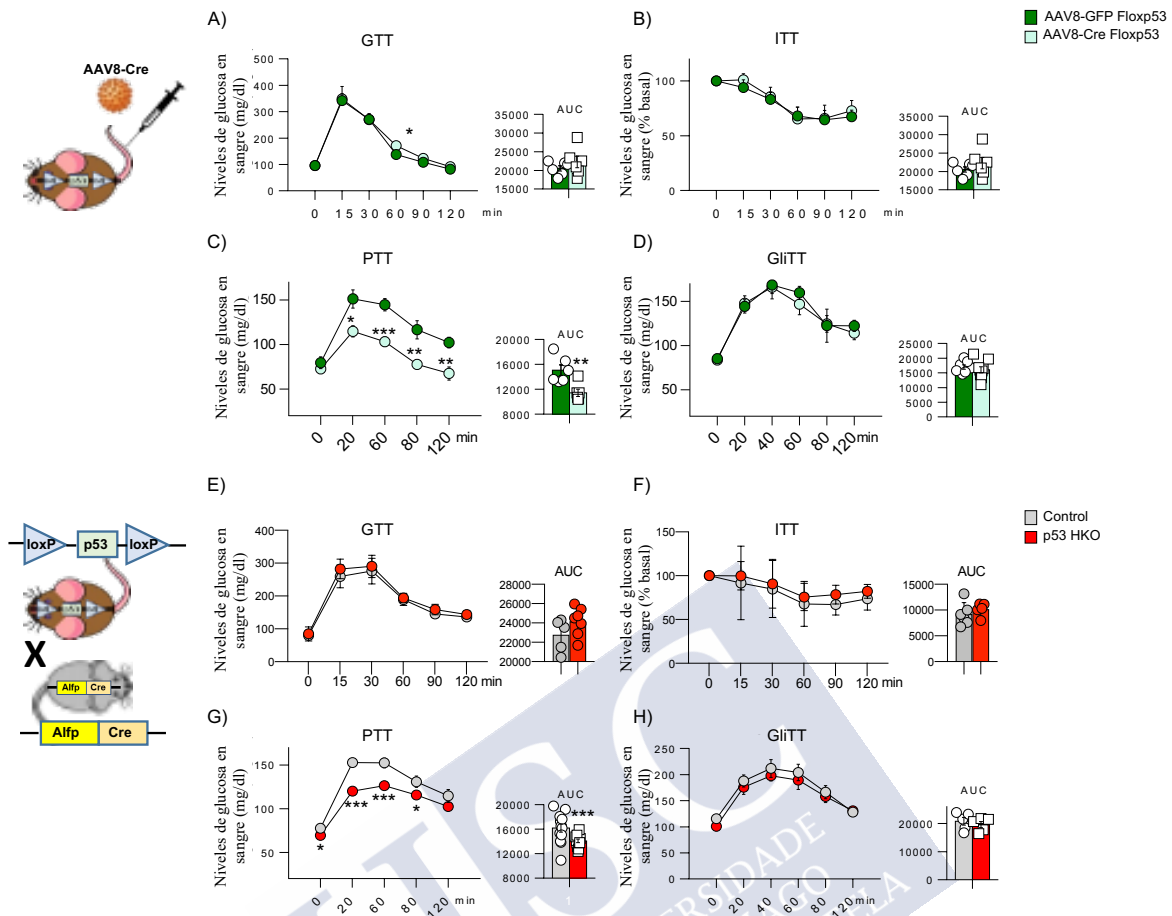


Figura 13. Efecto de la delección hepática de p53 sobre el metabolismo de la glucosa *in vivo*. A) Test de tolerancia a la glucosa (GTT), B) Test de sensibilidad a la insulina (ITT), C) test de tolerancia al piruvato (PTT) y D) test de tolerancia al glicerol (GliTT) en los ratones floxp53 inyectados con el virus AAV8-GFP o AAV8-Cre (n=8-16). E) GTT, F) ITT, G) PTT y H) GliTT en los ratones p53 HKO (n=8-14). También se representa el área bajo la curva (AUC) para cada gráfica. Los datos se presentan como media ± SEM. *P<0.05; **P<0.01 y ***P<0.001.

Cabe resaltar que estos efectos observados no son consecuencia de cambios en la apoptosis o regulación del ciclo celular causados por la falta de p53 en el hígado, ya que no se observan diferencias en las tinciones de inmunohistoquímica para la CC3 y ki67 respecto a los controles, diferencias que no obstante sí son claramente visibles en las muestras de hepatocarcinoma (Figura 14A-B).

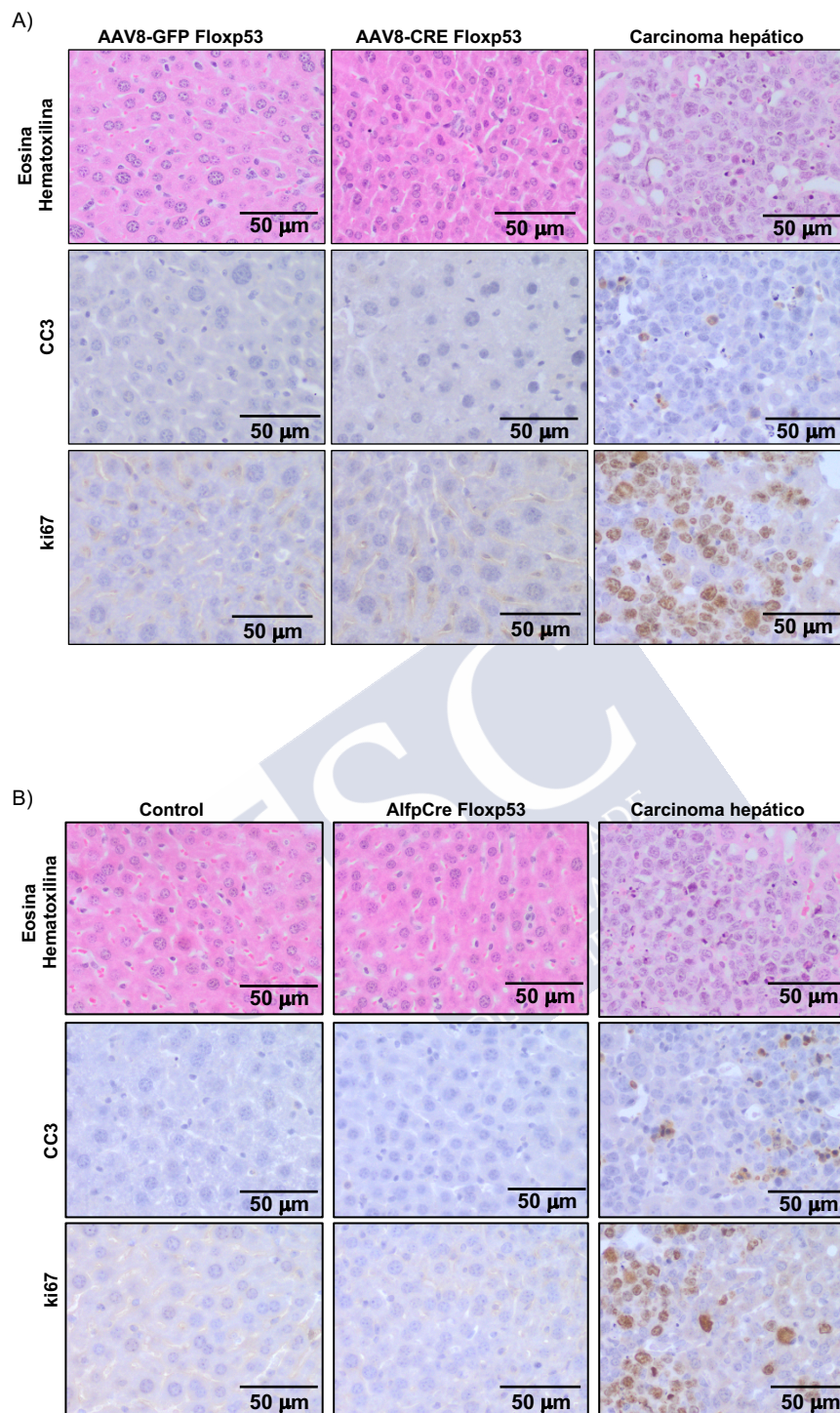


Figura 14. Inmunohistoquímica de los hígados de los modelos animales sin p53 en el hígado. A) Hematoxilina y eosina (paneles superiores), *cleaved caspase 3* (CC3) (paneles centrales) y ki67 (paneles inferiores) de los ratones floxp53 pinchados con el virus AAV8-GFP o AAV8-Cre y un control positivo de hepatocarcinoma. B) Hematoxilina y eosina (paneles superiores), *cleaved caspase 3* (CC3) (paneles centrales) y ki67 (paneles inferiores) de los ratones control o AlfpCre floxp53, y un control positivo de hepatocarcinoma.

5.3.2 La recuperación de la expresión de p53 revierte la hipoglucemia de los ratones sin p53 hepático durante la restricción calórica.

Para agregar una visión funcional a nuestros datos, sometimos a nuestros ratones a una restricción calórica del 60%, condición fisiológica que incrementa la producción hepática de glucosa. Mientras que no se apreciaron diferencias en el mantenimiento de la masa corporal y de los niveles de glucosa en sangre cuando los animales tienen acceso *ad libitum* a dieta estándar (Figura 15A-B), durante la restricción calórica los animales que no expresan p53 en el hígado no son capaces de mantener la glucemia en los mismos valores que los animales del grupo control, sufriendo una marcada hipoglucemia (Figura 15C-D). En consonancia con estos resultados, los ratones p53 HKO muestran una menor producción hepática de glucosa durante la restricción calórica (Figura 15E).

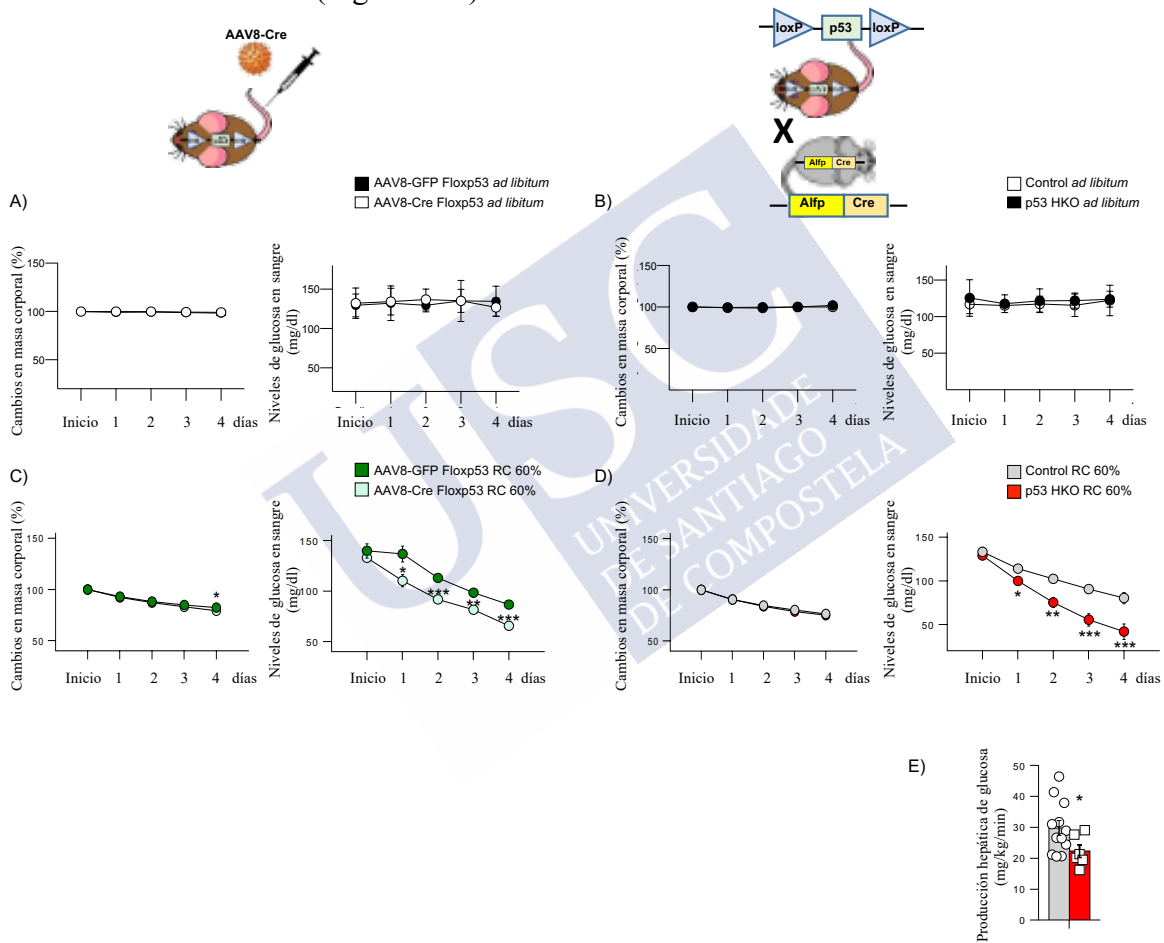


Figura 15. Los ratones sin p53 hepático desarrollan una marcada hipoglucemia durante la restricción calórica. A) Cambios en masa corporal y niveles de glucosa en sangre de los ratones Floxp53, inyectados con el virus AAV8-GFP o AAV8-Cre, alimentados *ad libitum* (n=8-12 por grupo). B) Cambios en masa corporal y niveles de glucosa en sangre de ratones control o p53 HKO alimentados *ad libitum* (n=8-12 por grupo). C) Cambios en masa corporal y niveles de glucosa en sangre de los ratones Floxp53, inyectados con el virus AAV8-GFP o AAV8-Cre, durante la restricción calórica del 60% (n=8-12 por grupo). D) Cambios en masa corporal y niveles de glucosa en sangre de ratones control o p53 HKO durante la restricción calórica del 60% (n=8-14 por grupo). E) Producción hepática de glucosa en los ratones control y los p53 HKO en el cuarto día de la restricción calórica del 60% (n=6-12 por grupo). Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05; **P<0.01 y ***P<0.001.

La recuperación específica de la expresión de p53 en el hígado de nuestros modelos animales revirtió la marcada hipoglucemia experimentada durante la restricción calórica, mostrando unos niveles de glucosa en sangre similares a los observados en el grupo control (Figura 16A-B). A nivel molecular, observamos que los cambios en los niveles de PCK1 concuerdan con los perfiles glucémicos de los diferentes grupos experimentales, siendo elevados en los ratones del grupo control sometidos a restricción calórica y que mantienen niveles de glucosa estables; mientras que en los ratones que no expresan p53 en el hígado, los niveles de PCK1 y de glucosa circulante son bajos. La recuperación de la expresión de p53 permite el incremento de nuevo de PCK1 en nuestros modelos animales durante la restricción (Figura 14C-D).

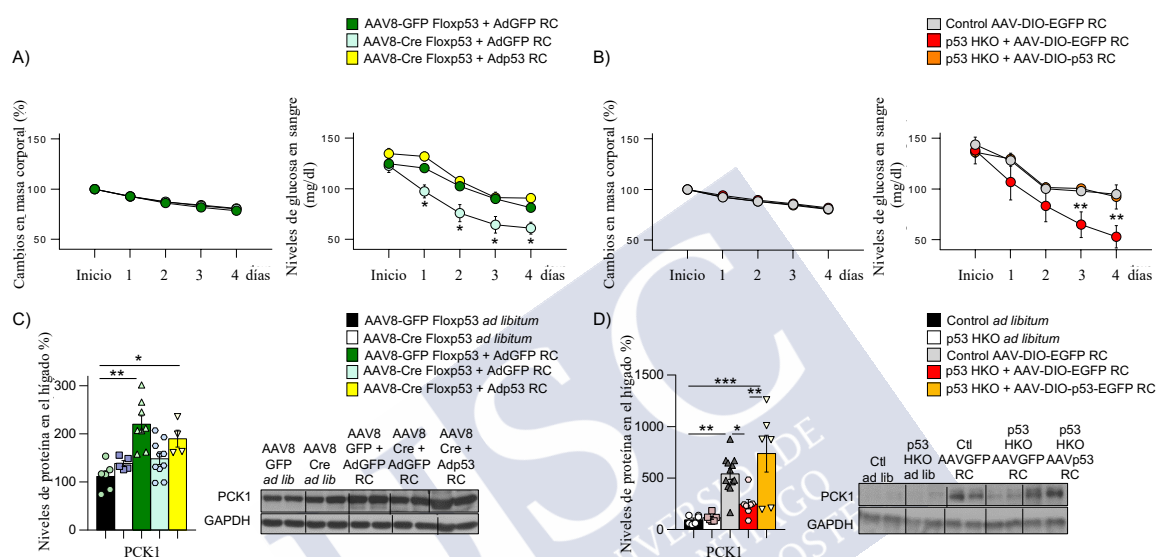


Figura 16. La recuperación de la expresión de p53 revierte la hipoglucemia sufrida durante la restricción calórica. Masa corporal y niveles de glucosa en sangre después de la recuperación de la expresión de p53 en el hígado de los ratones: A) Floxp53 inyectados con el virus AAV8-Cre (n=6-14 por grupo) y B) ratones p53 HKO (n=6-14 por grupo). C) y D) Niveles de proteína PCK1 en los grupos mencionados anteriormente. La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

Cabe destacar que nuestros modelos animales no mostraron diferencias en la glucemia después de la ingesta durante el periodo de restricción calórica, restableciendo la glicemia igual que los animales del grupo control (Figura 17A-B). Tampoco se observaron diferencias en los niveles de cuerpos cetónicos y ácidos grasos libres en suero (Figura 17C-D).

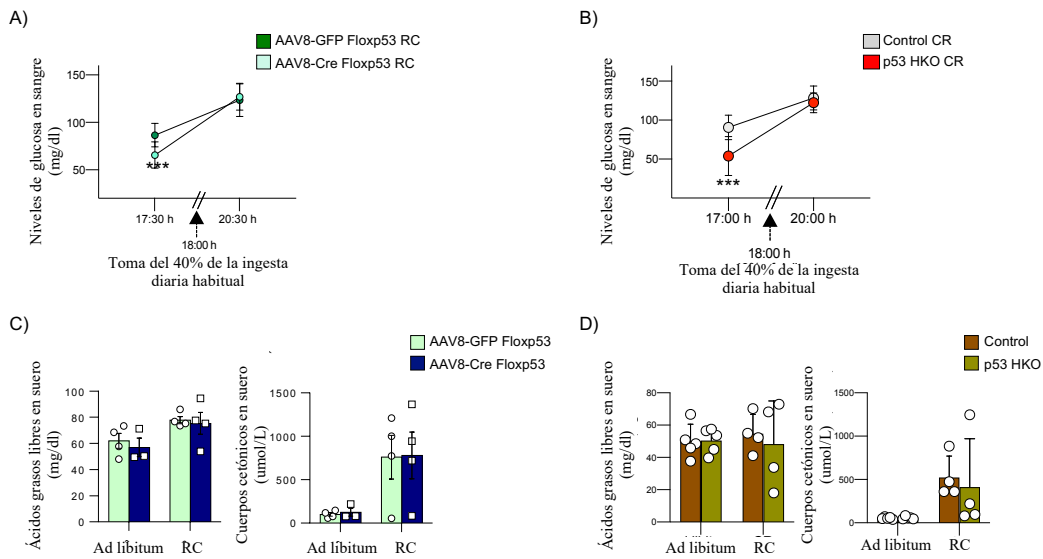


Figura 17. Los modelos de ratón sin p53 en el hígado restablecen la glucemia tras la ingesta. Niveles de glucosa antes y después de la ingesta diaria durante la restricción calórica en A) los ratones Floxp53 inyectados con el virus AAV8-GFP o AAV8-Cre y B) los ratones control y los p53 HKO (n=8-12 por grupo). C) y D) Niveles de ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos en los modelos animales anteriormente mencionados, alimentados ad libitum o sometidos a restricción calórica (n=4-6 por grupo). Los datos se presentan como media \pm SEM. ***P<0.001.

5.3.3 La sobre expresión de p53 en el hígado incrementa la gluconeogénesis hepática.

Una vez estudiado el efecto de la disminución de los niveles hepáticos de p53 en el metabolismo de la glucosa, quisimos evaluar las consecuencias de la sobre expresión específica de p53 en el hígado. Para ello, realizamos un ensayo de ganancia de función, en el que se incrementaron los niveles de p53 en el hígado de los ratones Alfp-Cre, administrando el virus AAV8-DIO-p53-EGFP, cuya actividad es dependiente de la recombinasa Cre (Figura 18A). Nuestros resultados mostraron un incremento en los niveles de glucosa circulante durante la PTT (Figura 18 C), sin cambios en la GTT, ITT, ingesta y ganancia de masa corporal (Figura 18 B-C).

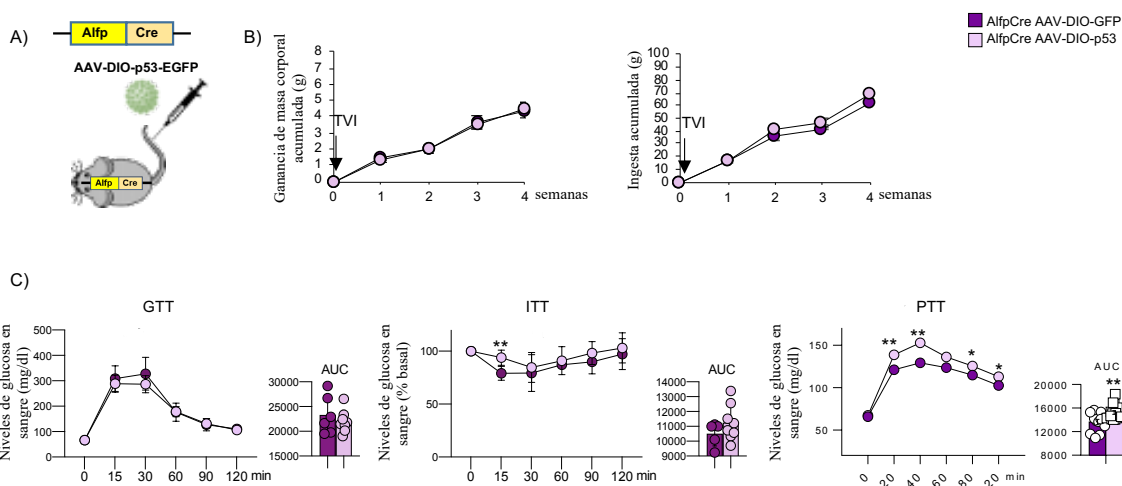


Figura 18. La sobre expresión de p53 en el hígado incrementa la producción hepática de glucosa. A) Esquema ilustrativo de la estrategia seguida para generar el modelo animal en el que se sobre expresan los niveles de p53 en el hígado inyectando el virus AAV-DIO-p53 en los ratones AlfpCre. B) Ganancia de masa corporal e ingesta acumulada durante las 4 semanas posteriores a la inyección de los virus. C) GTT, ITT y PTT en los ratones AlfpCre inyectados con el virus AAV-DIO-p53 o AAV-DIO-GFP (n=8-14). También se representa el área bajo la curva (AUC) para cada gráfica. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05 y **P<0.01.

