





**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio genético y funcional de NR5A2, un factor de  
transcripción ligado a obesidad y diabetes**

**Memoria presentada por**

**ALFONSO BOLADO CARRANCIO**

**Licenciado en bioquímica,**

**para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria**



**D. José Carlos Rodríguez Rey**, Catedrático del Departamento de Biología  
Molecular de la Universidad de Cantabria

CERTIFICA:

Que la memoria de la Tesis Doctoral realizada bajo mi dirección por Don Alfonso Bolado Carrancio, la cual lleva por título: **“Estudio genético y funcional de NR5A2, un factor de transcripción ligado a obesidad y diabetes”**, reúne los requisitos necesarios para su presentación como memoria de doctorado con objeto de poder optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Santander, enero de 2013.

Fdo. José Carlos Rodríguez Rey.



Este trabajo ha sido posible gracias al proyecto “Genética de las enfermedades cardiovasculares: Análisis funcional de los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPS) en promotores de genes asociados a la obesidad” (FEA-SEA 2007), **Fundación Española de Arteriosclerosis**. Desde 2008 hasta 2010. Y al proyecto PS09/00962 “Contribución de la variabilidad en el promotor del gen del receptor de LDL a la hipercolesterolemia multigénica. Subproyecto 4: Caracterización funcional de variantes de la región promotora”. Entidad financiadora: **INSTITUTO DE SALUD CARLOS III**. Desde 2010 hasta 2012.



"Sin duda no hay progreso".  
-Charles Darwin.



A mis padres, a mis hermanos, a mi  
abuelo.



## AGRADECIMIENTOS

Hay un proverbio chino que dice *“Cuando bebas agua, recuerda la fuente”*, yo siempre lo he interpretado como que no hemos de olvidar al que te ayuda, por ello hay gente a la que quisiera mostrar mi agradecimiento.

En primer lugar a mi director Jose Carlos Rodríguez Rey por lo que me ha enseñado y por el trato recibido estos cuatro años. Pero principalmente por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis.

A mis padres y hermanos por su incondicional apoyo a ese extraño ser que trabaja con “bichos”. A mi novia por su incansable capacidad de comprensión.

A aquellos con los que he compartido grupo de investigación, Sandra Pampín, por haberme enseñado más de lo que yo pude aprender y Javier Pérez por su inestimable ayuda y capacidad para encontrar errores gramaticales.

A los catedráticos Javier León y Dolores Delgado, que siempre se mostraron interesados en mi trabajo. Al Dr. Jose Antonio Riancho por las muestras de pacientes y el estudio de asociación y al Dr. Jesús Sainz por el secuenciado de RNA, ya que sin sus aportaciones este trabajo habría sido imposible.

A toda la gente con quien compartí el laboratorio de bioquímica durante estos años: Juan, Manu, Gabi, Lucía, Maña, Pilar, María, Cortiguera, Cris, Andrea, Rosa y las Gandarillasas. Por su interés en mi trabajo, por su ayuda ante mis dudas y sobre todo por aguantarme estoicamente (en este apartado un agradecimiento extra para la Maña).

Hay muchísima más gente a la que tendría que reservar unas líneas, mucha y que sea tanta es lo mejor de estos cuatro años. Si pusiese sus nombres y los motivos de mi agradecimiento este pequeño apartado sería el más largo de la tesis y nada que escribiese les haría justicia. Como soy un hombre agradecido, pero pragmático prefiero pagaros una copa.