Consistentemente, los animales con niveles hepáticos de p53 incrementados, mostraron niveles de glucosa elevados durante la restricción calórica (Figura 19B), sin que se observasen diferencias en condiciones de alimentación *ad libitum* (Figura 19A), ni tras la ingesta diaria durante la restricción calórica (Figura 19C).

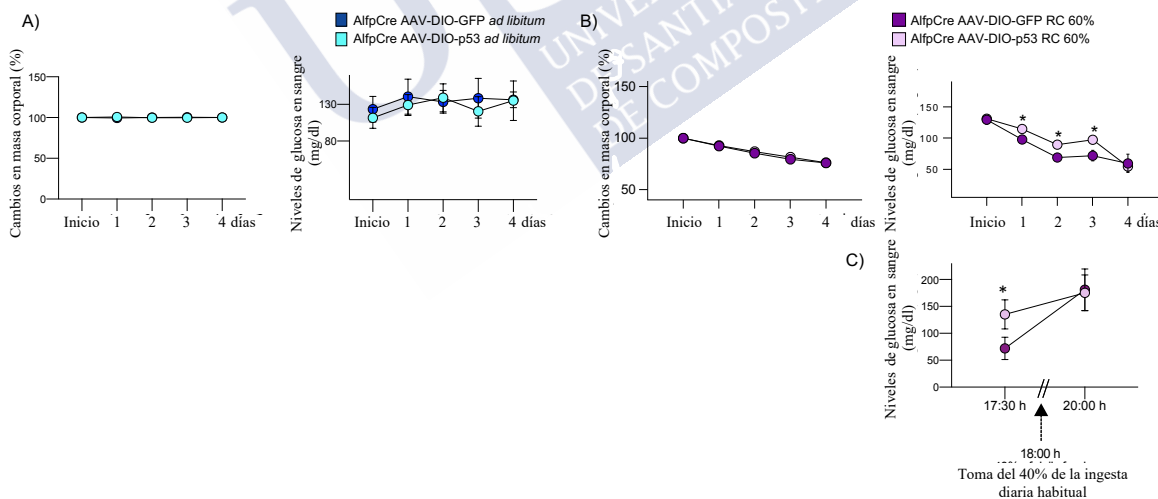


Figura 19. Los ratones que sobre expresan p53 en el hígado presentan niveles de glucosa más elevados durante la restricción calórica. Cambios en masa corporal y niveles de glucosa en sangre de los ratones AlfpCre, inyectados con el virus AAV-DIO-GFP o AAV-DIO-p53, A) alimentados *ad libitum* (n=8-12 por grupo) y B) durante la restricción calórica del 60% (n=8-12 por grupo). C) Niveles de glucosa antes y después de la ingesta diaria durante la restricción calórica. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05.

En conjunto, los resultados obtenidos en nuestros modelos de pérdida y ganancia de función, evidencian que p53 juega un papel fundamental en el control de la gluconeogénesis hepática.

5.4 p53 ES NECESARIO PARA LAS ACCIONES GLUCONEOGENICAS DEL GLUCAGÓN EN EL HÍGADO.

5.4.1 El incremento de los niveles hepáticos de p53 inducidos por el glucagón requiere de la O-GlcNAcilación

Habiendo demostrado que el p53 endógeno ejerce un papel muy importante en la regulación de la gluconeogénesis hepática, nuestro siguiente propósito fue investigar si p53 podría mediar el efecto de las hormonas contra reguladoras. El glucagón, que es secretado por las células α del páncreas cuando los niveles de glucosa circulante son bajos, estimula la producción hepática de glucosa. Al tratar a las células THLE-2 con glucagón, observamos un incremento significativo de los niveles de proteína de p53 (Figura 20A). Esta estabilización de p53 inducida por el glucagón no ocurre cuando las células son tratadas con OSMI-1 (Figura 20B), indicando que la O-GlcNAcilación media el efecto del glucagón sobre p53.

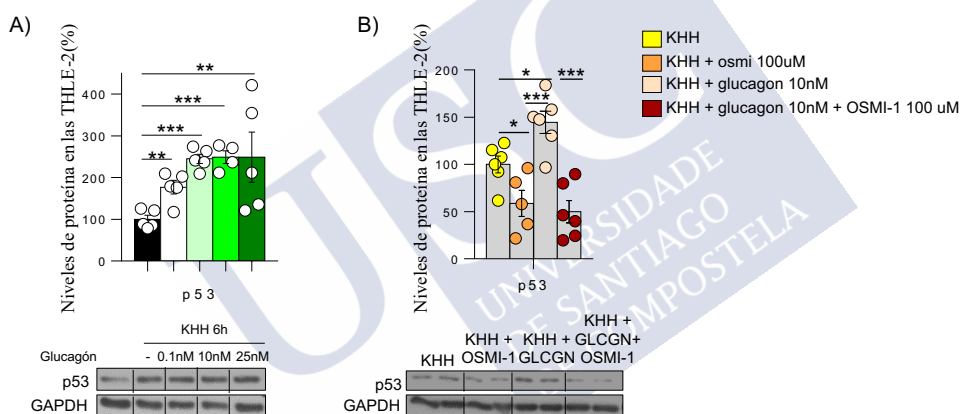


Figura 20. El glucagón incrementa los niveles de p53 a través de la O-GlcNAcilación *in vitro*. A) Niveles de proteína p53 en las células THLE-2 mantenidas en medio completo, KHH o KHH suplementado con glucagón 0.1, 10 o 25 nM (n=6). B) Niveles de proteína de p53 en las células THLE-2 mantenidas en medio KHH suplementado o no con glucagón 10 nM y OSMI-1 100 μ M (n=6). La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001.

5.4.2 El glucagón requiere de p53 para estimular la expresión y actividad de PCK1.

A continuación, evaluamos el efecto del silenciamiento de p53 en las células THLE-2 tratadas con glucagón (Figura 21A). Aunque en estas condiciones el glucagón induce la fosforilación de CREB (pCREB), no tiene lugar el incremento en los niveles de PCK1 (Figura 21A) ni en la actividad de PCK1 (Figura 21B). Por tanto, nuestros datos indican que p53 se encuentra *downstream* de pCREB en la vía molecular del glucagón que induce la actividad de PCK1. Para corroborar este hallazgo, tratamos a las células THLE-2 con forskolina que, al igual que el glucagón, incrementa los niveles intracelulares de AMPc activando a PKA. Observamos que la forskolina induce la fosforilación de CREB (sustrato de PKA) y, al igual que habíamos observado previamente con el tratamiento con glucagón, incrementa los niveles de p53 (Figura

21C). No obstante, al silenciar p53 en las células, la forskolina no es capaz de incrementar los niveles de PCK1 (Figura 21D) ni la producción de glucosa (Figura 21E).

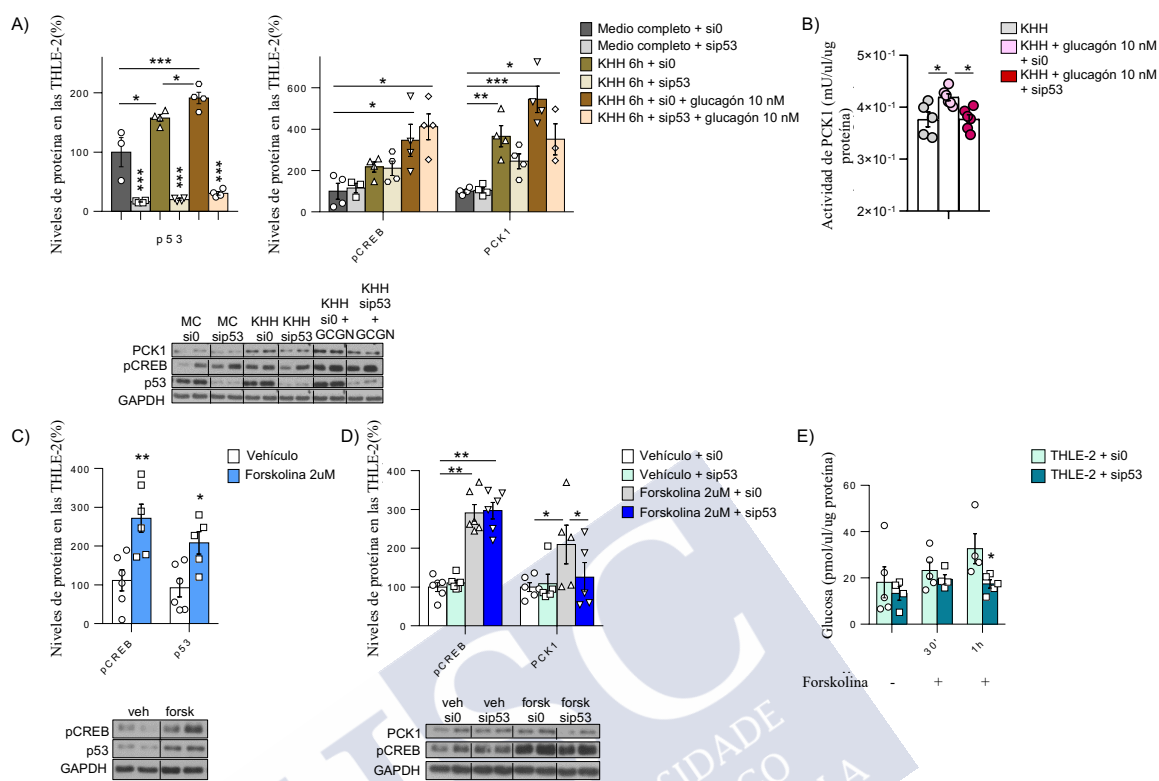


Figura 21. El glucagón requiere de p53 para estimular la expresión de p53. A) Niveles de proteína de p53, pCREB y PCK1 en las células mantenidas en medio completo, KHH o KHH + glucagón 10 nM en las células THLE-2 tratadas con el si0 o sip53 (n=6 por grupo). B) Actividad de PCK1 en las células THLE-2 mantenidas en KHH con o sin glucagón 10 nM y tratadas con el si0 o sip53 (n=6 por grupo). C) Niveles de proteína de pCREB y p53 en las células THLE-2 tratadas con vehículo o forskolina 2 μ M (n=6 por grupo). D) Niveles de proteína de pCREB y PCK1 en las células THLE-2 tratadas con si0 o sip53, y estimuladas con el vehículo o con forskolina 2 μ M (n=6 por grupo). E) Producción de glucosa en las células THLE-2 tratadas con si0 o sip53 y estimuladas con vehículo o forskolina 2 μ M (n=6 por grupo). La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001.

De acuerdo con estos datos, ni el glucagón (Figura 22A) ni la forskolina (Figura 22B) incrementan los niveles de PCK1 en las células Hep3B. Sin embargo, cuando recuperamos la expresión de p53 en estas células, la capacidad de la forskolina de incrementar los niveles de PCK1 (Figura 22C) y la producción de glucosa (Figura 22D) se restaura de nuevo. Cabe destacar que, cuando la recuperación de los niveles de p53 en las células Hep3B se realiza con el plásmido pA149S, que no se puede *O*-GlcNACilar, la forskolina es incapaz de incrementar los niveles de p53 y de PCK1 (Figura 22E)

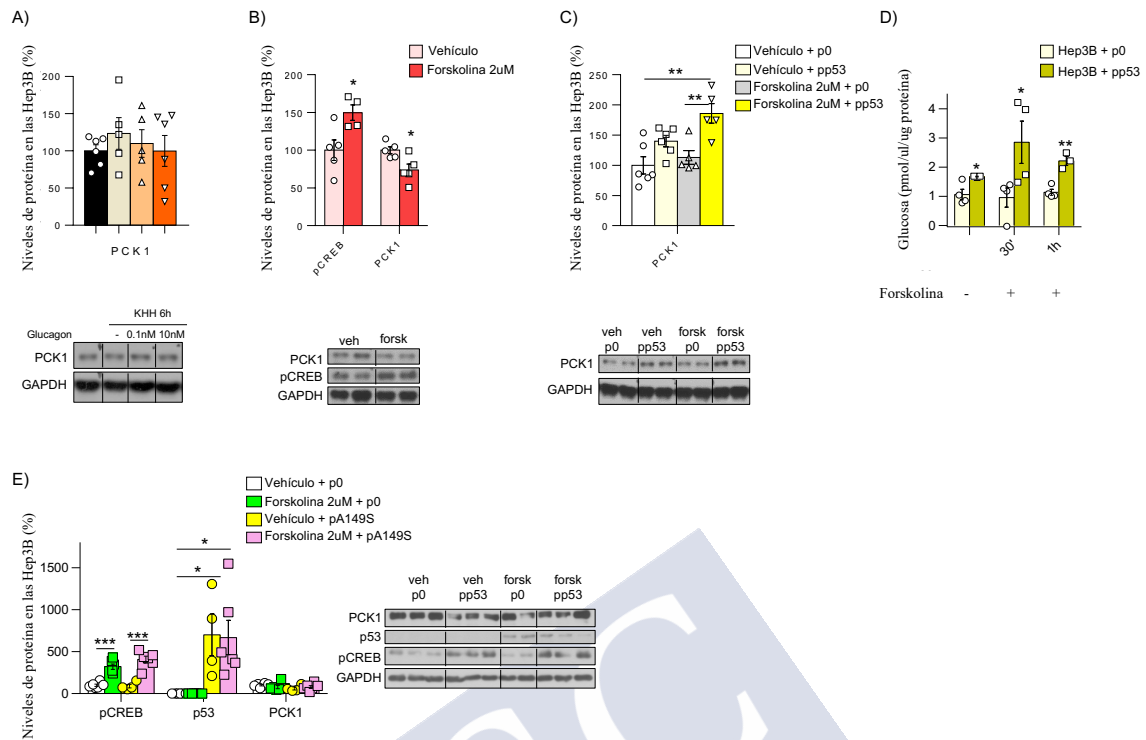


Figura 22. La forskolina requiere de p53 para estimular la expresión de PCK1 en las células Hep3B. A) Niveles de proteína de PCK1 en las células Hep3B mantenidas en medio completo, KHH, y KHH suplementado con glucagón 0.1 y 10 nM (n=6 por grupo). B) Niveles de proteína de pCREB y PCK1 en las células Hep3B tratadas con vehículo o forskolina 2 μM (n=6 por grupo). C) Niveles de proteína de PCK1 y D) glucosa en las células Hep3B transfectadas con el p0 o pp53, y tratadas con vehículo o forskolina 2 μM (n= 3-6 por grupo). E) Niveles de proteína de pCreb, p53 y PCK1 en las células Hep3B transfectadas con el p0 o pA149S, tratadas con vehículo o forskolina 2 μM (n=4-6 por grupo). La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media ± SEM. *P<0.05 y **P<0.01.

5.4.3 El glucagón requiere de p53 para estimular la producción de glucosa *in vivo*.

Para abordar en profundidad la relevancia fisiológica de nuestros datos obtenidos *in vitro*, estudiamos el efecto del glucagón sobre p53 *in vivo*. Encontramos que el glucagón incrementa los niveles hepáticos de p53 (Figura 23A), efecto que no tiene lugar en los ratones *Gcgr* *-/-* (Figura 23B), resaltando la especificidad de la vía de señalización del glucagón iniciada por la activación de su receptor en la regulación de p53. El glucagón incrementa además la O-GlcNAcilación de p53 (Figura 23C), y al tratar a nuestros dos modelos de ratones que carecen de p53 en el hígado, encontramos que el efecto hiperglucemiante del glucagón se ve seriamente comprometido (Figura 23D-E), siendo significativamente menor el incremento de glucosa en nuestros modelos animales que en los respectivos animales control.

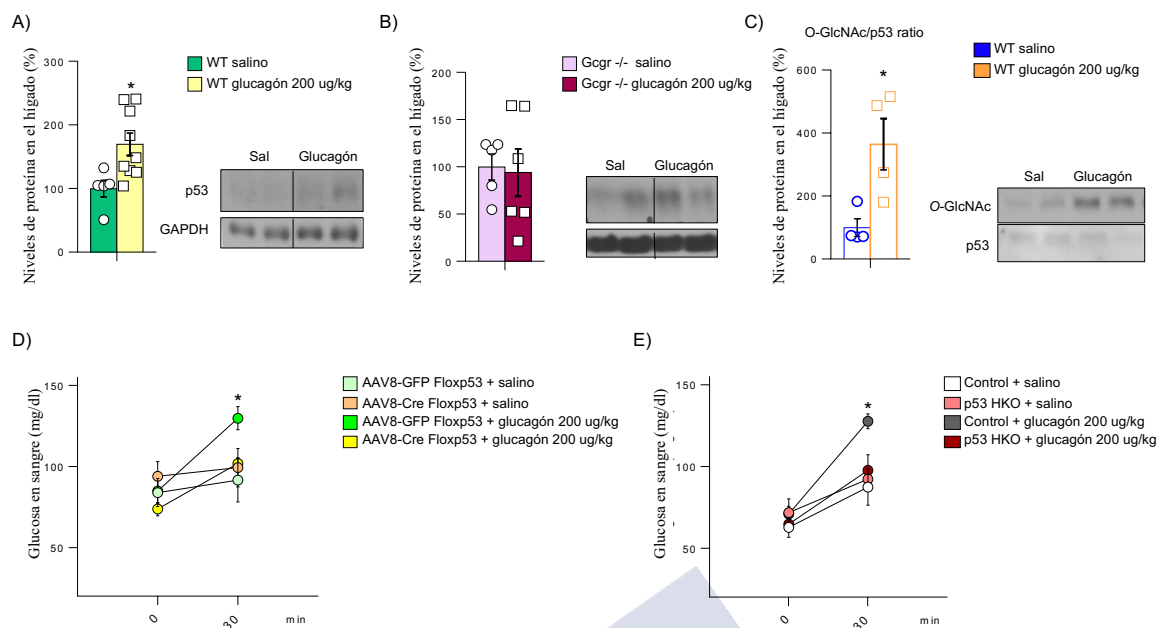


Figura 23. p53 es necesario *in vivo* para el incremento de la producción de glucosa inducido por el glucagón. Niveles de proteína p53 en A) ratones WT y B) ratones *Gcgr*^{-/-} tratados con salino o con glucagón 200 μ g/kg ip (n=5-9 por grupo). C) Niveles de O-GlcNAcilación de p53 en ratones WT tratados con salino o con glucagón 200 μ g/kg ip (n=4 por grupo). Niveles de glucosa en sangre en D) los ratones floxp53 inyectados con el virus AAV8-Cre o AAV8-GFP y E) los ratones p53 HKO o los ratones control tratados con salino o con glucagón 200 μ g/kg (n=6-10 por grupo). La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05.

De este modo, los datos obtenidos *in vivo* e *in vitro* nos indican que, tanto el glucagón como la forskolina, requieren de p53 para estimular PCK1 y aumentar la producción de glucosa hepática cuando es requerido.

5.5 p53 ES NECESARIO PARA EL EFECTO GLUCONEOGENICO DE LA ADRENALINA Y LOS GLUCOCORTICOIDES.

5.5.1 La adrenalina y los glucocorticoides incrementan los niveles de p53 en el hígado por un mecanismo dependiente de la O-GlcNAcilación.

Al igual que el glucagón, la adrenalina y los glucocorticoides son hormonas contra reguladoras muy importantes. Como se explicó en la introducción, tienen distintos mecanismos y tiempos de acción. Al igual que el glucagón, la adrenalina estimula la gluconeogénesis hepática y reduce la captación de glucosa por el músculo. Los glucocorticoides, además de inhibir la secreción de insulina, inducen la hiperglicemia mediante la estimulación de la expresión de las enzimas gluconeogénicas, y reduciendo la captación periférica de la glucosa, incrementando la resistencia a insulina. Al tratar a las células THLE-2 con adrenalina e hidrocortisona, observamos un incremento significativo de los niveles de proteína de p53 (Figura 24A-C). Cabe destacar que la estabilización de p53 inducida por la adrenalina y la hidrocortisona es inhibida al tratar a las células con OSMI-1 (Figura 24B-D), indicando que los efectos de estas hormonas sobre p53 son mediados por la O-GlcNAcilación.

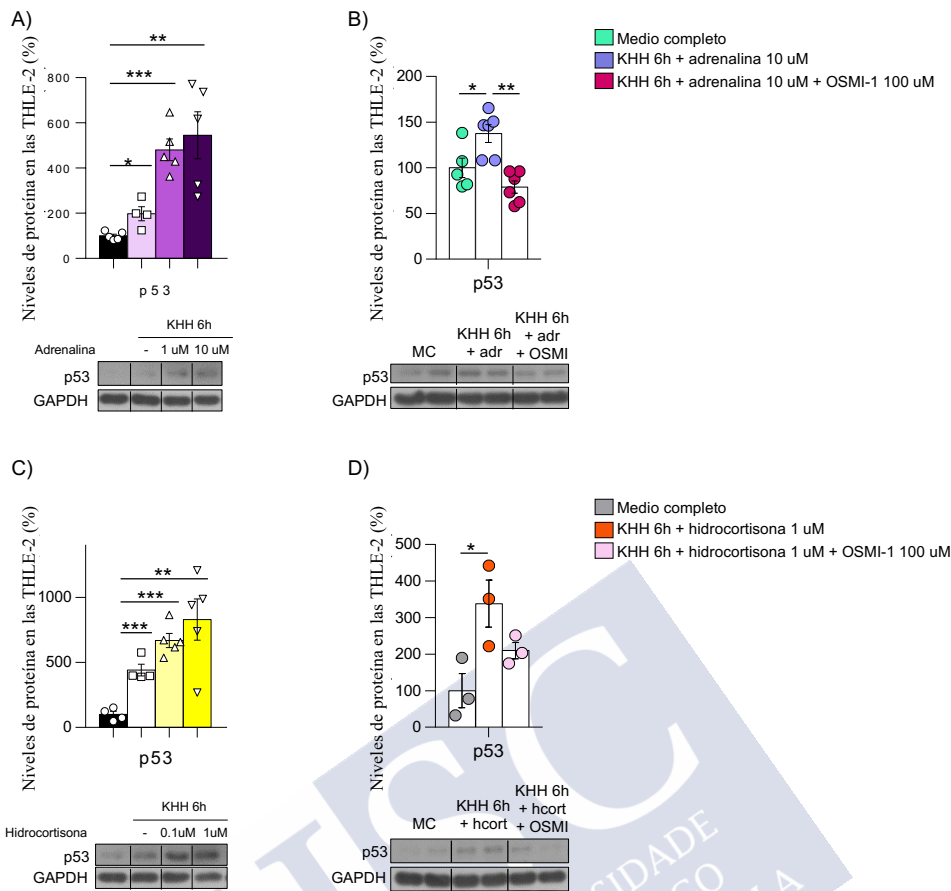


Figura 24. La adrenalina y el cortisol incrementan los niveles de p53 in vitro a través de la O-GlcNAcilación. A) Niveles de proteína de p53 en las células THLE-2 mantenidas en medio completo, en KHH o en KHH suplementado con adrenalina 1 y 10 μ M durante 6 horas (n=6 por grupo). B) Niveles de proteína de p53 en las células THLE-2 mantenidas en medio completo o en KHH suplementado o no con adrenalina 10 μ M y OSMI-1 100 μ M (n=6 por grupo). C) Niveles de proteína p53 en las células THLE-2 mantenidas en el medio completo, KHH o KHH suplementado con hidrocortisona 0.1 o 1 μ M durante 6 horas (n=6 por grupo). D) Niveles de proteína p53 en las células THLE-2 mantenidas en el medio completo o en KHH suplementado o no con hidrocortisona 1 μ M y OSMI-1 100 μ M (n=6 por grupo). La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001.

5.5.2 La adrenalina y los glucocorticoides requieren de p53 para estimular la expresión y actividad de PCK1.

A continuación, estudiamos el efecto del silenciamiento de p53 en las acciones de la adrenalina y los glucocorticoides sobre la gluconeogénesis hepática. Encontramos que ni la adrenalina ni la hidrocortisona son capaces de incrementar los niveles de PCK1 ni su actividad en ausencia de p53 (Figura 25A-C-D). En consonancia con estos resultados, estas hormonas tampoco son capaces de inducir un incremento de los niveles de PCK1 en las células Hep3B (Figura 25B-E).

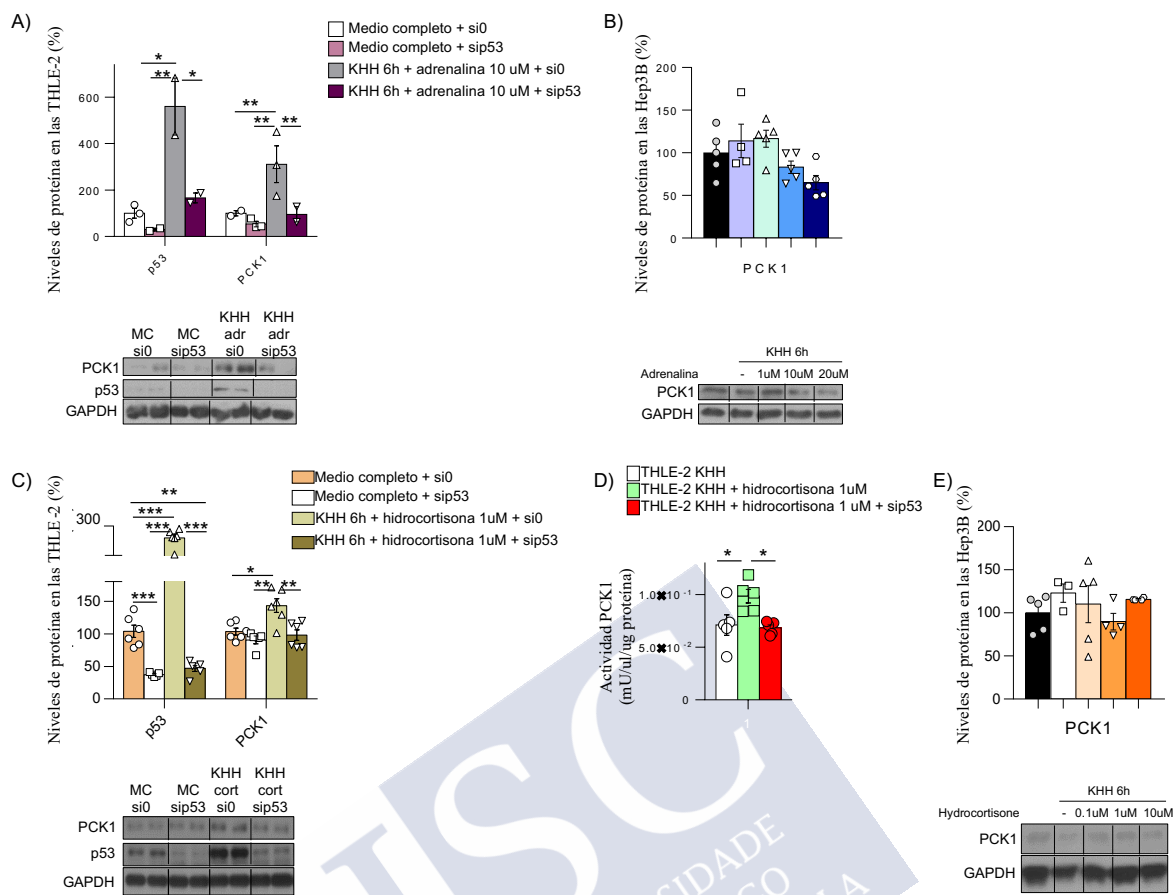


Figura 25. La adrenalina y los glucocorticoides requieren de p53 para estimular la expresión de PCK1 *in vitro*. A) Niveles de proteína de p53 y PCK1 en las células mantenidas en medio completo o en KHH suplementado con adrenalina 10 μM en las células THLE-2 tratadas con si0 o sip53 ($n=3$ por grupo). B) Niveles de proteína PCK1 en las células Hep3 B mantenidas en medio completo, KHH o KHH suplementado con adrenalina 1, 10 y 20 μM . C) Niveles de proteína de p53 y PCK1 en las células mantenidas en medio completo o en KHH suplementado con hidrocortisona 1 μM en las células THLE-2 tratadas con si0 o sip53 ($n=6$ por grupo). D) Actividad de PCK1 en las células THLE-2 tratadas o no con hidrocortisona y transfectedas con el si0 o sip53 ($n=6$ por grupo). E) Niveles de proteína PCK1 en las células Hep3B mantenidas en medio completo, KHH o KHH suplementado con hidrocortisona 0.1, 1 y 10 μM . La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ y *** $P<0.001$.

5.5.3 La adrenalina y los glucocorticoides requieren de p53 para estimular la producción de glucosa *in vivo*.

Al estudiar el efecto de la adrenalina y los glucocorticoides sobre p53 *in vivo*, encontramos que ambas hormonas incrementan los niveles de p53 en el hígado (Figura 26A-C). La relevancia fisiológica de estos datos fue respaldada con nuestros modelos animales que no expresan p53 en el hígado, quienes producen significativamente menos glucosa tras el tratamiento con adrenalina e hidrocortisona (Figura 26B-D). Por lo tanto, nuestros resultados señalan que p53 es un factor de transcripción imprescindible para que el glucagón, la adrenalina y el cortisol induzcan de forma completa la expresión de PCK1 y, por tanto, tenga lugar la producción necesaria de glucosa hepática.

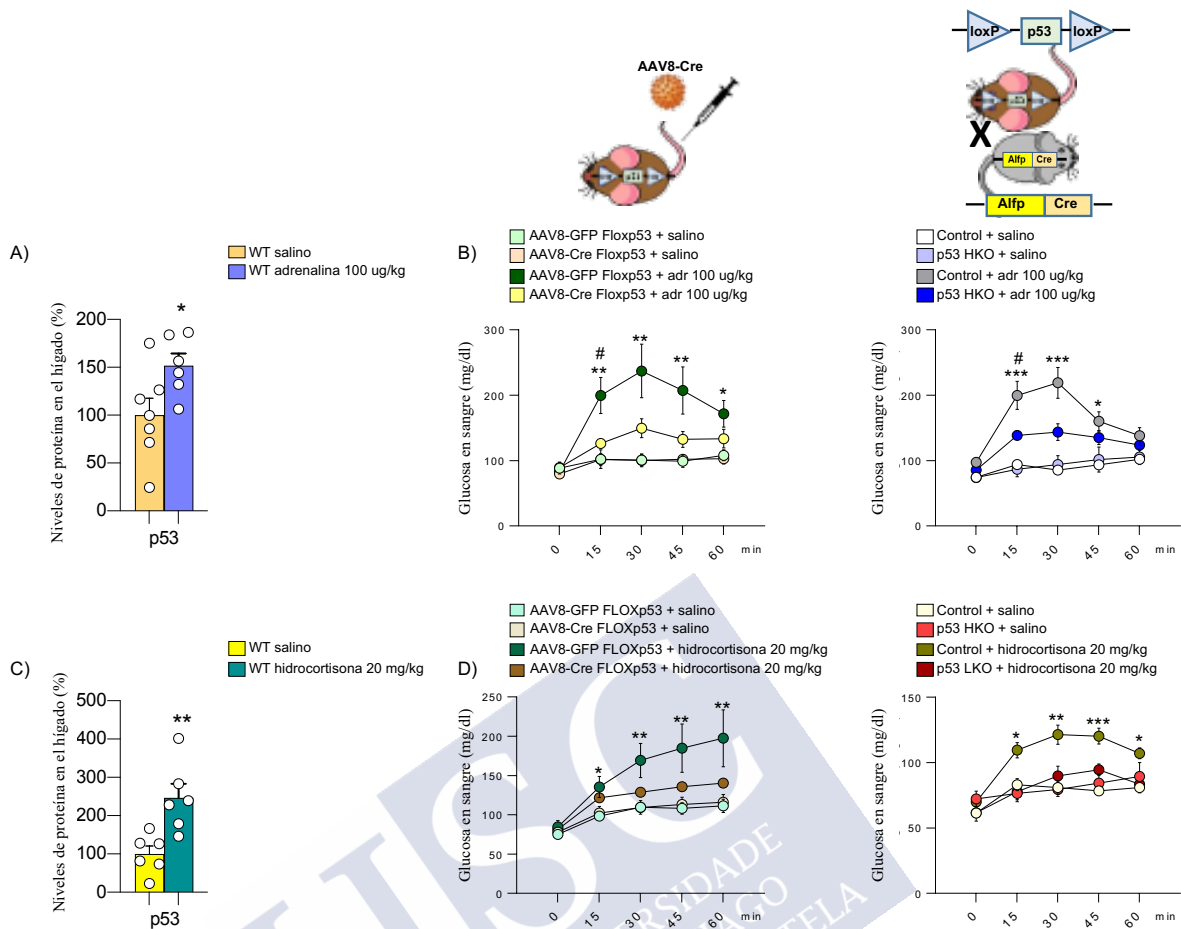


Figura 26. La adrenalina y los glucocorticoides necesitan de p53 hepático para inducir la producción de glucosa. A) Niveles de proteína de p53 en los ratones WT tratados con salino o con adrenalina 100 µg/kg (n=6 por grupo). B) Niveles de glucosa en sangre en los ratones floxp53 inyectados con el virus AAV8-GFP o AAV8-Cre, y en los ratones control y p53 HKO, tratados con salino o con adrenalina 100 µg/kg (n=8-12 por grupo). C) Niveles de proteína de p53 en los ratones WT tratados con salino o con hidrocortisona 20 mg/kg (n=6 por grupo). D) Niveles de glucosa en sangre en los ratones floxp53 inyectados con el virus AAV8-GFP o AAV8-Cre, y en los ratones control y p53 HKO, tratados con salino o con hidrocortisona 20 mg/kg (n=8-12 por grupo). La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media ± SEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001.

5.6 LA SOBRE EXPRESIÓN DE P53 EN LOS HEPATOCITOS REDUCE LA SENSIBILIDAD A INSULINA.

5.6.1 La insulina regula negativamente los niveles de proteína de p53 en los hepatocitos.

Una vez demostrado que p53 es esencial para el efecto gluconeogénico de las principales hormonas contrarreguladoras, nuestro siguiente objetivo fue investigar su función en las acciones de la insulina. Como se explicó en detalle en la introducción, la insulina es la principal hormona hipoglucemiante. Principalmente, ejerce su efecto promoviendo la captación de glucosa en el músculo y en el tejido adiposo, e inhibiendo la gluconeogénesis hepática [361]. Al tratar con insulina a nuestras células THLE-2 sometidas a ayuno, observamos una disminución de los niveles de p53 de un modo dependiente de la dosis (Figura 27A), así como una disminución de los niveles de PCK1 (Figura 27B).

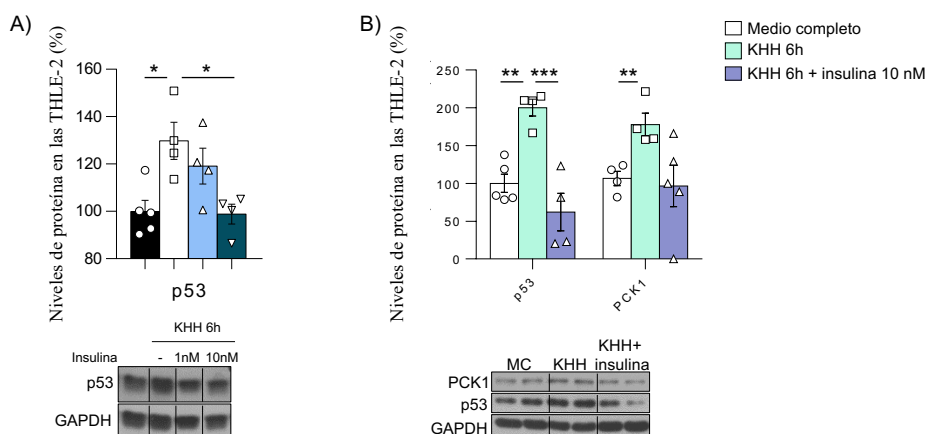


Figura 27. La insulina regula negativamente los niveles hepáticos de p53. A) Niveles de proteína p53 en las células THLE-2 mantenidas en medio completo, en KHH, o en KHH suplementado con insulina 1 o 10 nM (n=4-5 por grupo). B) Niveles de proteína de p53 y PCK1 en las células THLE-2 mantenidas en medio completo, o en KHH suplementado o no con insulina 10 nM (n=4-6 por grupo). La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001.

5.6.2 La sobre expresión de p53 en los hepatocitos genera resistencia a insulina.

Al sobre expresar p53 en los hepatocitos, la insulina pierde la capacidad de inhibir los niveles de proteína y la actividad de PCK1 (Figura 28A-B), y de reducir la producción hepática de glucosa (Figura 28C). Asimismo, cuando el incremento de los niveles de p53 tiene lugar con el tratamiento con PUGNAc, que induce la *O*-GlcNAcilación, y un incremento de los niveles de proteína de p53, se obtiene el mismo resultado, observando que de nuevo la insulina no es capaz de reducir los niveles de PCK1 (Figura 28D).

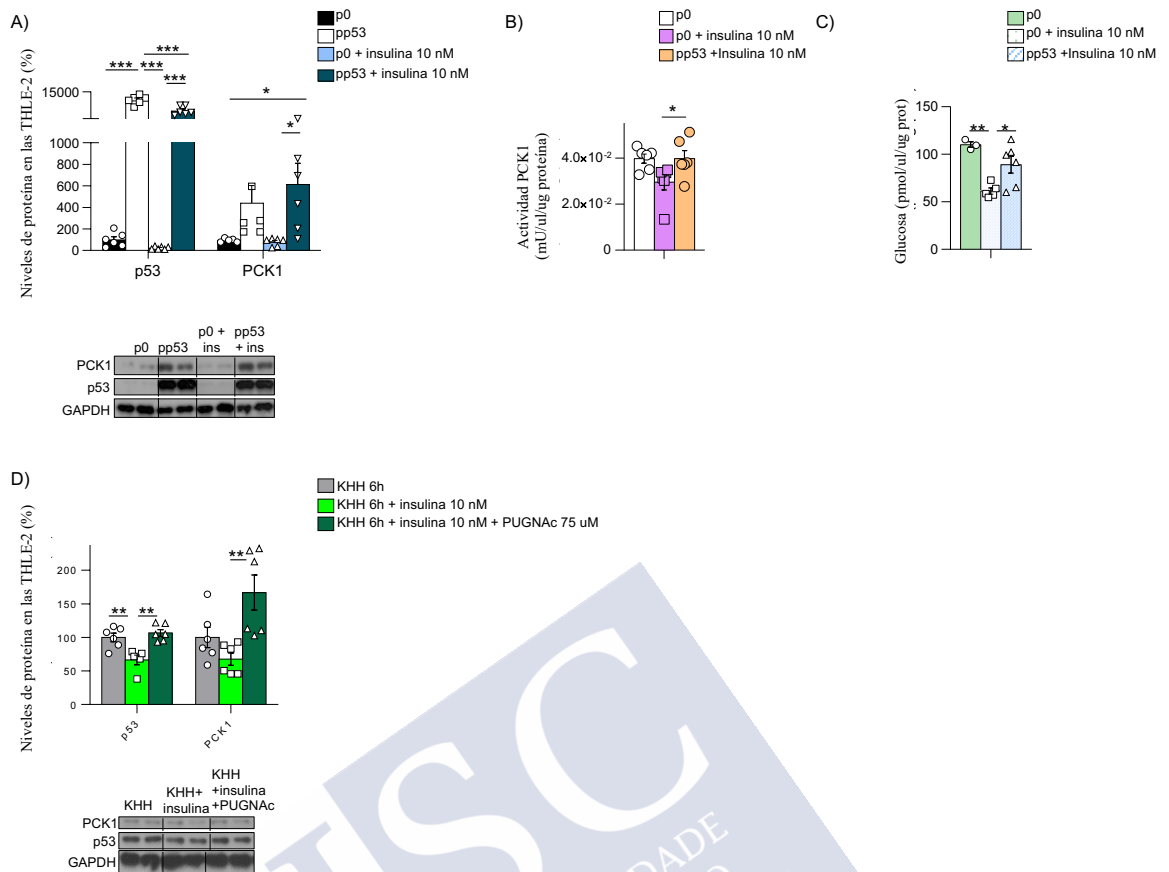


Figura 28. Niveles elevados de p53 generan resistencia a insulina *in vitro*. A) Niveles de proteína de p53 y PCK1 en las células THLE-2 transfectadas con el p0 o pp53 y tratadas con salino o insulina 10 nM (n=6 por grupo). B) Actividad de PCK1 y C) producción de glucosa en las células transfectadas con el p0 o pp53, en presencia o ausencia de insulina 10 nM (n=6 por grupo). D) Niveles de proteína de p53 y PCK1 en las células THLE-2 mantenidas en KHH durante 6 horas, en presencia o ausencia de insulina 10 nM y PUGNac 75 μ M (n=6 por grupo). La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001.

Dado que AKT es una kinasa específica involucrada en la vía molecular de la insulina que inhibe la gluconeogénesis, lo siguiente que hicimos fue tratar a las células THLE-2 con sc79, un activador farmacológico de AKT. Observamos que el tratamiento con sc79 incrementó los niveles de pAKT, y disminuyó los niveles de p53 y PCK1 (Figura 29A-B). Sin embargo, la sobre expresión de p53 anuló la capacidad del sc79 de inhibir a PCK1, corroborando así los datos obtenidos previamente con el tratamiento con la insulina.

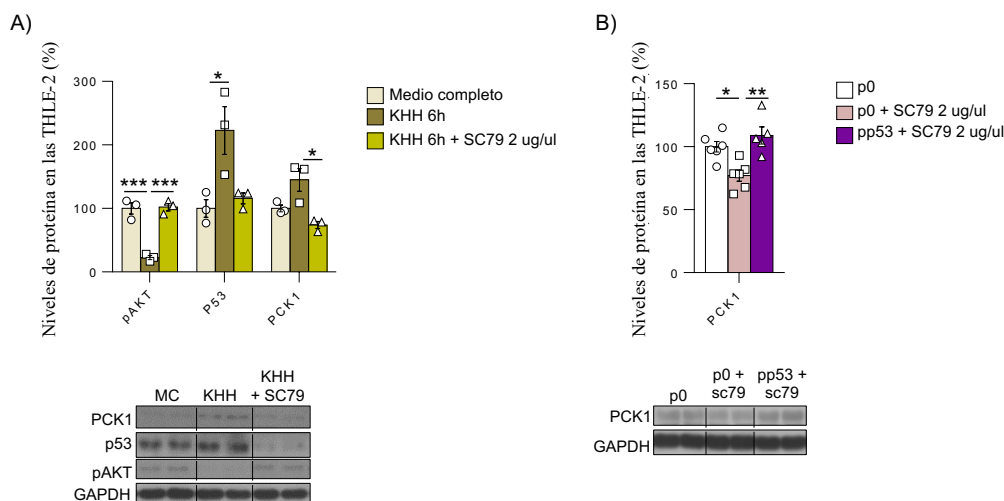


Figura 29. La insulina regula negativamente los niveles de proteína de p53 a través de AKT. A) Niveles de proteína de pAKT, p53 y PCK1 en las células THLE-2 mantenidas en medio completo, o en KHH suplementado o no con SC79 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (n=3 por grupo). B) Niveles de proteína de PCK1 en las células THLE-2 transfectadas con p0 o pp53 y tratadas con vehículo o SC79 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (n=6 por grupo). La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001.

5.6.3 La sobre expresión de p53 en el hígado genera resistencia a insulina *in vivo*.

En línea con los resultados obtenidos *in vitro*, observamos un incremento significativo de los niveles de PCK1 al sobre expresar p53 en el hígado de los ratones WT (Figura 30A-B). Al realizar un ensayo para evaluar la sensibilidad a insulina específicamente en el hígado, administrando la insulina directamente en la vena cava, observamos que, a pesar de la activación de pAKT, la insulina no es capaz de inhibir los niveles de PCK1 cuando se sobre expresa p53 (Figura 30C-D). Para corroborar estos hallazgos, generamos un segundo modelo animal, en el que sobre expresamos p53 específicamente en los hepatocitos, inyectando los virus AAV-DIO-EGFP o AAV-DIO-p53-EGFP en los ratones Alfp-Cre. Al inyectar insulina en estos ratones, observamos que disminuyen los niveles de glucosa en sangre en los ratones del grupo control (Figura 30E-F). Sin embargo, este efecto hipoglucémico no ocurre en los animales donde sobre expresamos p53 (Figura 30F), quienes, además, muestran niveles de PCK1 persistentemente elevados al administrar insulina directamente en la vena cava (Figura 30G-H). Conjuntamente, nuestros datos muestran que la insulina activa la vía de AKT para disminuir los niveles de p53, para así inhibir la expresión de PCK1 y reducir la producción de glucosa hepática.