# ÍNDICES



**I. ÍNDICES.**  
**I.I. ÍNDICE.**  
**I.II. ÍNDICE DE FIGURAS.**  
**I.III. ÍNDICE DE TABLAS.**  
**II. ABREVIATURAS.**

**I.I. ÍNDICE.**

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
1.1. LAS MÚLTIPLES CARAS DE LA RESISTENCIA A INSULINA.	3
1.1.1. OBESIDAD.	3
1.1.1.1. FACTORES ASOCIADOS A LA OBESIDAD.	5
1.1.2. HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (NAFLD).	7
1.1.2.1. FACTORES ASOCIADOS A NAFLD.	8
1.1.3. DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DMT2).	10
1.1.3.1. TIPOS DE DMT2.	10
1.1.3.2. DESARROLLO DE LA DMT2.	11
1.1.3.3. FACTORES ASOCIADOS A LA DMT2.	12
1.2. LA VARIABILIDAD GENÉTICA COMO FACTOR DE SUSCEPTIBILIDAD.	12
1.3. POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIPO.	15
1.3.1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS SNPs.	17
1.4. RECEPTORES NUCLEARES.	19
1.4.1. CLASIFICACIÓN.	19
1.4.2. ESTRUCTURA.	20
1.4.3. MECANISMO DE ACCIÓN.	23
1.5. NR5A2.	25
1.5.1. ESTRUCTURA.	26
1.5.2. REGULACIÓN.	28
1.5.3. FUNCIONES DE NR5A2.	30
<b>2. OBJETIVOS.</b>	<b>37</b>
2.1. OBJETIVO PRINCIPAL.	39
2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.	39
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>43</b>
3.1. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES.	45
3.2. EXPERIMENTO DE RETARDO EN GEL (EMSA).	46
3.2.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES.	46
3.2.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO BRADFORD.	46
3.2.3. ANILLAMIENTO DE SONDAS PARA RETARDO EN GEL.	47
3.2.4. RETARDO EN GEL.	47

3.3. CLONADO.	48
3.3.1. PCR.	48
3.3.2. DESFOSFORILACIÓN DE LOS VECTORES.	49
3.3.3. LIGACIÓN.	49
3.3.4. TRANSFORMACIÓN.	49
3.4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD LUCIFERASA.	50
3.4.1. MEDICIÓN DE ACTIVIDAD LUCIFERASA.	50
3.5. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.	51
3.5.1. EXTRACCIÓN DE RNA.	51
3.5.2. SÍNTESIS DE cDNA.	52
3.5.3. PCR CUANTITATIVA.	52
3.5.4. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN.	53
3.6. GENERACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.	53
3.6.1. TRANSFECCIÓN DE siRNAs.	53
3.6.2. ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA QUE SOBREPRESA NR5A2.	54
3.6.3. ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA CON SILENCIAMIENTO DE NR5A2.	54
3.6.3.1. SINTESIS DE LENTIVIRUS.	55
3.6.3.2. TRANSFECCIÓN POR EL MÉTODO DE CaCl <sub>2</sub> .	55
3.6.3.3. PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN.	56
3.7. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE GLUCOSA.	57
3.8. DETERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS.	57
3.9. MEDICIÓN DE SECRECIÓN DE VLDL.	58
3.10. DETERMINACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE ACIDOS GRASOS.	59
<b>4. RESULTADOS.</b>	<b>63</b>
4.1. ASOCIACIÓN DEL SNP DEL PROMOTOR DE NR5A2 rs2816948.	65
4.1.1. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL SNP DEL PROMOTOR. DE NR5A2 rs2816948.	65
4.2. PAPEL DE LA EXPRESIÓN DE NR5A2 EN EL TRANSCRIPTOMA DE HEPG2.	67
4.3. VALIDACIÓN DE LAS LÍNEAS.	70
4.4. EFECTOS EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA.	72
4.5. EFECTOS EN EL METABOLISMO LIPÍDICO.	73
4.6. EFECTOS SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA.	74
4.7. EFECTOS SOBRE LA SÍNTESIS DE TAG.	74
4.8. EFECTO DEL DLPC EN LA ACTIVIDAD DE NR5A2.	75
4.9. EFECTO EN LA SECRECIÓN DE VLDL.	76
4.10. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Nr5a2 EN C2C12.	76
4.11. EFECTO EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA.	78
4.11.1. EFECTO EN EL CONSUMO DE GLUCOSA.	78
4.12. EFECTO EN EL METABOLISMO LIPÍDICO.	79
4.12.1. EFECTO EN LA DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.	80
<b>5. DISCUSIÓN.</b>	<b>83</b>

<b>6. CONCLUSIONES.</b>	<b>97</b>
6.1. CONCLUSIONES PARCIALES.	99
6.2. CONCLUSIÓN GENERAL.	99
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>103</b>
<b>8. ANEXOS.</b>	<b>119</b>
8.1. TABLAS SUPLEMENTARIAS.	121