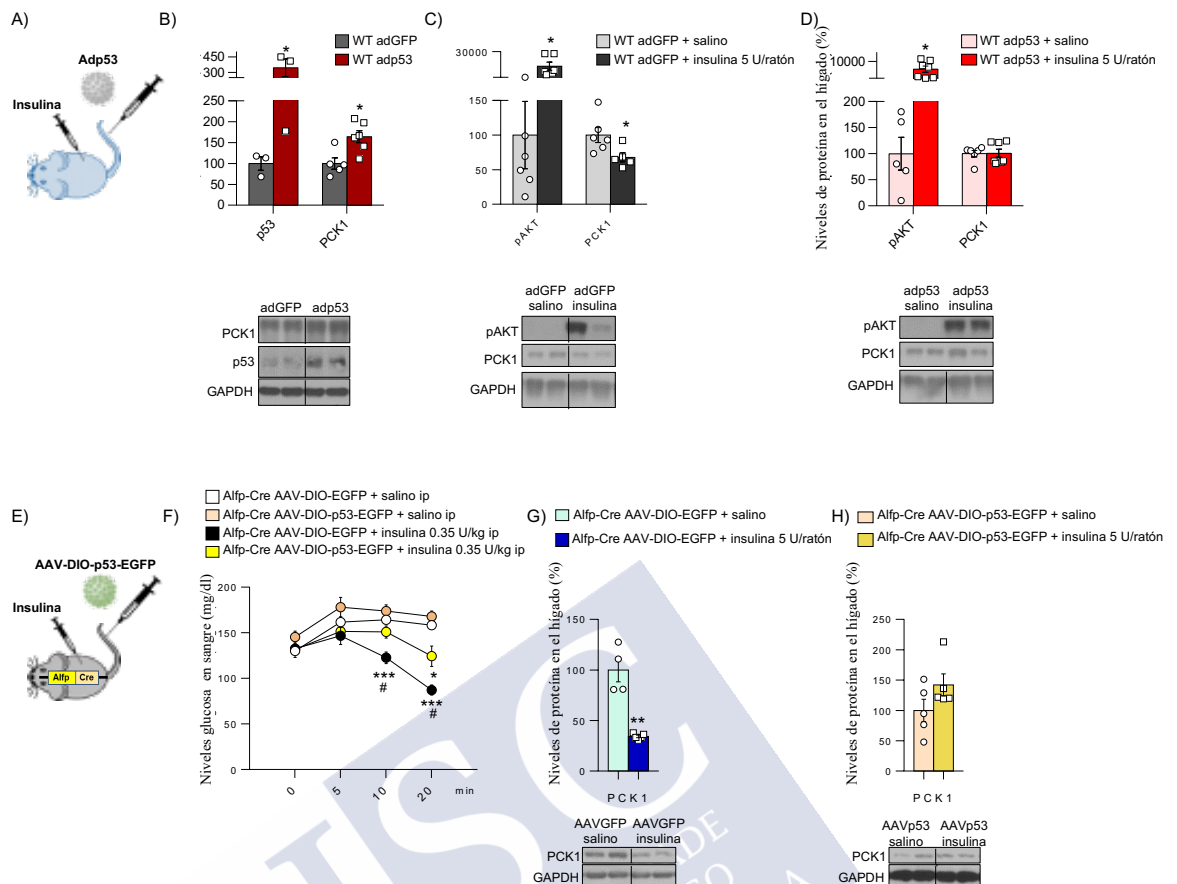


Figura 30. La sobre expresión de p53 *in vivo* genera resistencia a insulina. A) Representación esquemática de la estrategia seguida para generar el modelo animal en el que se sobre expresan los niveles de p53 en el hígado inyectando el adenovirus adp53 en los ratones WT. El virus adGFP se inyecta como control. B) Niveles de proteína de p53 y PCK1 en los ratones WT inyectados con el adGFP o adp53 (n=3-6 por grupo). C) Niveles de proteína de pAKT y PCK1 en los ratones WT inyectados con el virus adGFP, y tratados con salino o insulina 5 U/ratón en la vena cava (n=6-8 por grupo). D) Niveles de proteína de pAKT y PCK1 en los ratones WT inyectados con el virus adp53, y tratados con salino o insulina 5 U/ratón en la vena cava (n=5-8 por grupo). E) Representación esquemática de la estrategia seguida para generar el modelo animal en el que se sobre expresan los niveles de p53 en el hígado inyectando el AAV-DIO-p53-EGFP en los ratones Alfp-Cre. El virus AAV-DIO-EGFP se inyecta como control. F) Niveles de glucosa en sangre en los ratones Alfp-Cre inyectados con el virus AAV-DIO-EGFP o AAV-DIO-p53-EGFP y tratados ip con salino o insulina 0.35 U/kg (n=6-10 por grupo). G) Niveles de proteína de PCK1 en los ratones Alfp-Cre inyectados con el virus AAV-DIO-EGFP y tratados con salino o insulina 5 U/ratón en la vena cava (n=4-7 por grupo). H) Niveles de proteína de PCK1 en los ratones Alfp-Cre inyectados con el virus AAV-DIO-p53-EGFP y tratados con salino o insulina 5 U/ratón en la vena cava (n=5-6 por grupo). La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

5.7 P53 AFECTA A LA TOLERANCIA DE LA GLUCOSA POSTPRANDIAL Y SE ASOCIA CON LA DIABETES TIPO 2 EN HUMANOS.

5.7.1 La sobre expresión de p53 en el hígado causa hiperglicemia postprandial.

Dada la relevancia de p53 en la regulación de la sensibilidad a insulina en el hígado, nuestro siguiente objetivo fue estudiar la implicación de los niveles de p53 en la regulación de la

glicemia postprandial, un indicador fundamental de la sensibilidad a insulina, y estrechamente ligado al desarrollo de diabetes tipo 2 [362]. Para ello, indujimos la sobre expresión de p53 en los hepatocitos de los ratones *Alfp-Cre*, y realizamos un ensayo de tolerancia a la glucosa postprandial. Mientras que no se observaron diferencias en la cantidad de comida ingerida (Figura 30A), los ratones con elevados niveles hepáticos de p53 mostraron una glicemia significativamente incrementada respecto a los ratones del grupo control (Figura 30B). Se observó el mismo resultado cuando los animales se alimentaron con dieta alta en grasa, donde la sobre expresión de p53 empeoró la tolerancia a la glucosa postprandial (Figura 30C-D).

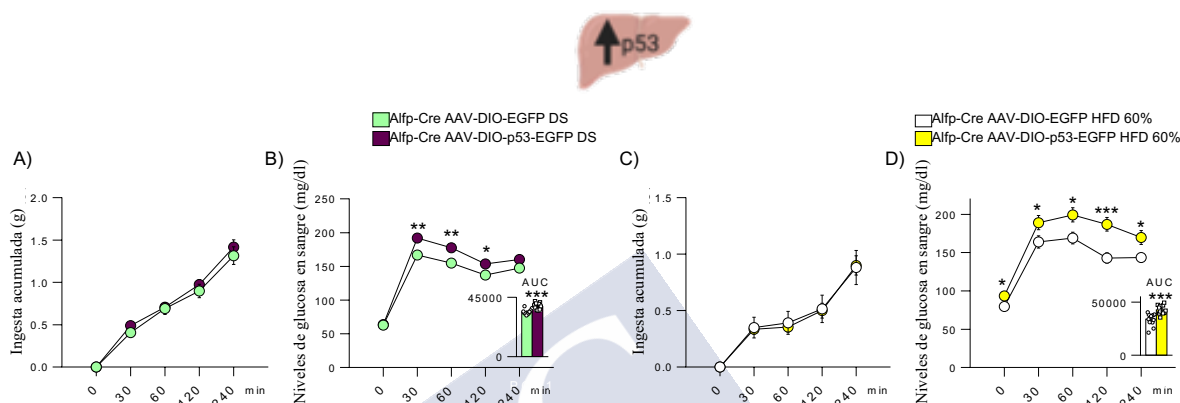
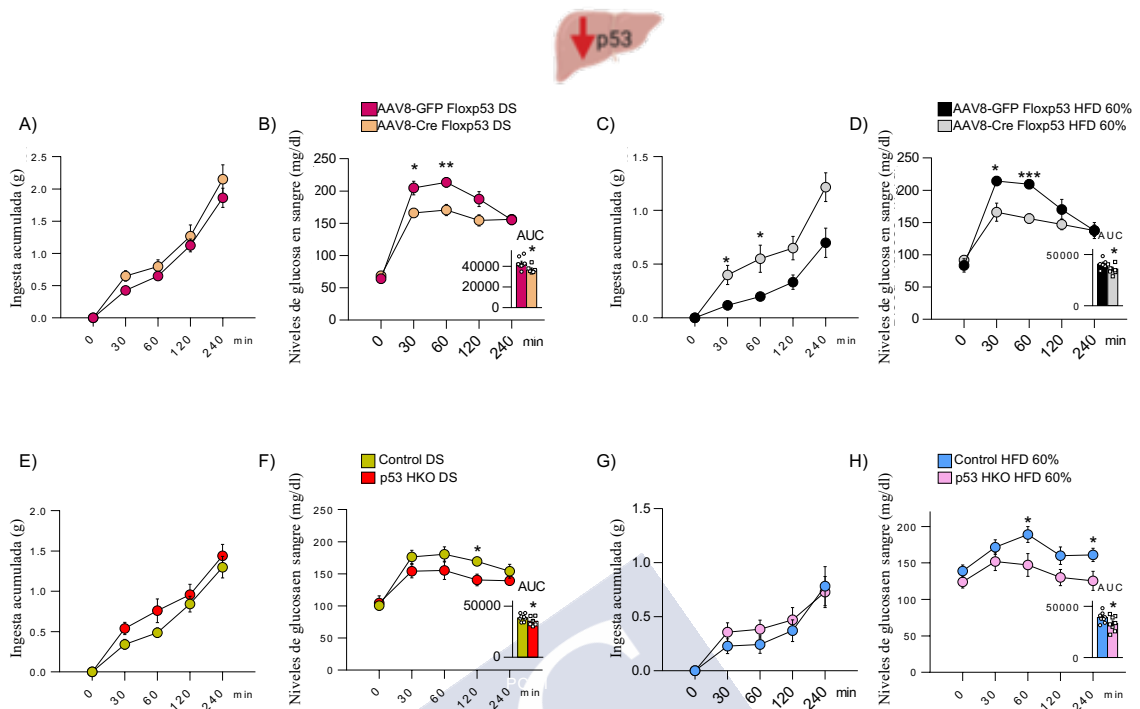


Figura 31. La sobre expresión de p53 en el hígado empeora la tolerancia a la glucosa postprandial. A) Ingesta acumulada y B) niveles de glucosa en sangre durante la realimentación con dieta estándar (DS) de los ratones *Alfp-Cre* inyectados con el virus AAV-DIO-EGFP o el virus AAV-DIO-p53-EGFP (n=8-12). C) Ingesta acumulada y D) niveles de glucosa en sangre durante la realimentación con dieta alta en grasa (HFD 60%) de los ratones *Alfp-Cre* inyectados con el virus AAV-DIO-EGFP o el virus AAV-DIO-p53-EGFP (n=8-12). También se representa el área bajo la curva (AUC) para cada una de las gráficas de tolerancia a la glucosa postprandial. Los datos se presentan como media \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001.

5.7.2 La inhibición de p53 en el hígado mejora la tolerancia a la glucosa postprandial.

Evaluamos a continuación el impacto de la disminución de los niveles hepáticos de p53 en la tolerancia a la glucosa postprandial. Los ratones *floxP53* inyectados con el virus AAV8-Cre mostraron una glucosa postprandial disminuida, tanto al ser alimentados con dieta estándar como con dieta alta en grasa (Figura 32A-D). En consonancia con estos resultados, los ratones p53 HKO mostraron también estar protegidos contra la hiperglicemia postprandial, de modo independiente de la cantidad y tipo de dieta ingerida (Figura 32E-H).



5.7.3 Los niveles hepáticos de p53 están diferencialmente incrementados en los pacientes humanos con diabetes tipo 2.

Una hiperglicemia postprandial elevada es una característica principal en el desarrollo de diabetes tipo 2 [363-365], por lo que quisimos evaluar la implicación clínica de p53 en los pacientes con diabetes. Para ello, evaluamos los niveles de p53 en el hígado de pacientes humanos con obesidad, clasificados en función de su normoglicemia (NG) o diabetes (DT2) (Figura 33A-B). Encontramos que, aunque no hay diferencias en los niveles de expresión de p53 entre los dos grupos de pacientes (Figura 33A), los niveles de proteína de p53 están significativamente elevados en los pacientes que desarrollan diabetes tipo 2 (Figura 33B), que es concomitante con el incremento de los niveles de PCK1 (Figura 33B). Respalando estos resultados, encontramos que los niveles de proteína de p53, pero no sus niveles de expresión, correlacionan positivamente con la glicemia 2 horas después de la realización de un test de tolerancia a la glucosa postprandial (Figura 33C) y con resistencia a insulina, como evidencia el índice HOMA (Tabla 14). El análisis de regresión lineal múltiple muestra además que la resistencia a insulina, junto con la edad de los pacientes, es un determinante importante en los niveles hepáticos de proteína p53, pero no de mRNA (Tabla 15).

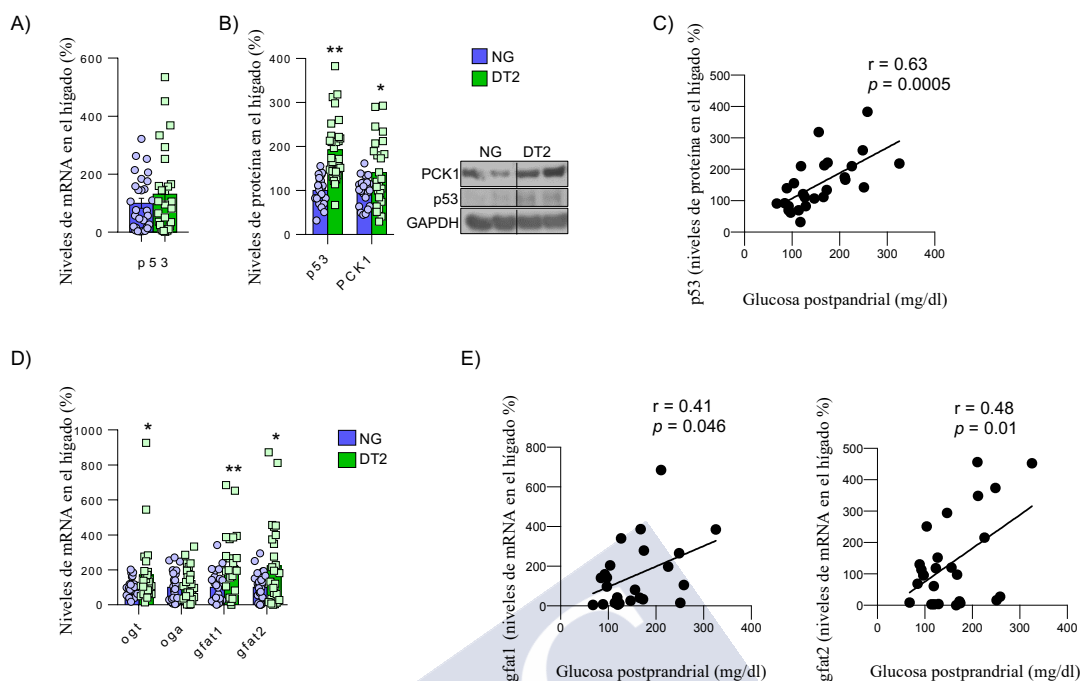


Figura 33. Los niveles de proteína de p53 y la expresión de las enzimas involucradas en la O-GlcNAcilación están incrementadas en los pacientes con diabetes tipo 2. A) Niveles de mRNA de p53 y B) niveles de proteína de p53 y PCK1 en los pacientes normoglucémicos (NG) y con diabetes tipo 2 (DT2) (n=30 por grupo). C) Correlación entre los niveles de proteína de p53 y los niveles de glucosa en sangre 2 horas después de la carga oral de glucosa durante el test de tolerancia a la glucosa postprandial. D) Niveles de mRNA de *ogt*, *oga*, *gfat1* y *gfat2* en los pacientes NG y DT2 (n=30 por grupo). E) Correlación entre los niveles de mRNA de *gfat1* y *gfat2* con los niveles de glucosa en sangre 2 horas después de la carga oral de glucosa durante el test de tolerancia a la glucosa postprandial. La expresión de GAPDH ha sido empleada como control de carga. Los valores del grupo control han sido normalizados al 100%. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$.

	P53 mRNA		P53 proteína		PCK1 mRNA		PCK1 proteína	
	r	P	r	P	r	P	r	P
Glucosa	-0.24	0.109	0.22	0.156	-0.18	0.214	0.04	0.826
Glucosa postprandial 2 h	-0.02	0.921	0.59	0.002	0.12	0.571	0.32	0.137
Insulina	-0.03	0.825	0.29	0.054	-0.08	0.600	0.06	0.712
Insulina postprandial 2 h	0.16	0.461	-0.09	0.680	0.48	0.012	-0.08	0.708
HOMA	-0.08	0.623	0.32	0.030	-0.14	0.355	0.09	0.585
QUICKI	0.26	0.085	-0.10	0.531	-0.14	0.361	0.02	0.887

Tabla 14. Análisis univariado de las correlaciones entre los niveles de proteína y de mRNA de p53 y PCK1 con las principales variables relacionadas con el metabolismo de la glucosa. Los valores son los coeficientes de correlación de Pearson y los P valores después de ser ajustados por edad, sexo e índice de masa corporal. HOMA, *homeostasis model assessment*; QUICKI, *quantitative insulin sensitivity check index*.

	p53 mRNA		p53 proteína		PCK1 mRNA		PCK1 proteína	
<i>Modelo I</i>	β	P	β	P	β	P	β	P
Edad	1.009	0.554	2.976	0.004	-1.522	0.181	1.288	0.179
Sexo	-34.226	0.374	21.819	0.324	-20.473	0.415	11.256	0.612
IMC	-0.455	0.872	1.901	0.206	-1.340	0.440	1.056	0.502
HOMA	-0.224	0.863	1.582	0.037	-0.756	0.387	0.181	0.950
AST	-2.519	0.662	-4.995	0.137	1.826	0.614	-5.406	0.139
ALT	1.737	0.624	2.701	0.187	-1.798	0.427	3.351	0.103
<i>R²ajustado</i>	0.049	0.921	0.218	0.017	-0.040	0.654	-0.021	0.529
<i>Modelo II</i>	β	P	β	P	β	P	β	P
Edad	0.921	0.588	3.601	0.004	-1.600	0.145	1.112	0.221
Sexo	-45.345	0.223	14.281	0.517	-11.234	0.631	15.308	0.450
IMC	-0.472	0.867	2.420	0.122	-1.372	0.416	1.255	0.418
AST	-1.394	0.808	-4.105	0.233	2.013	0.565	-5.272	0.107
ALT	1.310	0.706	1.716	0.404	-2.100	0.329	3.210	0.083
<i>R²ajustado</i>	0.064	0.719	0.140	0.046	-0.018	0.538	0.003	0.419
<i>Modelo III</i>	β	P	β	P	β	P	β	P
Edad	0.679	0.651	2.462	0.008	-1.372	0.191	1.243	0.188
Sexo	-31.412	0.337	5.904	0.762	-11.978	0.594	17.798	0.431
BMI	-1.085	0.669	2.041	0.163	-1.908	0.246	1.908	0.240
HOMA	-0.292	0.812	1.577	0.034	-0.788	0.358	1.398	0.587
<i>R²ajustado</i>	0.028	0.863	0.208	0.008	-0.005	0.314	-0.014	0.450

Tabla 15. Análisis de regresión lineal múltiple con los niveles de mRNA y de proteína de p53 y PCK1 como variables dependientes para todos los sujetos en el estudio transversal. IMC, índice de masa corporal; HOMA, homeostasis *model assessment*. β es el coeficiente de regresión, que permite evaluar la significancia relativa de cada variable independiente en el análisis de regresión múltiple. El *R²ajustado* expresa el porcentaje de la variancia explicada por las variables independientes en los diferentes modelos. Los valores estadísticamente significativos aparecen resaltados en negrita.

En concordancia con los resultados obtenidos anteriormente, encontramos también que los niveles de expresión de *ogt* y *gfat1* y *gfat2*, la primera enzima implicada en la síntesis de UDP-GlcNAc, están significativamente incrementados en los pacientes con diabetes tipo 2 (Figura 33D). El análisis univariado muestra una fuerte asociación entre el índice HOMA y los niveles de *gfat2* (Tabla 16). Asimismo, el análisis multivariado muestra que el índice HOMA contribuye independientemente al 27% ($p < 0.05$) de la variación de la expresión de *gfat2* después de ajustar el efecto de la edad, el sexo y el índice de masa corporal (Tabla 17). Cabe resaltar que ni p53 ni PCK1 se asocian significativamente en nuestros pacientes diabéticos con el NAS score

(Tabla 18-19), lo cual resalta que los resultados observados son independientes del daño hepático.

	ogt mRNA		oga mRNA		gfat1 mRNA		gfat2 mRNA	
	r	P	r	P	r	P	r	P
Glucosa	0.28	0.070	0.01	0.922	0.31	0.049	0.24	0.118
Glucosa postprandial 2 h	0.26	0.223	0.34	0.102	0.50	0.018	0.49	0.012
Insulina	0.07	0.669	0.02	0.888	0.09	0.592	0.35	0.021
Insulina postprandial 2 h	0.16	0.459	0.29	0.177	0.10	0.653	0.28	0.170
HOMA	0.11	0.471	0.07	0.962	0.14	0.377	0.39	0.009
QUICKI	-0.25	0.104	-0.06	0.691	-0.22	0.172	-0.41	0.006

Tabla 16. Análisis univariado de las correlaciones entre los niveles de mRNA de *ogt*, *oga*, *gfat1* y *gfat2* con las principales variables relacionadas con el metabolismo de la glucosa. Los valores son los coeficientes de correlación de Pearson y los *P* valores después de ser ajustados por edad, sexo e índice de masa corporal. HOMA, *homeostasis model assessment*; QUICKI, *quantitative insulin sensitivity check index*.

	ogt mRNA		oga mRNA		gfat1 mRNA		gfat2 mRNA	
	β	<i>P</i>	β	<i>P</i>	β	<i>P</i>	β	<i>P</i>
<i>Modelo I</i>								
Edad	-2.115	0.123	-2.398	0.067	0.667	0.821	0.615	0.841
Sexo	35.188	0.248	6.219	0.825	59.276	0.335	90.926	0.146
IMC	2.344	0.261	0.104	0.955	2.227	0.598	0.729	0.871
HOMA	0.933	0.363	0.120	0.901	1.632	0.404	5.838	0.007
AST	0.274	0.948	2.966	0.466	1.569	0.847	13.084	0.140
ALT	-0.332	0.901	-1.243	0.621	-0.566	0.912	-3.782	0.490
<i>R²ajustado</i>	0.149	0.391	0.097	0.681	0.055	0.915	0.279	0.048
<i>Modelo II</i>								
Edad	-1.885	0.151	-2.333	0.069	0.568	0.839	0.797	0.803
Sexo	25.412	0.371	1.546	0.955	52.876	0.344	66.616	0.285
IMC	2.563	0.203	0.266	0.895	2.789	0.488	2.150	0.646
AST	0.928	0.819	4.259	0.289	2.130	0.782	12.899	0.160
ALT	-0.883	0.726	-2.315	0.344	-1.170	0.807	-4.350	0.438
<i>R²ajustado</i>	0.117	0.384	0.094	0.539	0.041	0.894	0.124	0.344
<i>Modelo III</i>								
Edad	0.015	0.994	-1.899	0.141	0.930	0.732	1.730	0.557
Sexo	78.799	0.090	6.899	0.803	69.053	0.203	117.849	0.045
IMC	3.909	0.232	1.030	0.607	2.314	0.547	0.866	0.839
HOMA	1.058	0.526	-0.008	0.993	1.493	0.422	5.591	0.010
<i>R²ajustado</i>	0.086	0.422	0.057	0.639	0.057	0.680	0.198	0.055

Tabla 17. Análisis de regresión lineal múltiple con los niveles de mRNA de los genes implicados en la *O*-GlcNAcilación como variables dependientes para todos los sujetos en el estudio transversal. IMC, índice de masa corporal;

HOMA, *homeostasis model assessment*. β es el coeficiente de regresión, que permite evaluar la significancia relativa de cada variable independiente en el análisis de regresión múltiple. El R^2 *ajustado* expresa el porcentaje de la variancia explicada por las variables independientes en los diferentes modelos. Los valores estadísticamente significativos aparecen resaltados en negrita.

Característica	Descripción	Puntuación
Esteatosis (%)	<5	0
	5-33	1
	33-66	2
	>66	3
Inflamación lobular	No	0
	≤2 focos	1
	2-4 focos	2
	≥4 focos	3
<i>Ballooning</i> de los hepatocitos	No	0
	Moderado	1
	Evidente	2

Tabla 18. *NAS score* de los pacientes estudiados. La puntuación del NAS va de 0 a 8, y es la suma de las puntuaciones individuales para esteatosis (0-3), inflamación lobular (0-3) y *ballooning* de los hepatocitos (0-2).

	<i>P53</i> mRNA		<i>P53</i> protein		<i>PCK1</i> mRNA		<i>PCK1</i> protein	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
NAS score	0.14	0.406	0.10	0.556	-0.18	0.286	-0.10	0.584

Tabla 19. Análisis univariado de la correlación entre los niveles hepáticos de proteína y mRNA de *p53* y *PCK1* con el *NAS score*. Los valores son los coeficientes de correlación de Pearson y los *P* valores después de ser ajustados por edad, sexo e índice de masa corporal.





DISCUSIÓN





6. DISCUSIÓN.

p53 ha sido uno de los genes más estudiados en los últimos 30 años en el campo de la oncología [203], debido a sus funciones anti tumorales, controlando la proliferación y la muerte celular de las células dañadas [366-369]; y porque se encuentra mutado en más del 50% de los tumores [370, 371], lo que pone de manifiesto su importante función en el control del ciclo celular. El interés en p53 se magnifica aún más por el hecho de que, a diferencia de otros supresores tumorales, donde las mutaciones que sufren se asocian frecuentemente a su inactivación, las alteraciones genéticas que padece p53 pueden inactivarlo o hacer que gane nuevas funciones, mayoritariamente pro tumorales [372-374]. Siendo este el escenario por excelencia en el que se han estudiado y caracterizado las funciones clásicas de p53, posicionándose como el principal mediador de la respuesta a estrés, los estudios más recientes señalan que p53 desarrolla otras funciones no canónicas, como el control de la homeostasis energética, que tienen también un fuerte impacto en el control del metabolismo celular y la supresión tumoral [273, 375-377].

La glucosa es la principal fuente de energía para la mayoría de los eucariotas, proporcionando energía y metabolitos para que las células puedan realizar sus funciones y dividirse. Es además el principal sustrato que nutre de intermediarios al ciclo de Krebs [290], por lo que el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa es un proceso de vital importancia. Curiosamente, la mayoría de las células cancerosas muestran alteraciones en el metabolismo de la glucosa [288]. En estas, la glucólisis es la vía preferida para la obtención de energía, mediante la descomposición de glucosa a piruvato, incluso en condiciones aeróbicas normales. El piruvato resultante es convertido entonces a lactato. Aunque por esta vía se obtiene menos energía que descomponiendo completamente la glucosa a CO₂ y H₂O, las células cancerosas obtienen así esqueletos carbonados y otros precursores para la biosíntesis, y compensan la menor obtención de energía catabolizando mayores cantidades de glucosa que las células normales. Este cambio de preferencia de la respiración mitocondrial a la glucólisis anaerobia se conoce como el efecto Warburg, y permite a las células tumorales dividirse a gran velocidad [289]. Los intermediarios obtenidos durante la glucólisis sirven como precursores para la síntesis de aminoácidos, lípidos y nucleótidos. Estudios recientes han demostrado que p53 es capaz de modular el metabolismo de la glucosa de las células tumorales, oponiéndose al efecto Warburg [378, 379]. En estas condiciones de estrés severo, una de las estrategias de p53 es la reducción de los niveles de la glucosa-6-fosfatasa deshidrogenasa [380], suprimiendo así el consumo de glucosa por parte de las células tumorales, y promoviendo su apoptosis. p53 también reprime la expresión de PDK2, permitiendo así la activación del complejo PDH y favoreciendo la producción de acetil-CoA a partir de piruvato, en detrimento de la producción de lactato [293]. Se ha visto que p53 disminuye también los niveles de la hexokinasa 2, inhibiendo la glucólisis en las células de cáncer de próstata [294]. Además de regular las enzimas glucolíticas, se ha descrito que p53 disminuye la disponibilidad interna de glucosa inhibiendo la captación de glucosa, reprimiendo la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 [295], y disminuyendo los niveles de GLUT3 al reprimir la actividad de su activador transcripcional NF-kappaB [296]. La activación de la vía molecular de PI3K/AKT promueve la glucólisis en las células cancerosas. La enzima PTEN es una fosfatasa que inhibe

la activación de AKT [297]. Se ha descrito que p53 inhibe la vía PI3K/AKT activando la transcripción de PTEN y Parkin, una proteína que a su vez regula positivamente a PTEN [298-300]. Además, p53 inhibe la vía PI3K/AKT inhibiendo la expresión del receptor de insulina en las células de cáncer de mama [301].

Aunque la importancia de la actividad de p53 en el metabolismo de la glucosa de las células tumorales es evidente, su función en la homeostasis de la glucosa de las células normales se ha estudiado escasamente, por lo que en esta tesis nos propusimos evaluar su función en el hígado, por ser el principal órgano gluconeogénico en condiciones de privación de nutrientes, lo que le posiciona como un órgano fundamental en la homeostasis de la glucosa. Al igual que en el estudio previo realizado por el grupo de Andreas Prokesch [287], encontramos que los niveles de proteína de p53 en el hígado se regulan por el estado nutricional, mostrando un incremento significativo durante el ayuno. En esta tesis, demostramos además que el incremento que se da en los niveles de p53 ocurre ya a tiempos cortos de ayuno, concretamente a las 6 horas, manteniéndose hasta las 24 horas de ayuno, y restableciéndose rápidamente hacia los niveles basales tras la realimentación, lo que refleja su sensibilidad a los cambios en la disponibilidad de nutrientes. Además, identificamos por primera vez que la glucosa circulante es la señal del estado nutricional que regula los niveles hepáticos de p53, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*.

Se ha descrito que la actividad de p53 está estrechamente ligada a un incremento intracelular de sus niveles de proteína [358, 381], donde las modificaciones postraduccionales que sufre tienen una gran función estabilizadora, impidiendo que se degrade. Tal es así que, en el campo de la oncología molecular, se ha descrito que p53 es la proteína en la que se han caracterizado y descrito más sitios de modificaciones postraduccionales, realizadas por diferentes enzimas [210, 219], lo cual refleja la complejidad y precisión de la regulación de la actividad de p53. Así, se ha caracterizado que la proteína p53 se modifica postranscripcionalmente por fosforilación [220], acetilación [221], metilación [222], sumoilación [223], ubiquitinación [224], ADP-ribosilación [225], nedilación [226] y *O*-GlcNAcilación [227]. En esta tesis demostramos que el incremento de los niveles de p53 que se da durante el ayuno no es debido a un incremento en sus niveles de expresión de mRNA, sino a la modificación postraduccionales de la *O*-GlcNAcilación. En este sentido, hemos visto al inmunoprecipitar p53 que sus niveles de *O*-GlcNAcilación se incrementan durante el ayuno. Además, la inhibición química de la *O*-GlcNAcilación, empleando el inhibidor OSMI-1, impide el incremento de los niveles de p53 durante el ayuno; y la estimulación química del proceso, empleando PUGNAc, promueve la acumulación de proteína de p53 en condiciones basales. Se había descrito que la *O*-GlcNAcilación prolongaba la vida media de la proteína p53 en condiciones de daño celular, y en un contexto tumoral [227], pero nunca antes se había demostrado su implicación en estabilizar p53 en un contexto fisiológico. Con los resultados obtenidos en este trabajo, no podemos descartar que durante el ayuno tengan lugar otras modificaciones en p53 que sean importantes para la determinación de sus dianas transcripcionales, o que incluso complementen y ayuden a prolongar la vida media de su proteína. Pero sí podemos concluir que la *O*-GlcNAcilación es fundamental e irremplazable en este proceso de estabilización, ya que los experimentos con los activadores e inhibidores químicos de la *O*-GlcNAcilación, así como los que implican el uso del mutante de p53 que no se puede *O*-GlcNAcilar, con la mutación S149A, eliminan por completo la regulación y el efecto de p53 durante el ayuno.

Una vez demostrada la fuerte regulación de los niveles hepáticos de p53 por el estado nutricional, nuestro siguiente propósito fue determinar su función durante el ayuno.

Encontramos una fuerte correlación entre los niveles de p53 y de la proteína PCK1, tanto en modelos animales como en modelos *in vitro* sometidos a condiciones de privación de alimentos. Estos resultados van en línea con los obtenidos previamente por Ido Goldstein y colaboradores [308], donde se muestra que las células HepG2 tratadas con nutlin-3a, un activador químico de p53, muestran un incremento de la expresión de algunos genes involucrados en la gluconeogénesis, como la glicerol kinasa (GK), la aquaporina 3 (AQP3) y la aquaporina 9 (AQP9). Sin embargo, nunca antes se había establecido una relación directa entre p53 y PCK1, la enzima que constituye el punto de control más importante del proceso de síntesis *de novo* de la glucosa [65, 66]. Nuestros resultados muestran que p53 se une al promotor de PCK1, incrementando así su transcripción. Esta interacción directa entre p53 y PCK1 se traslada a nivel funcional a la capacidad de p53 de inducir la producción de glucosa, como demuestran nuestros modelos *in vivo* e *in vitro* que carecen de la expresión de p53, y se muestran incapaces de realizar la gluconeogénesis de forma eficaz. Reforzando la intervención de PCK1 en los efectos gluconeogénicos de p53, encontramos que nuestros modelos animales que no expresan p53 en el hígado no son capaces de producir glucosa a partir de piruvato, pero sí a partir de glicerol, ya que este último se incorpora a la gluconeogénesis en una etapa posterior a PCK1, por lo que no necesita de su actividad para inducir la gluconeogénesis hepática. Además, cuando manipulamos simultáneamente la expresión de p53 y PCK1 *in vitro*, en nuestras células THLE-2, observamos que el incremento de la producción de glucosa que promueve la sobre expresión de p53 se ve inhibido al silenciar PCK1; y que la disminución en la producción de glucosa que nos encontramos al silenciar p53 se restablece al sobre expresar en estas células PCK1, resultados que denotan la gran importancia de PCK1 al mediar los efectos gluconeogénicos de p53. Además, encontramos que la función de p53 es también importante en condiciones crónicas de privación de nutrientes, ya que nuestros modelos animales que no expresan p53 en el hígado muestran una severa hipoglucemia cuando son sometidos a condiciones de restricción calórica durante varios días consecutivos. Mientras que los animales WT muestran un incremento de la expresión de los genes gluconeogénicos en estas condiciones [382], nuestros modelos que no expresan p53 en el hígado tienen grandes dificultades para mantener la glucemia, teniendo que recibir varios de ellos una suplementación de glucosa durante el ensayo, por mostrar valores de glucosa en sangre cercanos a los 20 mg/dl. De forma consistente con este resultado, observamos que los niveles de PCK1 se encuentran muy elevados en nuestros ratones WT sometidos a restricción calórica, pero no así en los modelos que no expresan p53 en el hígado. Sin embargo, la recuperación de la expresión de p53 en el hígado de estos animales, empleando técnicas virogenéticas, permite la recuperación de los niveles de PCK1, y el consiguiente restablecimiento de los niveles circulantes de glucosa hasta los niveles mostrados por los ratones WT. Cabe destacar además que previamente se había demostrado que, en el hígado, la *O*-GlcNAcilación tenía un papel muy importante en la inducción de la gluconeogénesis durante el ayuno y la resistencia a insulina. Concretamente, se había descrito que la *O*-GlcNAcilación de los coactivadores transcripcionales CRTC2 [236] y PGC1 α resultaba imprescindible para su estabilidad y función gluconeogénica [246]. En esta tesis hemos demostrado que la estimulación de la *O*-GlcNAcilación promueve la expresión de PCK1, pero para ello necesita de p53, ya que cuando lo silenciamos se pierde el efecto estimulador de la *O*-GlcNAcilación sobre el incremento de expresión de PCK1. Del mismo modo, la recuperación de la expresión de p53 en las células Hep3B permite que la estimulación de la *O*-GlcNAcilación con PUGNAc genere un incremento en los niveles de proteína PCK1, efecto que no tiene lugar si se recupera la expresión de p53 en las células Hep3B con la mutación S149A, donde entonces se pierden por completo los efectos activadores de PUGNAc sobre PCK1. Estos resultados ponen de manifiesto varios aspectos importantes: resaltan la gran

implicación de p53 en la gluconeogénesis hepática, ya que, aunque se había demostrado que la *O*-GlcNAcilación activaba la producción de glucosa y estabilizaba a factores tan importantes en este contexto, como son CRTC2 y PGC1 α , al silenciar o mutar p53, se pierde por completo el efecto gluconeogénico, no siendo posible que se compense por otra proteína o factor de transcripción. Lo mismo ocurre con nuestros modelos *in vivo* e *in vitro* donde silenciamos p53. A pesar de que PCK1 es una enzima muy importante, sometida a un fuerte control transcripcional por parte de numerosos activadores y factores de transcripción, como Fox01 [383, 384], Fox03 [385], NF-Y [386], KAT2B [70] y PGC1 α [387], cuando silenciamos p53, los niveles de PCK1 permanecen bajos. Esto sugiere que, por un lado, la acción de p53 en la transcripción de PCK1 es muy importante y fundamental; y, por otro lado, que se requiere de la actividad de varios activadores y factores de transcripción para que la expresión de PCK1 sea completa. Esto nos alejaría de la visión de una acción redundante de los múltiples activadores de PCK1, para interpretarlo conjuntamente como una acción coordinada de los diferentes factores de transcripción y activadores, para una expresión de PCK1 eficiente y adaptada a las necesidades particulares de la intensidad del estímulo que propicia y requiere de la transcripción de PCK1.

Una vez demostrado el importante papel que ejerce p53 en la gluconeogénesis hepática, nuestro siguiente propósito fue discernir si también estaba involucrado en la respuesta a las principales hormonas glucorreguladoras. Cuando el alimento no es accesible, se desencadenan una serie de respuestas hormonales y fisiológicas para mantener los niveles de glucosa dentro del rango homeostático. La primera respuesta que previene de un descenso brusco de la glucemia es la inhibición de la secreción de insulina [388, 389], seguida de la secreción de las hormonas contra reguladoras, cuando la glucemia desciende del rango fisiológico óptimo [388, 389]. Sorprendentemente, en el desarrollo de esta tesis, hemos encontrado que p53 participa en las acciones glucorreguladoras de las principales hormonas que controlan la homeostasis de la glucosa. El glucagón estimula la gluconeogénesis hepática, y la expresión de PCK1, por la vía de AMPc [390]. Nuestros resultados, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, muestran que tanto el glucagón como la forskolina, que es un agente que incrementa los niveles intracelulares de AMPc, mimetizando la vía de señalización del glucagón [334], incrementan los niveles de proteína de p53. Encontramos que esta estabilización de los niveles de proteína de p53 es dependiente de la *O*-GlcNAcilación, ya que al inmunoprecipitar p53 vemos que tras el tratamiento con glucagón aumenta su *O*-GlcNAcilación, y al tratar a las células con el inhibidor OSMI-1, el glucagón es incapaz de incrementar los niveles de proteína de p53. Además, vemos que la función de p53 resulta imprescindible para los efectos del glucagón sobre PCK1 y sobre la producción hepática de glucosa. En los modelos *in vitro*, el silenciamiento de p53 impide que el glucagón incremente los niveles de proteína de PCK1, la actividad enzimática de PCK1, y la producción de glucosa. En línea con estos resultados, la recuperación de la expresión de p53 en las células Hep3B permite que estas células respondan de nuevo a los efectos hiperglucemiantes del glucagón y la forskolina, ausentes por completo en esta línea celular. Estos hallazgos *in vitro* se respaldan con los obtenidos *in vivo*, donde el tratamiento con glucagón incrementa notablemente los niveles de p53 en el hígado de los ratones WT, y no así en los ratones Gcgr^{-/-}, lo que pone de manifiesto la implicación de la vía de señalización del glucagón en la estabilización de p53. Además, en nuestros modelos animales que no expresan p53 en el hígado, la respuesta hiperglicemiante tras el tratamiento con el glucagón está atenuada, mostrándose significativamente menor que la de los ratones WT. Encontramos unos resultados idénticos cuando tratamos a nuestros modelos *in vivo* e *in vitro* con la adrenalina, hormona hiperglicemiante que, al igual que el glucagón, incrementa los niveles intracelulares de AMPc para inducir la activación de la producción hepática de glucosa [334]; y cuando tratamos a

nuestros modelos con glucocorticoides que, a diferencia del glucagón y la adrenalina, no incrementan los niveles intracelulares de AMPc, sino que promueven la unión directamente de su receptor al promotor de PCK1, a la vez que reclutan a otros activadores y factores de transcripción para que la expresión de PCK1 sea eficiente y completa [29, 114]. En esta tesis demostramos por primera vez la implicación de p53 en la respuesta a las principales hormonas glucoconductoras. Estos resultados nos llevan de nuevo a apreciar la importancia de la función de p53 en las acciones gluconeogénicas del hígado. A pesar de que hasta la fecha se han descrito numerosos mecanismos por los que el glucagón y la adrenalina regulan la producción hepática de glucosa, que implican la acción de distintos factores de transcripción y coactivadores, como CRT2 [69, 98], HNF-4 α y PGC-1 α [68, 99], y FoxO1 [100-102]; y lo mismo para el GR, para el que se ha descrito que interacciona con los elementos de respuesta a AMPc [115], y con los factores de transcripción PPAR α [116], HNF3 α , HNF3 β [117], FoxO1 [118] y FoxO3A [119]; en nuestros resultados vemos que la inhibición de p53 es capaz de reducir significativamente la producción de glucosa en respuesta al glucagón, adrenalina y glucocorticoides. Esto nos permite apreciar la relevancia de todos y cada uno de los factores implicados, para que la respuesta que conlleva a la producción de glucosa sea completa y adecuada. Y no solo eso, sino que también nos permite apreciar la complejidad fisiológica de los diferentes mecanismos que son necesarios para mantener la homeostasis de la glucosa, lo que pone de manifiesto el valor de la glucosa como sustrato y como fuente de energía a nivel sistémico. Es por ello evidente asumir la relevancia tan grande que un factor de transcripción de respuesta a estrés, como es p53, puede tener a la hora de detectar los niveles de glucosa en sangre y desencadenar la respuesta fisiológica adecuada, que en este caso es la gluconeogénesis.

La regulación de la gluconeogénesis no es solo importante en un contexto de hipoglucemia, para mantener los niveles de glucosa en sangre dentro del rango fisiológico óptimo, sino también para reducirla o suprimirla cuando es oportuno, para evitar condiciones de hiperglucemia, que también son perjudiciales [391, 392]. La insulina es la principal hormona hipoglucemiante [393]. La insulina puede inhibir la producción hepática de glucosa de forma directa, actuando en el hígado a través de su receptor ubicado en la membrana celular, o de forma indirecta, actuando en el páncreas, el cerebro y el tejido adiposo [120]. Se ha descrito que sus acciones directas en el hígado son las más relevantes a la hora de suprimir la producción de glucosa. En este sentido, se ha demostrado que la insulina puede disminuir directamente los niveles de expresión de PCK1 [79], y que los ratones transgénicos que sobre expresan PCK1 muestran una marcada resistencia a insulina [394] e hiperglicemia [72]. Nuestros resultados muestran que, en condiciones normales, la insulina disminuye los niveles de proteína de p53 en el hígado. Sin embargo, la sobre expresión de p53, o el incremento de proteína p53 generado como consecuencia de una O-GlcNAcilación desregulada, impiden que la insulina disminuya los niveles de proteína de PCK1, su actividad enzimática y la consiguiente producción de glucosa. Además, encontramos que la actividad de p53 tiene un impacto directo en la tolerancia a la glucosa postprandial, un parámetro muy sensible e informativo del manejo del control glucémico de los individuos [191, 196]. Estos resultados ponen de manifiesto que la degradación de p53 es importante para la supresión de la producción hepática de glucosa por la insulina.

Todos estos resultados preclínicos obtenidos en la realización de esta tesis, llevados a cabo en modelos *in vivo* e *in vitro*, señalan inequívocamente el importante papel que desarrolla p53 en la regulación de la producción hepática de glucosa, así como que la sobre expresión de p53 genera resistencia a insulina. Esto nos llevó a evaluar la translación de nuestros hallazgos a un contexto clínico en pacientes humanos. En estudios previos se había determinado que ciertas mutaciones en p53, además de tener importantes implicaciones en cáncer, también se

relacionaban con alteraciones metabólicas en humanos. En este sentido, se ha visto que los pacientes con el síndrome de Li Fraumeni, causado por mutaciones en p53, y que presentan predisposición a padecer cáncer, muestran además un incremento en la fosforilación oxidativa en el músculo esquelético [395]. Los pacientes con ataxia telangiectasia, propensos a desarrollar resistencia a insulina e hipercolesterolemia, los niveles de p53 son elevados, ya que la proteína responsable de la enfermedad, la kinasa ATM, es una inductora de la actividad de p53 [304]. Al examinar los niveles de p53 en el hígado de pacientes obesos con normogluemia o DT2, nuestros resultados muestran un incremento significativo de los niveles de proteína de p53, PCK1, así como de la expresión de los principales genes implicados en el proceso de *O*-GlcNAcilación. Encontramos además una correlación positiva entre los niveles de proteína de p53 con el índice HOMA y los niveles de glucosa postprandial 2 horas después de la toma de oral de la glucosa. Estos hallazgos apoyan los datos preclínicos, que muestran que niveles elevados de p53 en el hígado se asocian a resistencia a insulina. Teniendo en cuenta que los altos niveles de PCK1 se correlacionan con tasas altas de gluconeogénesis en pacientes humanos [396], es plausible asumir que p53 esté involucrado en los desórdenes metabólicos asociados a la actividad de PCK1. La *O*-GlcNAcilación también se había relacionado con la resistencia a insulina [255] y la gluconeogénesis [235, 246], mostrándose elevados niveles de *O*-GlcNAcilación en los leucocitos de los pacientes diabéticos [251]. En línea con estos resultados, en esta tesis demostramos por primera vez la existencia de elevados niveles de expresión de las principales enzimas involucradas en la *O*-GlcNAcilación, como son OGT y GFAT, en el hígado de pacientes obesos con DT2, así como su correlación positiva con los niveles de glucosa postprandial 2 horas después de la toma de oral de la glucosa. Esto indicaría que la *O*-GlcNAcilación de p53 participa en la desregulación del metabolismo de la glucosa característico de la diabetes.

Tomando todos nuestros resultados en conjunto, en la presente tesis se describe un nuevo papel de p53 en la regulación de la homeostasis de la glucosa, tanto en condiciones fisiológicas como patofisiológicas, involucrándose en el desarrollo de la DT2 en humanos. Hemos demostrado que p53 se une al promotor de PCK1 para regular su transcripción, lo que tiene un impacto directo en su actividad enzimática, que se correlaciona con sus niveles de proteína, y se refleja en un incremento de la tasa de producción hepática de glucosa. Asimismo, hemos demostrado que la estabilización de p53 para sus acciones gluconeogénicas es dependiente de la *O*-GlcNAcilación, y que p53 se requiere para las acciones reguladoras de las principales hormonas involucradas en el control de la homeostasis de la glucosa. Finalmente, vemos que nuestros hallazgos preclínicos, que señalan que un incremento en los niveles hepáticos de p53 genera resistencia a insulina, se corroboran en pacientes humanos diabéticos, quienes muestran elevados niveles de proteína de p53.