## I.II. ÍNDICE DE FIGURAS.

### INTRODUCCIÓN.

Fig. I1. Distribución mundial de la obesidad.	4
Fig. I2. Efectos de la obesidad y enfermedades asociadas.	5
Fig. I3. Factores implicados en el desarrollo de la obesidad.	7
Fig. I4. Comparativa histológica entre hígado sano e hígado con NAFLD.	7
Fig. I5. Desarrollo de la NAFLD y enfermedades asociadas.	9
Fig. I6. Esquema del desarrollo de la DMT2.	11
Fig. I7. Factores asociados al desarrollo de enfermedades complejas y mendelianas.	13
Fig. I8. Distribución de los rSNPs en regiones promotoras	15
Fig. I9. Efecto de un SNP en la unión a factores de transcripción.	17
Fig. I10. Efectos de los rSNPs sobre la topología del DNA	18
Fig. I11. Estructura y tipos de interacción de los NR.	23
Fig. I12. Mecanismos de activación de los receptores nucleares.	24
Fig. I13. Estructura del gen de NR5A2 y de las isoformas descritas	26
Fig. I14. Principales moduladores de la actividad de NR5A2.	29

### MATERIALES Y MÉTODOS.

Fig. M1. Mapas de los vectores empleados para la síntesis de lentivirus.	56
--	----

### RESULTADOS.

Fig. R1. EMSA del SNP rs2816948.	66
Fig. R2. Resultados de los experimentos de actividad luciferasa.	67
Fig. R3. Expresión de NR5A2 tras el tratamiento con siRNAs.	68
Fig. R4. Caracterización de las líneas de HepG2.	70
Fig. R5. Comprobación de la modificación de la expresión de NR5A2.	71
Fig. R6. Efectos del silenciamiento de NR5A2 en el metabolismo de la glucosa.	72
Fig. R7. Efectos de la sobreexpresión de NR5A2 en el metabolismo de la glucosa.	72
Fig. R8. Efectos del silenciamiento de NR5A2 en el metabolismo lipídico.	73
Fig. R9. Efectos de la sobreexpresión de NR5A2 en el metabolismo lipídico.	73
Fig. R10. Efectos en el consumo de glucosa y en la síntesis de TAG.	74
Fig. R11. Efecto del DLPC sobre NR5A2.	75
Fig. R12. Liberación de VLDL.	76
Fig. R13. Efecto de NR5A2 en la diferenciación de C2C12.	77
Fig. R14. Efectos del DLPC en el metabolismo de la glucosa de C2C12.	78
Fig. R15. Efectos del DLPC en el consumo de glucosa en C2C12.	79
Fig. R16. Efectos del DLPC en el metabolismo lipídico de C2C12.	79
Fig. R17. Efectos del DLPC en degradación de ácidos grasos en C2C12.	80

### DISCUSIÓN.

Fig. D1. Ciclo de Randle su disrupción por NR5A2.	90
Fig. D2. Integración metabólica de las acciones de NR5A2.	93

### **I.III. ÍNDICE DE TABLAS.**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS.**

Tabla M1. Cebadores y secuenciada clonada del promotor de NR5A2.	46
--	----

#### **RESULTADOS.**

Tabla R1. Análisis bioinformático de rs2816948.	65
---	----

Tabla R2. Resumen de rutas afectadas en el secuenciado de RNA.	69
--	----

#### **TABLAS SUPLEMENTARIAS**

Tabla S1. Clasificación de los receptores nucleares.	121
--	-----

Tabla S2. Cebadores empleados en HepG2.	124
---	-----

Tabla S3. Cebadores empleados en C2C12.	124
---	-----







## **ABREVIATURAS**



## **A**

A.	Adenina.
ACC1	<i>Acetil-CoA carboxilase 1, cytosolic isoform.</i>
ACC2.	<i>Acetil-CoA carboxilase 2, mitochondrial isoform.</i>
AF-1.	Dominio activador de la transcripción 1.
AF-2.	Dominio activador de la transcripción 2.
AMPc.	AMP cíclico.
AP.	Ampicilina.
AP-1.	<i>Activator protein 1.</i>
APO.	Apolipoproteína. ( <i>Apolipoprotein</i> ).
APOA1.	<i>Apolipoprotein A1.</i>
APOB.	<i>Apolipoprotein B.</i>
APOM.	<i>Apolipoprotein M.</i>
AREs.	Secuencia rica en AU ( <i>AU rich element</i> ).
ATF3.	<i>Activating transcription factor 3.</i>
ATP.	Adenosín trifosfato.

## **B**

BSA.	Seroalbúmina bovina ( <i>Bovin serum albumine</i> ).
------	--

## **C**

C.	Citosina.
°C.	Grados centígrados.
CAPN10.	<i>Calpain-10.</i>
CEBPβ.	<i>CCAAT/enhancer binding protein β.</i>
CEL.	<i>Carboxyl ester lipase (bile salt-stimulated lipase).</i>
CEPT.	<i>Cholesteryl ester transfer protein.</i>
Ci.	Curio.
c-MYC.	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian).</i>
CNV.	Variaciones del número de copias ( <i>Copy number variation</i> ).
CoA.	Coenzima A ( <i>coenzyme A</i> ).
Cols.	Colaboradores.
Cpt1b.	<i>Carnitine palmitoyltransferase 1, muscle isoform.</i>
Cpt2.	<i>Carnitine palmitoyltransferase 2.</i>
Ct.	Ciclo de amplificación umbral ( <i>Threshold cycle</i> ).
CTE.	Extensión del C-terminal ( <i>C-Terminal extension</i> ).
CYP7A1.	<i>Cholesterol 7 alpha-hydroxylase.</i>
CYP8B1.	<i>Sterol 12-alpha-hydroxylase.</i>
CYP11A1.	<i>Cholesterol side-chain cleavage enzyme.</i>
CYP11B1.	<i>Steroid 11β-hydroxylase.</i>
CYP19.	<i>Aromatase.</i>

## **D**

DAX-1.	<i>Dosage-sensitive sex reversal.</i>
DBD.	Dominio de unión a DNA ( <i>DNA binding domain</i> ).
DLPC.	Dilauril-fosfocolina ( <i>1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i> ).
DMO.	Densidad mineral ósea.

DMT1.	Diabetes mellitus tipo 1 o insulino dependiente.
DMT2.	Diabetes mellitus tipo 2.
DNA.	Acido desoxirribonucleico.
cDNA.	DNA codificante.
DTT.	Ditiotreitol.

## E

EDTA.	Acido etilendiaminotetraacético.
ELISA.	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ).
EMSA.	Ensayo de retardo en gel. ( <i>electrophoretic mobility shift assay</i> ).
ER $\alpha$ .	<i>Estrogen receptor <math>\alpha</math></i> .

## F

FABP1.	<i>Fatty acid binding protein 1, liver isoform.</i>
FABP3.	<i>Fatty acid binding protein 3, muscle isoform.</i>
FASN.	<i>Fatty acid synthase.</i>
FBS.	Suero fetal bovino. ( <i>Fetal bovine serum</i> ).
FBP1.	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase 1.</i>
Fig.	Figura.
FTO.	<i>Fat mass and obesity-associated protein.</i>
FXR.	<i>Farnesoid X receptor.</i>

## G

G.	Guanina.
$\mu$ g.	Microgramo.
G6Pc.	<i>Glucose-6-phosphatase, catalytic subunit.</i>
G6PD.	<i>Glucose-6-phosphatasedehydrogenase.</i>
GATA.	<i>GATA sequence binding transcription factors.</i>
GATA3.	<i>GATA binding protein 3.</i>
GCK.	<i>Glucokinase.</i>
GCKR.	<i>Glucokinase regulator.</i>
GLUT4.	<i>Glucose transporter type 4.</i>
GYS1.	<i>Glycogen synthase 1, muscle isoform.</i>

## H

h.	Hora.
HDL.	Lipoproteína de alta densidad ( <i>High density lipoprotein</i> ).
HEPES.	N - ( 2 - hidroxietilo ) piperacina - n' - ( 2 - etano de ácido sulfónico ).
HHEX.	<i>Hematopoietically-expressed homeobox.</i>
HK1.	<i>Hexokinase 1.</i>
HK2.	<i>Hexokinase, muscle isoform.</i>
HNF1 $\alpha$ .	<i>Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox <math>\alpha</math>.</i>
HNF3 $\beta$ .	<i>Forkhead box A2/ hepatocyte nuclear factor 3, beta.</i>
HNF4 $\alpha$ .	<i>Hepatocyte nuclear factor 4 <math>\alpha</math>.</i>
HRE.	Elemento de respuesta a hormona ( <i>Hormone reponse element</i> ).
HRP.	<i>Horseradish peroxidase.</i>

HS. Suero de caballo (*Horse serum*).  
HSD3B2. *Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2*.  
HSP. Proteína de choque térmico (*Heat shock protein*).

## I

IGF2BP2. *Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2*.  
IL-1. *Interleukin 1*.  
IL1-RA. *Interleukin-1 receptor antagonist*.  
IL-6. *Interleukin 6*.  
ILF3. *Interleukin enhancer-binding factor 3*.  
IMC. Índice de masa corporal.

## J

Jun-D. *Jun D proto-oncogene*.

## K

KCNJ11. *Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11*.  
Kg. Kilogramo.