CONCLUSIONES

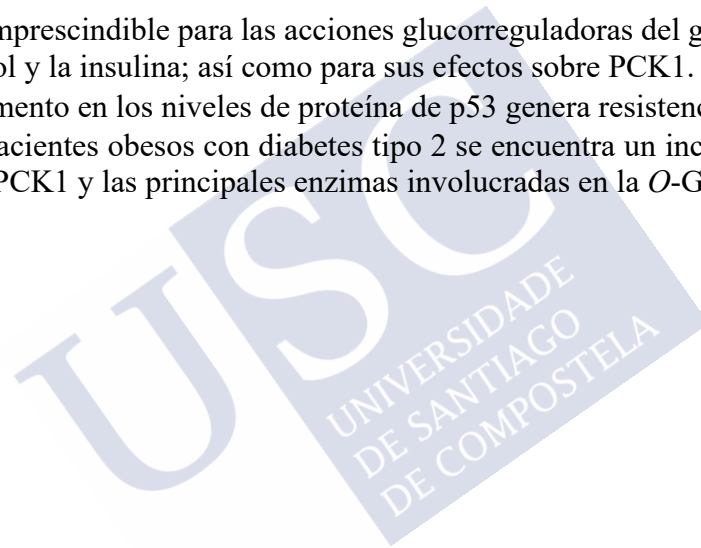




7. CONCLUSIONES

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

- Los niveles de p53 en el hígado están fuertemente regulados por el estado nutricional, siendo los niveles circulantes de glucosa una importante señal reguladora.
- La estabilización de los niveles de proteína de p53 por el estado nutricional es dependiente de la *O*-GlcNAcilación.
- p53 es fundamental para la gluconeogénesis y la regulación directa de la expresión de PCK1.
- p53 es imprescindible para las acciones glucorreguladoras del glucagón, la adrenalina, el cortisol y la insulina; así como para sus efectos sobre PCK1.
- El incremento en los niveles de proteína de p53 genera resistencia a insulina.
- En los pacientes obesos con diabetes tipo 2 se encuentra un incremento de los niveles de p53, PCK1 y las principales enzimas involucradas en la *O*-GlcNAcilación.





BIBLIOGRAFÍA





8. BIBLIOGRAFÍA

1. Baron, A.D., et al., *Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans*. Am J Physiol, 1988. **255**(6 Pt 1): p. E769-74.
2. Kowalski, G.M. and C.R. Bruce, *The regulation of glucose metabolism: implications and considerations for the assessment of glucose homeostasis in rodents*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014. **307**(10): p. E859-71.
3. Giugliano, D., A. Ceriello, and K. Esposito, *Glucose metabolism and hyperglycemia*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2008. **87**(1): p. 217S-222S.
4. Han, H.S., et al., *Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective*. Exp Mol Med, 2016. **48**: p. e218.
5. Gerich, J.E., *Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications*. Diabet Med, 2010. **27**(2): p. 136-42.
6. Gerich, J.E., et al., *Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis*. Diabetes Care, 2001. **24**(2): p. 382-91.
7. Banting, F.G. and C.H. Best, *The internal secretion of the pancreas*. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1922. **7**(5): p. 251-266.
8. Banting, F.G., et al., *the effect of pancreatic extract (insulin) on normal rabbits*. American Journal of Physiology-Legacy Content, 1922. **62**(1): p. 162-176.
9. Aronoff, S.L., et al., *Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon*. Diabetes Spectrum, 2004. **17**(3): p. 183-190.
10. Kubota, T., N. Kubota, and T. Kadowaki, *Imbalanced Insulin Actions in Obesity and Type 2 Diabetes: Key Mouse Models of Insulin Signaling Pathway*. Cell Metabolism, 2017. **25**(4): p. 797-810.
11. Petersen, M.C. and G.I. Shulman, *Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance*. Physiol Rev, 2018. **98**(4): p. 2133-2223.
12. Gerich, J.E., *Control of glycaemia*. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1993. **7**(3): p. 551-86.
13. Rushing, P.A., et al., *Inhibition of central amylin signaling increases food intake and body adiposity in rats*. Endocrinology, 2001. **142**(11): p. 5035.
14. Perley, M.J. and D.M. Kipnis, *Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects*. J Clin Invest, 1967. **46**(12): p. 1954-62.
15. Kim, W. and J.M. Egan, *The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment*. Pharmacol Rev, 2008. **60**(4): p. 470-512.
16. Jiang, G. and B.B. Zhang, *Glucagon and regulation of glucose metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(4): p. E671-8.
17. Nauck, M.A., et al., *Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1993. **91**(1): p. 301-7.

18. Drucker, D.J., *Mechanisms of Action and Therapeutic Application of Glucagon-like Peptide-1*. Cell Metab, 2018. **27**(4): p. 740-756.
19. Beiroa, D., et al., *GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK*. Diabetes, 2014. **63**(10): p. 3346-58.
20. Sprague, J.E. and A.M. Arbelaez, *Glucose counterregulatory responses to hypoglycemia*. Pediatr Endocrinol Rev, 2011. **9**(1): p. 463-73; quiz 474-5.
21. Scott, R.V. and S.R. Bloom, *Problem or solution: The strange story of glucagon*. Peptides, 2018. **100**: p. 36-41.
22. Unger, R.H., *Glucagon physiology and pathophysiology*. N Engl J Med, 1971. **285**(8): p. 443-9.
23. Janah, L., et al., *Glucagon Receptor Signaling and Glucagon Resistance*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(13).
24. Al-Massadi, O., et al., *Glucagon Control on Food Intake and Energy Balance*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(16).
25. PERRY, R.J., et al., *Mechanisms by Which Glucagon Acutely Stimulates Hepatic Mitochondrial Oxidation and Gluconeogenesis*. Diabetes, 2018. **67**(Supplement 1): p. 146-OR.
26. Moratinos, J., et al., *Alpha-adrenoceptor involvement in catecholamine-induced hyperglycaemia in conscious fasted rabbits*. Br J Pharmacol, 1986. **89**(1): p. 55-66.
27. Bolli, G.B. and C.G. Fanelli, *Physiology of glucose counterregulation to hypoglycemia*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1999. **28**(3): p. 467-93, v.
28. Verberne, A.J., et al., *Adrenaline: insights into its metabolic roles in hypoglycaemia and diabetes*. Br J Pharmacol, 2016. **173**(9): p. 1425-37.
29. Kuo, T., et al., *Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids*. Adv Exp Med Biol, 2015. **872**: p. 99-126.
30. Zhang, X., et al., *Unraveling the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 802.
31. Mersmann, H.J. and H.L. Segal, *Glucocorticoid control of the liver glycogen synthetase-activating system*. J Biol Chem, 1969. **244**(7): p. 1701-4.
32. Kuo, T., C.A. Harris, and J.C. Wang, *Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **380**(1-2): p. 79-88.
33. Dinneen, S., et al., *Metabolic effects of the nocturnal rise in cortisol on carbohydrate metabolism in normal humans*. J Clin Invest, 1993. **92**(5): p. 2283-90.
34. Stavreva, D.A., et al., *Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(9): p. 1093-102.
35. Moller, N. and J.O. Jorgensen, *Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects*. Endocr Rev, 2009. **30**(2): p. 152-77.
36. Fang, F., et al., *Growth hormone acts on liver to stimulate autophagy, support glucose production, and preserve blood glucose in chronically starved mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(15): p. 7449-7454.
37. Zhang, Y., et al., *Reduced autophagy in livers of fasted, fat-depleted, ghrelin-deficient mice: reversal by growth hormone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(4): p. 1226-31.
38. Cruz, C.R. and R.G. Smith, *The growth hormone secretagogue receptor*. Vitam Horm, 2008. **77**: p. 47-88.

39. Kojima, M. and K. Kangawa, *Ghrelin discovery: a decade after*. *Endocr Dev*, 2013. **25**: p. 1-4.
40. Li, R.L., et al., *Profound hypoglycemia in starved, ghrelin-deficient mice is caused by decreased gluconeogenesis and reversed by lactate or fatty acids*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(22): p. 17942-50.
41. Zhao, T.J., et al., *Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(16): p. 7467-72.
42. Rui, L., *Energy metabolism in the liver*. *Compr Physiol*, 2014. **4**(1): p. 177-97.
43. Moore, M.C., et al., *Sources of carbon for hepatic glycogen synthesis in the conscious dog*. *J Clin Invest*, 1991. **88**(2): p. 578-87.
44. Adeva-Andany, M.M., et al., *Liver glucose metabolism in humans*. *Biosci Rep*, 2016. **36**(6).
45. Sternisha, S.M. and B.G. Miller, *Molecular and cellular regulation of human glucokinase*. *Arch Biochem Biophys*, 2019. **663**: p. 199-213.
46. Ilyedjian, P.B., et al., *Glucokinase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the human liver. Regulation of gene expression in cultured hepatocytes*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(5): p. 1966-73.
47. Agius, L., *Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism*. *Biochem J*, 2008. **414**(1): p. 1-18.
48. Niswender, K.D., et al., *Effects of increased glucokinase gene copy number on glucose homeostasis and hepatic glucose metabolism*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(36): p. 22570-5.
49. Pilkis, S.J. and T.H. Claus, *Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes*. *Annu Rev Nutr*, 1991. **11**: p. 465-515.
50. Nozaki, Y., et al., *Metabolic control analysis of hepatic glycogen synthesis in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. **117**(14): p. 8166-8176.
51. Li, X.H., et al., *Inherent lipid metabolic dysfunction in glycogen storage disease IIIa*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **455**(1-2): p. 90-7.
52. Ogawa, A., et al., *Case of glycogen storage disease type VI (phosphorylase deficiency) complicated by focal nodular hyperplasia*. *Pediatr Int*, 2010. **52**(3): p. e150-3.
53. Zhang, S., et al., *The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility*. *Nutr Metab (Lond)*, 2014. **11**(1): p. 10.
54. Klyuyeva, A., et al., *Tissue-specific kinase expression and activity regulate flux through the pyruvate dehydrogenase complex*. *J Biol Chem*, 2019. **294**(3): p. 838-851.
55. Kolobova, E., et al., *Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites*. *Biochem J*, 2001. **358**(Pt 1): p. 69-77.
56. Jeoung, N.H., et al., *Fasting induces ketoacidosis and hypothermia in PDHK2/PDHK4-double-knockout mice*. *Biochem J*, 2012. **443**(3): p. 829-39.
57. Jeoung, N.H., et al., *Role of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDHK4) in glucose homeostasis during starvation*. *Biochem J*, 2006. **397**(3): p. 417-25.
58. Huang, B., et al., *Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands, glucocorticoids, and insulin*. *Diabetes*, 2002. **51**(2): p. 276-83.

59. Park, B.Y., et al., *PDK4 Deficiency Suppresses Hepatic Glucagon Signaling by Decreasing cAMP Levels*. *Diabetes*, 2018. **67**(10): p. 2054-2068.
60. Jitrapakdee, S., et al., *Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase*. *Biochem J*, 2008. **413**(3): p. 369-87.
61. Owen, O.E., S.C. Kalhan, and R.W. Hanson, *The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(34): p. 30409-12.
62. Kumashiro, N., et al., *Targeting pyruvate carboxylase reduces gluconeogenesis and adiposity and improves insulin resistance*. *Diabetes*, 2013. **62**(7): p. 2183-94.
63. Perry, R.J., et al., *Non-invasive assessment of hepatic mitochondrial metabolism by positional isotopomer NMR tracer analysis (PINTA)*. *Nat Commun*, 2017. **8**(1): p. 798.
64. Cappel, D.A., et al., *Pyruvate-Carboxylase-Mediated Anaplerosis Promotes Antioxidant Capacity by Sustaining TCA Cycle and Redox Metabolism in Liver*. *Cell Metab*, 2019. **29**(6): p. 1291-1305 e8.
65. Wolf, G., *Metabolic control of gluconeogenesis in transgenic mice: regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene*. *Nutr Rev*, 1994. **52**(8 Pt 1): p. 275-7.
66. Yang, J., S.C. Kalhan, and R.W. Hanson, *What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase?* *J Biol Chem*, 2009. **284**(40): p. 27025-9.
67. Hanson, R.W., *Thematic minireview series: a perspective on the biology of phosphoenolpyruvate carboxykinase 55 years after its discovery*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(40): p. 27021-3.
68. Herzig, S., et al., *CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1*. *Nature*, 2001. **413**(6852): p. 179-83.
69. Koo, S.H., et al., *The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism*. *Nature*, 2005. **437**(7062): p. 1109-11.
70. Ravnskjaer, K., et al., *Glucagon regulates gluconeogenesis through KAT2B- and WDR5-mediated epigenetic effects*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(10): p. 4318-28.
71. Zhang, Y., et al., *Regulation of hepatic gluconeogenesis by nuclear factor Y transcription factor in mice*. *J Biol Chem*, 2018. **293**(20): p. 7894-7904.
72. Valera, A., et al., *Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(19): p. 9151-4.
73. Semakova, J., et al., *PEPCK-C reexpression in the liver counters neonatal hypoglycemia in Pck1 (del/del) mice, unmasking role in non-gluconeogenic tissues*. *J Physiol Biochem*, 2017. **73**(1): p. 89-98.
74. She, P., et al., *Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(17): p. 6508-17.
75. Burgess, S.C., et al., *Impaired tricarboxylic acid cycle activity in mouse livers lacking cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(47): p. 48941-9.
76. She, P., et al., *Mechanisms by which liver-specific PEPCK knockout mice preserve euglycemia during starvation*. *Diabetes*, 2003. **52**(7): p. 1649-54.
77. Burgess, S.C., et al., *Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver*. *Cell Metab*, 2007. **5**(4): p. 313-20.
78. Hakimi, P., et al., *Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the critical role of cataplerosis in the control of hepatic metabolism*. *Nutr Metab (Lond)*, 2005. **2**: p. 33.

79. Gómez-Valadés, A.G., et al., *Pck1 gene silencing in the liver improves glycemia control, insulin sensitivity, and dyslipidemia in db/db mice*. *Diabetes*, 2008. **57**(8): p. 2199-210.
80. Chakravarty, K., et al., *Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2005. **40**(3): p. 129-54.
81. Beale, E.G., B.J. Harvey, and C. Forest, *PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes*. *Cell Biochem Biophys*, 2007. **48**(2-3): p. 89-95.
82. van Schaftingen, E. and I. Gerin, *The glucose-6-phosphatase system*. *Biochem J*, 2002. **362**(Pt 3): p. 513-32.
83. Hutton, J.C. and R.M. O'Brien, *Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(43): p. 29241-5.
84. Vander Kooi, B.T., et al., *The glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter contains both positive and negative glucocorticoid response elements*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(12): p. 3001-22.
85. Hornbuckle, L.A., et al., *Selective stimulation of G-6-Pase catalytic subunit but not G-6-P transporter gene expression by glucagon in vivo and cAMP in situ*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. **286**(5): p. E795-808.
86. Schilling, M.M., et al., *Gluconeogenesis: re-evaluating the FOXO1-PGC-1alpha connection*. *Nature*, 2006. **443**(7111): p. E10-1.
87. Onuma, H., et al., *Correlation between FOXO1a (FKHR) and FOXO3a (FKHRL1) binding and the inhibition of basal glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription by insulin*. *Mol Endocrinol*, 2006. **20**(11): p. 2831-47.
88. Hirota, K., et al., *A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(47): p. 32432-41.
89. Pedersen, K.B., et al., *The promoter for the gene encoding the catalytic subunit of rat glucose-6-phosphatase contains two distinct glucose-responsive regions*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **292**(3): p. E788-801.
90. Lin, H.V. and D. Accili, *Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease*. *Cell Metab*, 2011. **14**(1): p. 9-19.
91. Conarello, S.L., et al., *Glucagon receptor knockout mice are resistant to diet-induced obesity and streptozotocin-mediated beta cell loss and hyperglycaemia*. *Diabetologia*, 2007. **50**(1): p. 142-50.
92. Gelling, R.W., et al., *Lower blood glucose, hyperglucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(3): p. 1438-43.
93. Sorensen, H., et al., *Glucagon receptor knockout mice display increased insulin sensitivity and impaired beta-cell function*. *Diabetes*, 2006. **55**(12): p. 3463-9.
94. Longuet, C., et al., *Liver-specific disruption of the murine glucagon receptor produces alpha-cell hyperplasia: evidence for a circulating alpha-cell growth factor*. *Diabetes*, 2013. **62**(4): p. 1196-205.
95. Lee, Y., et al., *Hyperglycemia in rodent models of type 2 diabetes requires insulin-resistant alpha cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(36): p. 13217-22.
96. Kim, K., et al., *Alterations of epinephrine-induced gluconeogenesis in aging*. *Exp Mol Med*, 2009. **41**(5): p. 334-40.

97. Mayr, B. and M. Montminy, *Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(8): p. 599-609.
98. Altarejos, J.Y. and M. Montminy, *CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(3): p. 141-51.
99. Yoon, J.C., et al., *Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1*. Nature, 2001. **413**(6852): p. 131-8.
100. Choi, D., et al., *Protein arginine methyltransferase 1 regulates hepatic glucose production in a FoxO1-dependent manner*. Hepatology, 2012. **56**(4): p. 1546-56.
101. Luo, Q., et al., *Mechanism of CREB recognition and coactivation by the CREB-regulated transcriptional coactivator CRTC2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(51): p. 20865-70.
102. Montminy, M., S.H. Koo, and X. Zhang, *The CREB family: key regulators of hepatic metabolism*. Ann Endocrinol (Paris), 2004. **65**(1): p. 73-5.
103. Habegger, K.M., et al., *The metabolic actions of glucagon revisited*. Nat Rev Endocrinol, 2010. **6**(12): p. 689-97.
104. Perry, R.J., et al., *Leptin Mediates a Glucose-Fatty Acid Cycle to Maintain Glucose Homeostasis in Starvation*. Cell, 2018. **172**(1-2): p. 234-248 e17.
105. Exton, J.H., et al., *Carbohydrate metabolism in perfused livers of adrenalectomized and steroid-replaced rats*. Am J Physiol, 1976. **230**(1): p. 163-70.
106. Ogura, M., et al., *Unilateral adrenalectomy improves insulin resistance and diabetes mellitus in a patient with ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia*. Endocr J, 2003. **50**(6): p. 715-21.
107. Rosenstock, J., et al., *The 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor INCB13739 improves hyperglycemia in patients with type 2 diabetes inadequately controlled by metformin monotherapy*. Diabetes Care, 2010. **33**(7): p. 1516-22.
108. Opherk, C., et al., *Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(6): p. 1346-53.
109. Di Dalmazi, G., et al., *Glucocorticoids and type 2 diabetes: from physiology to pathology*. J Nutr Metab, 2012. **2012**: p. 525093.
110. Murphy, G.S., et al., *The effect of single low-dose dexamethasone on blood glucose concentrations in the perioperative period: a randomized, placebo-controlled investigation in gynecologic surgical patients*. Anesth Analg, 2014. **118**(6): p. 1204-12.
111. Schneiter, P. and L. Tappy, *Kinetics of dexamethasone-induced alterations of glucose metabolism in healthy humans*. Am J Physiol, 1998. **275**(5): p. E806-13.
112. Haluzik, M., et al., *Adrenalectomy improves diabetes in A-ZIP/F-1 lipotrophic mice by increasing both liver and muscle insulin sensitivity*. Diabetes, 2002. **51**(7): p. 2113-8.
113. Bose, S.K., I. Hutson, and C.A. Harris, *Hepatic Glucocorticoid Receptor Plays a Greater Role Than Adipose GR in Metabolic Syndrome Despite Renal Compensation*. Endocrinology, 2016. **157**(12): p. 4943-4960.
114. Scott, D.K., et al., *Further characterization of the glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. The role of the glucocorticoid receptor-binding sites*. Mol Endocrinol, 1998. **12**(4): p. 482-91.

115. Imai, E., et al., *Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids*. J Biol Chem, 1993. **268**(8): p. 5353-6.
116. Cassuto, H., et al., *Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit*. J Biol Chem, 2005. **280**(40): p. 33873-84.
117. Wang, J.C., et al., *Hepatic nuclear factor 3 is an accessory factor required for the stimulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(7): p. 794-800.
118. Kallwellis-Opara, A., et al., *Characterization of cis-elements mediating the stimulation of glucose-6-phosphate transporter promoter activity by glucocorticoids*. Gene, 2003. **320**: p. 59-66.
119. Zhang, K., et al., *Hepatic suppression of Foxo1 and Foxo3 causes hypoglycemia and hyperlipidemia in mice*. Endocrinology, 2012. **153**(2): p. 631-46.
120. Edgerton, D.S., et al., *Insulin's direct hepatic effect explains the inhibition of glucose production caused by insulin secretion*. JCI Insight, 2017. **2**(6): p. e91863.
121. Raskin, P., Y. Fujita, and R.H. Unger, *Effect of insulin-glucose infusions on plasma glucagon levels in fasting diabetics and nondiabetics*. J Clin Invest, 1975. **56**(5): p. 1132-8.
122. Lewis, G.F., M. Vranic, and A. Giacca, *Glucagon enhances the direct suppressive effect of insulin on hepatic glucose production in humans*. Am J Physiol, 1997. **272**(3 Pt 1): p. E371-8.
123. Obici, S., et al., *Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production*. Nat Med, 2002. **8**(12): p. 1376-82.
124. Inoue, H., et al., *Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production*. Cell Metab, 2006. **3**(4): p. 267-75.
125. Ruud, J., S.M. Steculorum, and J.C. Bruning, *Neuronal control of peripheral insulin sensitivity and glucose metabolism*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15259.
126. Pozo, M. and M. Claret, *Hypothalamic Control of Systemic Glucose Homeostasis: The Pancreas Connection*. Trends Endocrinol Metab, 2018. **29**(8): p. 581-594.
127. Gelling, R.W., et al., *Insulin action in the brain contributes to glucose lowering during insulin treatment of diabetes*. Cell Metab, 2006. **3**(1): p. 67-73.
128. Pociu, A., et al., *Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production*. Nature, 2005. **434**(7036): p. 1026-31.
129. Sindelar, D.K., et al., *The role of fatty acids in mediating the effects of peripheral insulin on hepatic glucose production in the conscious dog*. Diabetes, 1997. **46**(2): p. 187-96.
130. Rebrin, K., et al., *Causal linkage between insulin suppression of lipolysis and suppression of liver glucose output in dogs*. J Clin Invest, 1996. **98**(3): p. 741-9.
131. Mittelman, S.D. and R.N. Bergman, *Inhibition of lipolysis causes suppression of endogenous glucose production independent of changes in insulin*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(3): p. E630-7.
132. Fisher, S.J. and C.R. Kahn, *Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production*. J Clin Invest, 2003. **111**(4): p. 463-8.
133. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.

134. White, M.F., *Insulin signaling in health and disease*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1710-1.
135. Kousteni, S., *FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism*. Bone, 2012. **50**(2): p. 437-43.
136. Huang, X., et al., *The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes*. Int J Biol Sci, 2018. **14**(11): p. 1483-1496.
137. I, O.S., et al., *FoxO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7079.
138. Puigserver, P., et al., *Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction*. Nature, 2003. **423**(6939): p. 550-5.
139. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
140. Aoyama, S. and S. Shibata, *Time-of-Day-Dependent Physiological Responses to Meal and Exercise*. Front Nutr, 2020. **7**: p. 18.
141. Lamia, K.A., K.F. Storch, and C.J. Weitz, *Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15172-7.
142. Stenvers, D.J., et al., *Circadian clocks and insulin resistance*. Nat Rev Endocrinol, 2019. **15**(2): p. 75-89.
143. Stokkan, K.A., et al., *Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding*. Science, 2001. **291**(5503): p. 490-3.
144. Rudic, R.D., et al., *BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis*. PLoS Biol, 2004. **2**(11): p. e377.
145. Panda, S., et al., *Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock*. Cell, 2002. **109**(3): p. 307-20.
146. Bass, J. and J.S. Takahashi, *Circadian integration of metabolism and energetics*. Science, 2010. **330**(6009): p. 1349-54.
147. Zhang, E.E., et al., *Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis*. Nat Med, 2010. **16**(10): p. 1152-6.
148. Lamia, K.A., et al., *Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 552-6.
149. Jang, H., et al., *SREBP1c-CRY1 signalling represses hepatic glucose production by promoting FOXO1 degradation during refeeding*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12180.
150. Freire-Regatillo, A., et al., *Non-Neuronal Cells in the Hypothalamic Adaptation to Metabolic Signals*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 51.
151. Shimazu, T. and S. Ogasawara, *Effects of hypothalamic stimulation on gluconeogenesis and glycolysis in rat liver*. Am J Physiol, 1975. **228**(6): p. 1787-93.
152. Shimazu, T. and Y. Minokoshi, *Systemic Glucoregulation by Glucose-Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus (VMH)*. J Endocr Soc, 2017. **1**(5): p. 449-459.
153. Meek, T.H., et al., *Functional identification of a neurocircuit regulating blood glucose*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(14): p. E2073-82.
154. Seoane-Collazo, P., et al., *SF1-Specific AMPKα1 Deletion Protects Against Diet-Induced Obesity*. Diabetes, 2018. **67**(11): p. 2213-2226.
155. Shapiro, H., et al., *Bile acids in glucose metabolism in health and disease*. J Exp Med, 2018. **215**(2): p. 383-396.

156. Garg, A. and S.M. Grundy, *Cholestyramine therapy for dyslipidemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A short-term, double-blind, crossover trial.* Ann Intern Med, 1994. **121**(6): p. 416-22.
157. Ma, K., et al., *Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis.* J Clin Invest, 2006. **116**(4): p. 1102-9.
158. Kim, Y.D., et al., *Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP.* Diabetes, 2008. **57**(2): p. 306-14.
159. Ahmad, T.R. and R.A. Haeusler, *Bile acids in glucose metabolism and insulin signalling - mechanisms and research needs.* Nat Rev Endocrinol, 2019. **15**(12): p. 701-712.
160. Potthoff, M.J., et al., *FGF15/19 regulates hepatic glucose metabolism by inhibiting the CREB-PGC-1alpha pathway.* Cell Metab, 2011. **13**(6): p. 729-38.
161. Shin, D.J. and T.F. Osborne, *FGF15/FGFR4 integrates growth factor signaling with hepatic bile acid metabolism and insulin action.* J Biol Chem, 2009. **284**(17): p. 11110-20.
162. Perry, R.J., et al., *FGF1 and FGF19 reverse diabetes by suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.* Nat Commun, 2015. **6**: p. 6980.
163. Li, X., *The FGF metabolic axis.* Front Med, 2019. **13**(5): p. 511-530.
164. Badman, M.K., et al., *Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states.* Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 426-37.
165. Bae, K.H., et al., *Alpha lipoic acid induces hepatic fibroblast growth factor 21 expression via up-regulation of CREBH.* Biochem Biophys Res Commun, 2014. **455**(3-4): p. 212-7.
166. Liang, Q., et al., *FGF21 maintains glucose homeostasis by mediating the cross talk between liver and brain during prolonged fasting.* Diabetes, 2014. **63**(12): p. 4064-75.
167. Zhang, B.B., G. Zhou, and C. Li, *AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome.* Cell Metab, 2009. **9**(5): p. 407-16.
168. Berglund, E.D., et al., *Hepatic energy state is regulated by glucagon receptor signaling in mice.* J Clin Invest, 2009. **119**(8): p. 2412-22.
169. Andreelli, F., et al., *Liver adenosine monophosphate-activated kinase-alpha2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin.* Endocrinology, 2006. **147**(5): p. 2432-41.
170. Hasenour, C.M., et al., *Liver AMP-Activated Protein Kinase Is Unnecessary for Gluconeogenesis but Protects Energy State during Nutrient Deprivation.* PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0170382.
171. Vidigal, J.A. and A. Ventura, *The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies.* Trends Cell Biol, 2015. **25**(3): p. 137-47.
172. Wang, B., et al., *Stat3-mediated activation of microRNA-23a suppresses gluconeogenesis in hepatocellular carcinoma by down-regulating glucose-6-phosphatase and peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha.* Hepatology, 2012. **56**(1): p. 186-97.
173. Ramirez, C.M., et al., *MicroRNA 33 regulates glucose metabolism.* Mol Cell Biol, 2013. **33**(15): p. 2891-902.
174. Fu, X., et al., *MicroRNA-26a regulates insulin sensitivity and metabolism of glucose and lipids.* J Clin Invest, 2015. **125**(6): p. 2497-509.

175. Herrera, M.G., et al., *Non-hormonal factors in the control of gluconeogenesis*. Adv Enzyme Regul, 1966. **4**: p. 225-35.
176. Shulman, G.I., et al., *Glucose disposal during insulinopenia in somatostatin-treated dogs. The roles of glucose and glucagon*. J Clin Invest, 1978. **62**(2): p. 487-91.
177. Sacca, L., R. Hendler, and R.S. Sherwin, *Hyperglycemia inhibits glucose production in man independent of changes in glucoregulatory hormones*. J Clin Endocrinol Metab, 1978. **47**(5): p. 1160-3.
178. Wahren, J., et al., *Splanchnic and peripheral glucose and amino acid metabolism in diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1972. **51**(7): p. 1870-8.
179. Sargsyan, A. and M.A. Herman, *Regulation of Glucose Production in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes*. Curr Diab Rep, 2019. **19**(9): p. 77.
180. Sharabi, K., C.D.J. Tavares, and P. Puigserver, *Regulation of Hepatic Metabolism, Recent Advances, and Future Perspectives*. Curr Diab Rep, 2019. **19**(10): p. 98.
181. Roden, M. and G.I. Shulman, *The integrative biology of type 2 diabetes*. Nature, 2019. **576**(7785): p. 51-60.
182. Abdul-Ghani, M.A. and R.A. DeFronzo, *Plasma glucose concentration and prediction of future risk of type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2009. **32** Suppl 2: p. S194-8.
183. Tabak, A.G., et al., *Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study*. Lancet, 2009. **373**(9682): p. 2215-21.
184. Bojsen-Moller, K.N., et al., *Hepatic Insulin Clearance in Regulation of Systemic Insulin Concentrations-Role of Carbohydrate and Energy Availability*. Diabetes, 2018. **67**(11): p. 2129-2136.
185. Kim, S.H. and G.M. Reaven, *Insulin clearance: an underappreciated modulator of plasma insulin concentration*. J Investig Med, 2016. **64**(7): p. 1162-5.
186. Jung, S.H., et al., *Adapting to insulin resistance in obesity: role of insulin secretion and clearance*. Diabetologia, 2018. **61**(3): p. 681-687.
187. Petersen, K.F., et al., *The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(31): p. 12587-94.
188. Titchenell, P.M., M.A. Lazar, and M.J. Birnbaum, *Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin*. Trends Endocrinol Metab, 2017. **28**(7): p. 497-505.
189. Perry, R.J., et al., *Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes*. Cell, 2015. **160**(4): p. 745-758.
190. Kubota, T., N. Kubota, and T. Kadowaki, *Imbalanced Insulin Actions in Obesity and Type 2 Diabetes: Key Mouse Models of Insulin Signaling Pathway*. Cell Metab, 2017. **25**(4): p. 797-810.
191. Monnier, L., et al., *The loss of postprandial glycemic control precedes stepwise deterioration of fasting with worsening diabetes*. Diabetes Care, 2007. **30**(2): p. 263-9.
192. Rizza, R.A., *Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy*. Diabetes, 2010. **59**(11): p. 2697-707.
193. Perry, R.J., et al., *The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes*. Nature, 2014. **510**(7503): p. 84-91.
194. Giugliano, D., A. Ceriello, and K. Esposito, *Glucose metabolism and hyperglycemia*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(1): p. 217S-222S.

195. Expert Committee on the, D. and M. Classification of Diabetes, *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2003. **26 Suppl 1**: p. S5-20.
196. Leiter, L.A., et al., *Postprandial glucose regulation: new data and new implications*. Clin Ther, 2005. **27 Suppl B**: p. S42-56.
197. Artasensi, A., et al., *Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs*. Molecules, 2020. **25**(8).
198. Knerr, P.J., et al., *Selection and progression of unimolecular agonists at the GIP, GLP-1, and glucagon receptors as drug candidates*. Peptides, 2020. **125**: p. 170225.
199. Clemmensen, C., et al., *Emerging hormonal-based combination pharmacotherapies for the treatment of metabolic diseases*. Nat Rev Endocrinol, 2019. **15**(2): p. 90-104.
200. Tschop, M.H., et al., *Unimolecular Polypharmacy for Treatment of Diabetes and Obesity*. Cell Metab, 2016. **24**(1): p. 51-62.
201. Lane, D.P. and L.V. Crawford, *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells*. Nature, 1979. **278**(5701): p. 261-3.
202. Linzer, D.I. and A.J. Levine, *Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells*. Cell, 1979. **17**(1): p. 43-52.
203. Levine, A.J. and M. Oren, *The first 30 years of p53: growing ever more complex*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(10): p. 749-58.
204. Levrero, M., et al., *The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 10)**: p. 1661-70.
205. Freed-Pastor, W.A. and C. Prives, *Mutant p53: one name, many proteins*. Genes Dev, 2012. **26**(12): p. 1268-86.
206. Joerger, A.C. and A.R. Fersht, *The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(6): p. a000919.
207. Kamada, R., et al., *Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications*. Biopolymers, 2016. **106**(4): p. 598-612.
208. Bao, F., et al., *p53 binding sites in normal and cancer cells are characterized by distinct chromatin context*. Cell Cycle, 2017. **16**(21): p. 2073-2085.
209. Li, M., et al., *Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2*. Science, 2003. **302**(5652): p. 1972-5.
210. Meek, D.W. and C.W. Anderson, *Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a000950.
211. Nag, S., et al., *The MDM2-p53 pathway revisited*. J Biomed Res, 2013. **27**(4): p. 254-71.
212. Ringshausen, I., et al., *Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo*. Cancer Cell, 2006. **10**(6): p. 501-14.
213. Allton, K., et al., *Trim24 targets endogenous p53 for degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(28): p. 11612-6.
214. Lee, E.W., et al., *Differential regulation of p53 and p21 by MKRN1 E3 ligase controls cell cycle arrest and apoptosis*. EMBO J, 2009. **28**(14): p. 2100-13.
215. Leng, R.P., et al., *Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation*. Cell, 2003. **112**(6): p. 779-91.
216. Dornan, D., et al., *The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53*. Nature, 2004. **429**(6987): p. 86-92.

217. Chen, D., et al., *ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor*. Cell, 2005. **121**(7): p. 1071-83.
218. Marine, J.C., M.A. Dyer, and A.G. Jochemsen, *MDMX: from bench to bedside*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 3): p. 371-8.
219. Lavin, M.F. and N. Gueven, *The complexity of p53 stabilization and activation*. Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 941-50.
220. Loughery, J., et al., *Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(12): p. 7666-80.
221. Yamaguchi, H., et al., *p53 acetylation is crucial for its transcription-independent proapoptotic functions*. J Biol Chem, 2009. **284**(17): p. 11171-83.
222. Chuikov, S., et al., *Regulation of p53 activity through lysine methylation*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 353-60.
223. Wu, S.Y. and C.M. Chiang, *p53 sumoylation: mechanistic insights from reconstitution studies*. Epigenetics, 2009. **4**(7): p. 445-51.
224. Brooks, C.L. and W. Gu, *p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond*. Mol Cell, 2006. **21**(3): p. 307-15.
225. Simbulan-Rosenthal, C.M., et al., *Poly(ADP-ribosylation) of p53 in vitro and in vivo modulates binding to its DNA consensus sequence*. Neoplasia, 2001. **3**(3): p. 179-88.
226. Xirodimas, D.P., et al., *Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity*. Cell, 2004. **118**(1): p. 83-97.
227. Yang, W.H., et al., *Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(10): p. 1074-83.
228. Hart, G.W. and Y. Akimoto, *The O-GlcNAc Modification*, in *Essentials of Glycobiology*, nd, et al., Editors. 2009: Cold Spring Harbor (NY).
229. Yang, X. and K. Qian, *Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(7): p. 452-465.
230. Hart, G.W., M.P. Housley, and C. Slawson, *Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins*. Nature, 2007. **446**(7139): p. 1017-22.
231. Cheung, W.D. and G.W. Hart, *AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 13009-20.
232. Taylor, R.P., et al., *Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of O-linked N-acetylglucosaminyltransferase*. J Biol Chem, 2008. **283**(10): p. 6050-7.
233. Lambert, M., B. Bastide, and C. Cieniewski-Bernard, *Involvement of O-GlcNAcylation in the Skeletal Muscle Physiology and Physiopathology: Focus on Muscle Metabolism*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 578.
234. Lothrop, A.P., M.P. Torres, and S.M. Fuchs, *Deciphering post-translational modification codes*. FEBS Lett, 2013. **587**(8): p. 1247-57.
235. Ruan, H.B., et al., *Cracking the O-GlcNAc code in metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(6): p. 301-9.
236. Dentin, R., et al., *Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2*. Science, 2008. **319**(5868): p. 1402-5.

237. Golks, A., et al., *Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation*. EMBO J, 2007. **26**(20): p. 4368-79.
238. Lewis, B.A. and J.A. Hanover, *O-GlcNAc and the epigenetic regulation of gene expression*. J Biol Chem, 2014. **289**(50): p. 34440-8.
239. Dehennaut, V., D. Leprince, and T. Lefebvre, *O-GlcNAcylation, an Epigenetic Mark. Focus on the Histone Code, TET Family Proteins, and Polycomb Group Proteins*. Front Endocrinol (Lausanne), 2014. **5**: p. 155.
240. Vosseller, K., et al., *Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5313-8.
241. Shi, J., et al., *O-GlcNAcylation regulates ischemia-induced neuronal apoptosis through AKT signaling*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14500.
242. Ruan, H.B., et al., *O-GlcNAc transferase enables AgRP neurons to suppress browning of white fat*. Cell, 2014. **159**(2): p. 306-17.
243. Lagerlöf, O., et al., *The nutrient sensor OGT in PVN neurons regulates feeding*. Science, 2016. **351**(6279): p. 1293-6.
244. Yang, Y., et al., *O-GlcNAc transferase inhibits visceral fat lipolysis and promotes diet-induced obesity*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 181.
245. Shi, H., et al., *Skeletal muscle O-GlcNAc transferase is important for muscle energy homeostasis and whole-body insulin sensitivity*. Mol Metab, 2018. **11**: p. 160-177.
246. Ruan, H.B., et al., *O-GlcNAc transferase/host cell factor C1 complex regulates gluconeogenesis by modulating PGC-1alpha stability*. Cell Metab, 2012. **16**(2): p. 226-37.
247. Housley, M.P., et al., *A PGC-1alpha-O-GlcNAc transferase complex regulates FoxO transcription factor activity in response to glucose*. J Biol Chem, 2009. **284**(8): p. 5148-57.
248. Housley, M.P., et al., *O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose*. J Biol Chem, 2008. **283**(24): p. 16283-92.
249. Ruan, H.B., et al., *Calcium-dependent O-GlcNAc signaling drives liver autophagy in adaptation to starvation*. Genes Dev, 2017. **31**(16): p. 1655-1665.
250. Ansari, S.A. and B.S. Emerald, *The Role of Insulin Resistance and Protein O-GlcNAcylation in Neurodegeneration*. Front Neurosci, 2019. **13**: p. 473.
251. Springhorn, C., et al., *Exploring leukocyte O-GlcNAcylation as a novel diagnostic tool for the earlier detection of type 2 diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(12): p. 4640-9.
252. Walgren, J.L., et al., *High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(2): p. E424-34.
253. Myslicki, J.P., et al., *O-GlcNAc modification is associated with insulin sensitivity in the whole blood of healthy young adult males*. Diabetol Metab Syndr, 2014. **6**(1): p. 96.
254. Issad, T., E. Masson, and P. Pagesy, *O-GlcNAc modification, insulin signaling and diabetic complications*. Diabetes Metab, 2010. **36**(6 Pt 1): p. 423-35.
255. Yang, X., et al., *Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 964-9.

256. de Queiroz, R.M., et al., *Changes in O-Linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Homeostasis Activate the p53 Pathway in Ovarian Cancer Cells*. J Biol Chem, 2016. **291**(36): p. 18897-914.
257. Gurel, Z., et al., *Identification of O-GlcNAc modification targets in mouse retinal pericytes: implication of p53 in pathogenesis of diabetic retinopathy*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e95561.
258. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
259. Kruse, J.P. and W. Gu, *Modes of p53 regulation*. Cell, 2009. **137**(4): p. 609-22.
260. Horn, H.F. and K.H. Vousden, *Coping with stress: multiple ways to activate p53*. Oncogene, 2007. **26**(9): p. 1306-16.
261. Berkers, C.R., et al., *Metabolic regulation by p53 family members*. Cell Metab, 2013. **18**(5): p. 617-33.
262. Reed, S.M. and D.E. Quelle, *p53 Acetylation: Regulation and Consequences*. Cancers (Basel), 2014. **7**(1): p. 30-69.
263. Maiuri, M.C., et al., *Autophagy regulation by p53*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 181-5.
264. Green, D.R. and G. Kroemer, *Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1127-30.
265. Cairns, R.A., I.S. Harris, and T.W. Mak, *Regulation of cancer cell metabolism*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(2): p. 85-95.
266. Pavlova, N.N. and C.B. Thompson, *The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism*. Cell Metab, 2016. **23**(1): p. 27-47.
267. Aguilar, V. and L. Fajas, *Cycling through metabolism*. EMBO Mol Med, 2010. **2**(9): p. 338-48.
268. Giralt, A., et al., *E2F1 promotes hepatic gluconeogenesis and contributes to hyperglycemia during diabetes*. Mol Metab, 2018. **11**: p. 104-112.
269. Leal-Esteban, L.C. and L. Fajas, *Cell cycle regulators in cancer cell metabolism*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020. **1866**(5): p. 165715.
270. Lopez-Guadamillas, E., et al., *p21(Cip1) plays a critical role in the physiological adaptation to fasting through activation of PPARalpha*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34542.
271. Liu, J., et al., *Tumor suppressor p53 and metabolism*. J Mol Cell Biol, 2019. **11**(4): p. 284-292.
272. Sanchez-Macedo, N., et al., *Depletion of the novel p53-target gene carnitine palmitoyltransferase 1C delays tumor growth in the neurofibromatosis type I tumor model*. Cell Death Differ, 2013. **20**(4): p. 659-68.
273. Goldstein, I. and V. Rotter, *Regulation of lipid metabolism by p53 - fighting two villains with one sword*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(11): p. 567-75.
274. Yahagi, N., et al., *p53 Activation in adipocytes of obese mice*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25395-400.
275. Assaily, W., et al., *ROS-mediated p53 induction of Lpin1 regulates fatty acid oxidation in response to nutritional stress*. Mol Cell, 2011. **44**(3): p. 491-501.
276. Liu, Y., et al., *Ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway coordinates nutrient stress with lipid metabolism by regulating MCD and promoting fatty acid oxidation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(23): p. E2414-22.

277. Wang, X., et al., *A new role of p53 in regulating lipid metabolism*. J Mol Cell Biol, 2013. **5**(2): p. 147-50.
278. Porteiro, B., et al., *Hepatic p63 regulates steatosis via IKKbeta/ER stress*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15111.
279. Porteiro, B., et al., *Pharmacological stimulation of p53 with low-dose doxorubicin ameliorates diet-induced nonalcoholic steatosis and steatohepatitis*. Mol Metab, 2018. **8**: p. 132-143.
280. Krstic, J., et al., *p53 Functions in Adipose Tissue Metabolism and Homeostasis*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).
281. Al-Massadi, O., et al., *Pharmacological and Genetic Manipulation of p53 in Brown Fat at Adult But Not Embryonic Stages Regulates Thermogenesis and Body Weight in Male Mice*. Endocrinology, 2016. **157**(7): p. 2735-49.
282. Porteiro, B., et al., *Ghrelin requires p53 to stimulate lipid storage in fat and liver*. Endocrinology, 2013. **154**(10): p. 3671-9.
283. Quinones, M., et al., *p53 in AgRP neurons is required for protection against diet-induced obesity via JNK1*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 3432.
284. Mattaini, K.R., M.R. Sullivan, and M.G. Vander Heiden, *The importance of serine metabolism in cancer*. J Cell Biol, 2016. **214**(3): p. 249-57.
285. Ou, Y., et al., *p53 Protein-mediated regulation of phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) is crucial for the apoptotic response upon serine starvation*. J Biol Chem, 2015. **290**(1): p. 457-66.
286. Hu, W., et al., *Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(16): p. 7455-60.
287. Prokesch, A., et al., *Liver p53 is stabilized upon starvation and required for amino acid catabolism and gluconeogenesis*. FASEB J, 2017. **31**(2): p. 732-742.
288. Ward, P.S. and C.B. Thompson, *Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate*. Cancer Cell, 2012. **21**(3): p. 297-308.
289. Liberti, M.V. and J.W. Locasale, *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?* Trends Biochem Sci, 2016. **41**(3): p. 211-218.
290. Liu, S., et al., *Quantitative Analysis of the Physiological Contributions of Glucose to the TCA Cycle*. Cell Metab, 2020. **32**(4): p. 619-628.e21.
291. Li, H. and G. Jogl, *Structural and biochemical studies of TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator)*. J Biol Chem, 2009. **284**(3): p. 1748-54.
292. Bensaad, K., et al., *TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis*. Cell, 2006. **126**(1): p. 107-20.
293. Contractor, T. and C.R. Harris, *p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2*. Cancer Res, 2012. **72**(2): p. 560-7.
294. Wang, L., et al., *Hexokinase 2-mediated Warburg effect is required for PTEN- and p53-deficiency-driven prostate cancer growth*. Cell Rep, 2014. **8**(5): p. 1461-74.
295. Schwartzenberg-Bar-Yoseph, F., M. Armoni, and E. Karnieli, *The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression*. Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2627-33.
296. Kawauchi, K., et al., *p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(5): p. 611-8.

297. Janku, F., T.A. Yap, and F. Meric-Bernstam, *Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway?* Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(5): p. 273-291.
298. Stambolic, V., et al., *Regulation of PTEN transcription by p53*. Mol Cell, 2001. **8**(2): p. 317-25.
299. Zhang, C., et al., *Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(39): p. 16259-64.
300. Liu, J., et al., *Parkinson's disease-associated protein Parkin: an unusual player in cancer*. Cancer Commun (Lond), 2018. **38**(1): p. 40.
301. Webster, N.J., et al., *Repression of the insulin receptor promoter by the tumor suppressor gene product p53: a possible mechanism for receptor overexpression in breast cancer*. Cancer Res, 1996. **56**(12): p. 2781-8.
302. Zhang, P., et al., *Tumor suppressor p53 cooperates with SIRT6 to regulate gluconeogenesis by promoting FoxO1 nuclear exclusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(29): p. 10684-9.
303. Minamino, T., et al., *A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance*. Nat Med, 2009. **15**(9): p. 1082-7.
304. Armata, H.L., et al., *Requirement of the ATM/p53 tumor suppressor pathway for glucose homeostasis*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(24): p. 5787-94.
305. Li, X., et al., *The MDM2-p53-pyruvate carboxylase signalling axis couples mitochondrial metabolism to glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11740.
306. Schupp, M., et al., *Metabolite and transcriptome analysis during fasting suggest a role for the p53-Ddit4 axis in major metabolic tissues*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 758.
307. Wang, S.J., et al., *p53-Dependent regulation of metabolic function through transcriptional activation of pantothenate kinase-1 gene*. Cell Cycle, 2013. **12**(5): p. 753-61.
308. Goldstein, I., et al., *p53 promotes the expression of gluconeogenesis-related genes and enhances hepatic glucose production*. Cancer Metab, 2013. **1**(1): p. 9.
309. Kellendonk, C., et al., *Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase*. Genesis, 2000. **26**(2): p. 151-3.
310. Wunderlich, F.T., et al., *Interleukin-6 signaling in liver-parenchymal cells suppresses hepatic inflammation and improves systemic insulin action*. Cell Metab, 2010. **12**(3): p. 237-49.
311. Levine, S. and A. Saltzman, *Feeding sugar overnight maintains metabolic homeostasis in rats and is preferable to overnight starvation*. Lab Anim, 2000. **34**(3): p. 301-6.
312. Hughey, C.C., et al., *Approach to assessing determinants of glucose homeostasis in the conscious mouse*. Mamm Genome, 2014. **25**(9-10): p. 522-38.
313. Yang, Y., et al., *Alteration of de novo glucose production contributes to fasting hypoglycaemia in Fyn deficient mice*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e81866.
314. Quinones, M., et al., *Circulating Irisin Levels Are Not Regulated by Nutritional Status, Obesity, or Leptin Levels in Rodents*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 620919.
315. Ozcan, L., et al., *Calcium signaling through CaMKII regulates hepatic glucose production in fasting and obesity*. Cell Metab, 2012. **15**(5): p. 739-51.

316. American Diabetes, A., *Postprandial blood glucose*. American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 2001. **24**(4): p. 775-8.
317. Meng, Z.X., et al., *Glucose Sensing by Skeletal Myocytes Couples Nutrient Signaling to Systemic Homeostasis*. *Mol Cell*, 2017. **66**(3): p. 332-344 e4.
318. Schneeberger, M., et al., *Reduced alpha-MSH Underlies Hypothalamic ER-Stress-Induced Hepatic Gluconeogenesis*. *Cell Rep*, 2015. **12**(3): p. 361-70.
319. Ahmed, S.S., et al., *Gene transfer in the liver using recombinant adeno-associated virus*. *Curr Protoc Microbiol*, 2013. **Chapter 14**: p. Unit14D 6.
320. Sands, M.S., *AAV-mediated liver-directed gene therapy*. *Methods Mol Biol*, 2011. **807**: p. 141-57.
321. Branda, C.S. and S.M. Dymecki, *Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice*. *Dev Cell*, 2004. **6**(1): p. 7-28.
322. Konner, A.C., et al., *Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production*. *Cell Metab*, 2007. **5**(6): p. 438-49.
323. Pfeifer, A.M., et al., *Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(11): p. 5123-7.
324. Knowles, B.B., C.C. Howe, and D.P. Aden, *Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen*. *Science*, 1980. **209**(4455): p. 497-9.
325. Bressac, B., et al., *Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(5): p. 1973-7.
326. Qiu, G.H., et al., *Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B*. *Cytotechnology*, 2015. **67**(1): p. 1-12.
327. Okamoto, T., et al., *Establishment and characterization of a novel method for evaluating gluconeogenesis using hepatic cell lines, H4IIE and HepG2*. *Arch Biochem Biophys*, 2009. **491**(1-2): p. 46-52.
328. Iglesias, C., et al., *The MST3/STK24 kinase mediates impaired fasting blood glucose after a high-fat diet*. *Diabetologia*, 2017. **60**(12): p. 2453-2462.
329. Pepe, F., et al., *Regulation of miR-483-3p by the O-linked N-acetylglucosamine transferase links chemosensitivity to glucose metabolism in liver cancer cells*. *Oncogenesis*, 2017. **6**(5): p. e328.
330. Gloster, T.M. and D.J. Vocadlo, *Mechanism, Structure, and Inhibition of O-GlcNAc Processing Enzymes*. *Curr Signal Transduct Ther*, 2010. **5**(1): p. 74-91.
331. Luanpitpong, S., et al., *Hyper-O-GlcNAcylation induces cisplatin resistance via regulation of p53 and c-Myc in human lung carcinoma*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 10607.
332. Ortiz-Meoz, R.F., et al., *A small molecule that inhibits OGT activity in cells*. *ACS Chem Biol*, 2015. **10**(6): p. 1392-7.
333. Cyphert, H.A., et al., *Glucagon stimulates hepatic FGF21 secretion through a PKA- and EPAC-dependent posttranscriptional mechanism*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e94996.
334. Alasbahi, R.H. and M.F. Melzig, *Forskolin and derivatives as tools for studying the role of cAMP*. *Pharmazie*, 2012. **67**(1): p. 5-13.
335. Grau, M., M. Soley, and I. Ramirez, *Interaction between adrenaline and epidermal growth factor in the control of liver glycogenolysis in mouse*. *Endocrinology*, 1997. **138**(6): p. 2601-9.

336. Ma, R., et al., *Switch of glycolysis to gluconeogenesis by dexamethasone for treatment of hepatocarcinoma*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2508.
337. Cheng, K.K., et al., *APPL1 potentiates insulin-mediated inhibition of hepatic glucose production and alleviates diabetes via Akt activation in mice*. Cell Metab, 2009. **9**(5): p. 417-27.
338. Jo, H., et al., *Small molecule-induced cytosolic activation of protein kinase Akt rescues ischemia-elicited neuronal death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(26): p. 10581-6.
339. Matsumoto, M. and M. Sakai, *Glucose Production Assay in Primary Mouse Hepatocytes*. Bio-protocol, 2012. **2**(21): p. e284.
340. So, E.Y. and T. Ouchi, *BRAT1 deficiency causes increased glucose metabolism and mitochondrial malfunction*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 548.
341. Chutkow, W.A., et al., *Thioredoxin-interacting protein (Txnip) is a critical regulator of hepatic glucose production*. J Biol Chem, 2008. **283**(4): p. 2397-406.
342. Perry, R.J., et al., *Glucagon stimulates gluconeogenesis by INSP3R1-mediated hepatic lipolysis*. Nature, 2020. **579**(7798): p. 279-283.
343. Jia, L., et al., *Purbeta promotes hepatic glucose production by increasing Adcy6 transcription*. Mol Metab, 2020. **31**: p. 85-97.
344. Bartok, O., et al., *The transcription factor Cabut coordinates energy metabolism and the circadian clock in response to sugar sensing*. EMBO J, 2015. **34**(11): p. 1538-53.
345. Seoane, S., et al., *Cellular expression levels of the vitamin D receptor are critical to its transcriptional regulation by the pituitary transcription factor Pit-1*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(7): p. 1513-25.
346. American Diabetes, A., *(2) Classification and diagnosis of diabetes*. Diabetes Care, 2015. **38 Suppl**: p. S8-S16.
347. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. **41**(6): p. 1313-21.
348. Miller, J., *Reaction time analysis with outlier exclusion: bias varies with sample size*. Q J Exp Psychol A, 1991. **43**(4): p. 907-12.
349. SHAPIRO, S.S. and M.B. WILK, *An analysis of variance test for normality (complete samples)*. Biometrika, 1965. **52**(3-4): p. 591-611.
350. Razali, N.M. and Y.B. Wah. *Power comparisons of Shapiro-Wilk , Kolmogorov-Smirnov , Lilliefors and Anderson-Darling tests*. Journal of Statistical Modeling and Analytics, 2011. **2**(1): p. 21-33.
351. Kao, L.S. and C.E. Green, *Analysis of variance: is there a difference in means and what does it mean?* J Surg Res, 2008. **144**(1): p. 158-70.
352. Winter, J.D. *Using the Student's t-test with extremely small sample sizes*. 2013.
353. student, *the probable error of a mean*. Biometrika, 1908. **6**(1): p. 1-25.
354. Nakai, H., et al., *Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice*. J Virol, 2005. **79**(1): p. 214-24.
355. Wang, L., et al., *Systematic evaluation of AAV vectors for liver directed gene transfer in murine models*. Mol Ther, 2010. **18**(1): p. 118-25.
356. Kattenhorn, L.M., et al., *Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Liver Disease*. Hum Gene Ther, 2016. **27**(12): p. 947-961.
357. Fried, S.K., et al., *Regulation of leptin production in humans*. J Nutr, 2000. **130**(12): p. 3127S-3131S.

358. Hafner, A., et al., *The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019. **20**(4): p. 199-210.
359. Love, D.C., et al., *Dynamic O-GlcNAc cycling at promoters of *Caenorhabditis elegans* genes regulating longevity, stress, and immunity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(16): p. 7413-8.
360. Chichelnitskiy, E., et al., *In vivo phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter mapping identifies disrupted hormonal synergism as a target of inflammation during sepsis in mice*. *Hepatology*, 2009. **50**(6): p. 1963-71.
361. Edgerton, D.S., et al., *Targeting insulin to the liver corrects defects in glucose metabolism caused by peripheral insulin delivery*. *JCI Insight*, 2019. **5**.
362. Ceriello, A., *Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat?* *Diabetes*, 2005. **54**(1): p. 1-7.
363. Leiter, L.A., et al., *Postprandial glucose regulation: new data and new implications*. *Clin Ther*, 2005. **27 Suppl B**: p. S42-56.
364. Woerle, H.J., et al., *Impact of fasting and postprandial glycemia on overall glycemic control in type 2 diabetes Importance of postprandial glycemia to achieve target HbA1c levels*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2007. **77**(2): p. 280-5.
365. Kuzuya, T., et al., *Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2002. **55**(1): p. 65-85.
366. Gerhart, S.V., et al., *Activation of the p53-MDM4 regulatory axis defines the anti-tumour response to PRMT5 inhibition through its role in regulating cellular splicing*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 9711.
367. Liu, Y., et al., *The past, present and future of potential small-molecule drugs targeting p53-MDM2/MDMX for cancer therapy*. *Eur J Med Chem*, 2019. **176**: p. 92-104.
368. Subhash, V.V., et al., *Anti-tumor efficacy of Selinexor (KPT-330) in gastric cancer is dependent on nuclear accumulation of p53 tumor suppressor*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 12248.
369. Ladds, M.J.G.W. and S. Laín, *Small molecule activators of the p53 response*. *J Mol Cell Biol*, 2019. **11**(3): p. 245-254.
370. Sabapathy, K. and D.P. Lane, *Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018. **15**(1): p. 13-30.
371. Pitolli, C., et al., *Do Mutations Turn p53 into an Oncogene?* *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(24).
372. Yue, X., et al., *Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy*. *J Mol Biol*, 2017. **429**(11): p. 1595-1606.
373. Datta, A., et al., *p53 gain-of-function mutations increase Cdc7-dependent replication initiation*. *EMBO Rep*, 2017. **18**(11): p. 2030-2050.
374. Olive, K.P., et al., *Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome*. *Cell*, 2004. **119**(6): p. 847-60.
375. Gomes, A.S., et al., *p53 and glucose metabolism: an orchestra to be directed in cancer therapy*. *Pharmacol Res*, 2018. **131**: p. 75-86.
376. Itahana, Y. and K. Itahana, *Emerging Roles of p53 Family Members in Glucose Metabolism*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(3).
377. Kruiswijk, F., C.F. Labuschagne, and K.H. Vousden, *p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015. **16**(7): p. 393-405.

378. Zhao, Y., et al., *Selective anti-tumor activity of wogonin targeting the Warburg effect through stabilizing p53*. *Pharmacol Res*, 2018. **135**: p. 49-59.
379. Matoba, S., et al., *p53 regulates mitochondrial respiration*. *Science*, 2006. **312**(5780): p. 1650-3.
380. Jiang, P., et al., *p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase*. *Nat Cell Biol*, 2011. **13**(3): p. 310-6.
381. Liu, Y., O. Tavana, and W. Gu, *p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian*. *J Mol Cell Biol*, 2019. **11**(7): p. 564-577.
382. Dhahbi, J.M., et al., *Calories and aging alter gene expression for gluconeogenic, glycolytic, and nitrogen-metabolizing enzymes*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(2): p. E352-60.
383. Nakae, J., M. Oki, and Y. Cao, *The FoxO transcription factors and metabolic regulation*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(1): p. 54-67.
384. Singh, B.K., et al., *FoxO1 deacetylation regulates thyroid hormone-induced transcription of key hepatic gluconeogenic genes*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(42): p. 30365-72.
385. Fasano, C., et al., *FOXO3a from the Nucleus to the Mitochondria: A Round Trip in Cellular Stress Response*. *Cells*, 2019. **8**(9).
386. Zhang, Y., et al., *Regulation of hepatic gluconeogenesis by nuclear factor Y transcription factor in mice*. *J Biol Chem*, 2018. **293**(20): p. 7894-7904.
387. Sharabi, K., et al., *Selective Chemical Inhibition of PGC-1 α Gluconeogenic Activity Ameliorates Type 2 Diabetes*. *Cell*, 2017. **169**(1): p. 148-160.e15.
388. Fanelli, C., et al., *Relative roles of insulin and hypoglycaemia on induction of neuroendocrine responses to, symptoms of, and deterioration of cognitive function in hypoglycaemia in male and female humans*. *Diabetologia*, 1994. **37**(8): p. 797-807.
389. Schwartz, N.S., et al., *Glycemic thresholds for activation of glucose counterregulatory systems are higher than the threshold for symptoms*. *J Clin Invest*, 1987. **79**(3): p. 777-81.
390. Lamers, W.H., R.W. Hanson, and H.M. Meisner, *cAMP stimulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver nuclei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(17): p. 5137-41.
391. Dungan, K.M., S.S. Braithwaite, and J.C. Preiser, *Stress hyperglycaemia*. *Lancet*, 2009. **373**(9677): p. 1798-807.
392. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haeften, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. *Lancet*, 2005. **365**(9467): p. 1333-46.
393. Posner, B.I., *Insulin Signalling: The Inside Story*. *Can J Diabetes*, 2017. **41**(1): p. 108-113.
394. Sun, Y., et al., *Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(26): p. 23301-7.
395. Wang, P.Y., et al., *Increased oxidative metabolism in the Li-Fraumeni syndrome*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(11): p. 1027-32.
396. Hanson, R.W. and L. Reshef, *Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression*. *Annu Rev Biochem*, 1997. **66**: p. 581-611.





Listado de Anexos para la tramitación de la tesis:

- **Anexo 1.** Documentación para tesis que implican a seres humanos, sus muestras o sus datos de carácter personal: declaración del comité de ética, código del registro del estudio, y copia del informe favorable.
- **Anexo 2:** Documentación para tesis que implican estudios con animales de experimentación:
 - A) Declaración de autorización.
 - B) Copia del certificado de capacitación del doctorando.





Universidad
de Navarra

Comité de Ética de la Investigación

Doña BEATRIZ GONZÁLEZ G^a DE BORDALLO, Secretaria Técnica del Comité de Ética de la Investigación de la Universidad de Navarra,

CERTIFICA: Que, en la sesión ordinaria celebrada el día 08/06/2017, el Comité examinó los aspectos éticos del proyecto **2017.104**, presentado por la Dra. **AMAIA RODRÍGUEZ MURUETA-GOYENA**, como Investigador Principal, titulado:

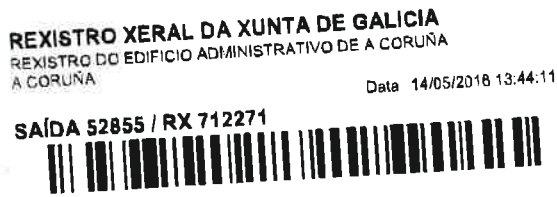
IMPLICACIÓN DE GUANILINA Y UROGUANILINA EN EL DESARROLLO DE OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA
IMPLICACIÓN DE GUANILINA Y UROGUANILINA EN EL DESARROLLO DE OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA

Se revisaron las respuestas del investigador a las cuestiones planteadas por el comité en la sesión ordinaria del día 05/10/2017, tras lo que se dictó un informe favorable para la realización de dicho proyecto, dado que ha considerado que se ajusta a las normas éticas esenciales y a los criterios deontológicos que rigen en este centro.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Pamplona, a 16 de octubre de 2017.

Dra. Beatriz González

Secretaria Técnica



José Manuel Cifuentes
Departamento de Anatomía
Facultade de Veterinaria
Campus Universitario
27002 Lugo

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15010/17/007

Data de inicio: 10.05.2018

Persoa interesada: Rubén Nogueiras Pozo

Forma de inicio: solicitude do interesado

Procedemento: resolución de autorización

ANTECEDENTES

A persoa interesada, como representante do centro CIMUS (Universidade de Santiago de Compostela), presentou primeiramente o 28.12.2017 e despois completou o 17.04.2018, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Mecanismos centrais e periféricos no control da homeostase enerxética

Nome do centro usuario: CIMUS

Persoa responsable do proxecto: Rubén Nogueiras Pozo

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Animalario da Facultade de Medicina do CIMUS

Clasificación do proxecto : Tipo I Tipo II Tipo III

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.
2. O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.





3. O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto, realizada polo órgano habilitado da Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009 de 30 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia (DOG 84, do 1 de maio de 2009) e o Decreto 166/2015, de 13 de novembro, polo que se aproba a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural (DOG 220, do 18 de novembro de 2015).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

- 1 Autorizar o proxecto solicitado.
- 2 O mencionado proxecto precisa someterse a unha avaliación retrospectiva aos tres anos.
- 3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos, transcorrido este tempo, deberá ser renovada esta autorización.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida, no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirada, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non lle pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante a conselleira de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícaselle ao CIMUS da USC esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.

A Coruña, 10 de maio de 2018
O xefe territorial

Manuel Rodríguez Vázquez





D./D.ª MARÍA JESÚS GONZÁLEZ RELLÁN
EDIF. CIMUS - AVDA. DE BARCELONA, S/N
15706 SANTIAGO DE
COMPOSTELA (CORUÑA)

Notifico a Vd. que el Sr. Director General de Agricultura y Ganadería, ha dictado la siguiente Resolución:

“Vista la solicitud formulada por D./D.ª MARÍA JESÚS GONZÁLEZ RELLÁN, con N.I.F. 33555153Q, para obtener el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Visto el informe favorable del Área de Protección Animal.

Considerando que el solicitante cumple con los requisitos para estimar su solicitud, de acuerdo a lo dispuesto en la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Esta Dirección General ha resuelto: reconocer la capacitación a D./D.ª MARÍA JESÚS GONZÁLEZ RELLÁN, con N.I.F. 33555153Q, para realizar, sin limitación de especie, las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, e incluirle en el correspondiente registro.

El mantenimiento de esta capacitación se debe demostrar al menos cada ocho años, en los términos que establece el artículo 20 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, a partir de la fecha de esta Resolución.

La presente Resolución no pone fin a la vía administrativa y contra la misma podrá interponer recurso de Alzada en el plazo de un mes a partir del día siguiente al de la recepción de esta notificación, ante el Viceconsejero de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, o ante el Director General de Agricultura y Ganadería o en cualquiera de las formas previstas en el artículo 38.4 de la Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común de conformidad con lo previsto en los artículos 107, 114 y 115 de dicha Ley.”

Se adjunta Certificado de Capacitación.

Madrid, 13 de octubre de 2015
ÁREA DE PROTECCIÓN ANIMAL
LA JEFA DE SECCIÓN TÉCNICA I

Fdo.: Sonia García Gómez

REGISTRO DE SALIDA
Ref.: 10/228449-9/15 Fecha: 24/11/2015 13:51



Cons. Medio Amb. Admon. Local y O.
Reg. C. Medio Amb. Adm. Local y Ord. T. (ALC)
Destino: MARÍA JESÚS GONZÁLEZ RELLÁN - EDIF. CIMU.





Comunidad de Madrid

RESOLUCIÓN DE RECONOCIMIENTO DE LA CAPACITACIÓN E INCLUSIÓN EN EL REGISTRO DE PERSONAL QUE MANEJA ANIMALES UTILIZADOS, CRIADOS O SUMINISTRADOS CON FINES DE EXPERIMENTACIÓN Y OTROS FINES CIENTÍFICOS, INCLUYENDO LA DOCENCIA (Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo)

Vista la solicitud formulada por D./D.ª MARÍA JESÚS GONZÁLEZ RELLÁN, con N.I.F. 33555153Q, para obtener el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Visto el informe favorable del Área de Protección Animal.

Considerando que el solicitante cumple con los requisitos para estimar su solicitud, de acuerdo a lo dispuesto en la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Esta Dirección General ha resuelto: reconocer la capacitación a D./D.ª MARÍA JESÚS GONZÁLEZ RELLÁN, con N.I.F. 33555153Q, para realizar, sin limitación de especie, las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, e incluirle en el correspondiente registro.

El mantenimiento de la capacitación se debe demostrar al menos cada ocho años, en los términos que establece el artículo 20 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, a partir de la fecha de esta Resolución.

La presente Resolución no pone fin a la vía administrativa y contra la misma podrá interponer recurso de Alzada en el plazo de un mes a partir del día siguiente al de la recepción de esta notificación, ante el Viceconsejero de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, o ante el Director General de Agricultura y Ganadería, o en cualquiera de las formas previstas en el artículo 38.4 de la Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común de conformidad con lo previsto en los artículos 107, 114 y 115 de dicha Ley.

Madrid, 13 de octubre de 2015
EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

Fdo.: José Luis Sanz Vicente



Certificado de reconocimiento de la capacitación para manejar animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Orden ECC 566/2015, de 20 de marzo

D./D.^a **MARÍA JESÚS GONZÁLEZ RELLÁN**, con N.I.F. **33555153Q**, ha obtenido el reconocimiento de la capacitación para realizar, sin limitación de especie, las funciones de:

EUTANASIA DE LOS ANIMALES

REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

Nº de certificado: CAP-T-0717-15

ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO

Dirección General de Agricultura y Ganadería

Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio

El reconocimiento de la capacitación para la realización de las funciones relacionadas en este certificado surtirá efecto en todo el territorio nacional.

Fecha

13 de octubre de 2015

Sello



Nombre y firma

EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

Fdo.: José Luis Sanz Vicente