## L

μl. Microlitro.  
LADA. Diabetes tipo 1 de lenta progresión (*Latent autoimmune diabetes of adults*).  
LB. Medio Luria-Bertoni.  
LBD. Dominio de unión a ligando (*Ligand binding domain*).  
LDL. Lipoproteínas de baja densidad (*Low density lipoprotein*).  
LEP. *Leptin*.  
LEPR. *Leptin receptor*.  
LPL. *Lipoprotein lipase*.  
LPS. Lipopolisacarido (*Lipopolysaccharides*).  
LRH-1. *Liver receptor homolog-1*.  
LXRα. *Liver X receptor α*.

## M

M. Molar.  
MBF1. *Multiprotein bridging factor 1*.  
MC4R. *Melanocortin receptor 4*.  
mg. Miligramos.  
min. Minuto.  
miR-200C. Micro RNA 200c.  
ml. Mililitro.  
mM. Milimolar.  
nM. Nanomolar.

μM.	Micromolar.
mm.	Milímetro.
μm.	Micrómetro.
MODY.	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young.</i>
MYOG.	<i>Miogenin.</i>
MYOD.	<i>Myogenic differentiation protein 1.</i>

## N

N.	Normalidad.
NAFLD.	Hígado graso no alcohólico ( <i>Non alcoholic fatty liver disease</i> ).
NASH.	Esteatohepatitis no alcohólica ( <i>Non-alcoholic steatohepatitis</i> ).
NCBI.	<i>National Center for Biotechnology Information.</i>
NEFA.	Acido graso no esterificado ( <i>Non-esterified fatty acid</i> ).
NFE2.	<i>Nuclear factor, erythroid-derived 2.</i>
NIDDM.	<i>Non-insulin-dependent diabetes mellitus gene.</i>
nm.	Nanómetro.
NOTCH2.	<i>Neurogenic locus notch homolog protein 2.</i>
NR.	Receptor nuclear ( <i>Nuclear receptor</i> ).
NR5A2.	<i>Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2.</i>

## O

OCT4.	<i>Octamer-binding transcription factor 4.</i>
OMS.	Organización mundial de la salud.

## P

p.	Peso
pb.	Pares de bases.
PBS.	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate buffered saline</i> ).
PCR.	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain reaction</i> ).
qPCR.	PCR cuantitativa.
PDX1.	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1.</i>
PEPCK1.	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic isoform.</i>
PFKFB1.	<i>6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1.</i>
PGE <sub>2</sub> .	<i>Prostaglandin E2.</i>
PGC1α/a.	<i>PPARγ coactivator 1-alpha.</i>
PGYM.	<i>Myophosphorilase.</i>
PPARα/a.	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor α.</i>
PPARγ.	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ.</i>
PROX1.	<i>Prospero homeobox protein 1.</i>

## R

RNA.	Acido ribonucleico.
mRNA.	RNA mensajero.
shRNA.	<i>Small hairpin RNA.</i>
siRNA.	<i>Small interfering RNA.</i>
siRNAc.	<i>Non-target siRNA.</i>

ROS. Especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*).  
rpm. Revoluciones por minuto.

## S

SAA. *Serum amyloid protein A*.  
Seg. Segundo.  
SLC30A8. *Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8*.  
SHP1. *Small heterodimer partner 1*.  
SMRT. *Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid-hormone receptors*.  
SNP. Polimorfismo de nucleótido simple. (*Single nucleotide polymorphism*).  
cSNP. SNP de región codificante (*Codificant SNP*).  
rSNP. SNP regulador (*Regulatory SNP*).  
SOD2. *Superóxide dismutase 2*.  
SR-B1. *Scavenger receptor class B member 1*.  
SRC1. *Steroid receptor coactivator 1*.  
SRC3. *Steroid receptor coactivator 3*.

## T

T. Timina.  
TAE. Tampón tris-acético-EDTA.  
TAG. Triacilglicérido.  
TBE. Tampón tris-borato-EDTA.  
TBP. *TATA binding protein*.  
TBX3. *T-box 3*.  
TCF3. *Transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47)*.  
TCF7L2. *Transcription factor 7-like 2*.  
TFIB. *Transcription factor IB*.  
TFIIB. *Transcription factor IIB*.  
TFBS. Sitio de unión de factor de transcripción (*Transcription factor binding domain*).  
TNF $\alpha$ . *Tumor necrosis factor  $\alpha$* .  
TRIS. Tris(hidroximetil)aminometano.

## U

U. Unidad enzimática.  
UI. Unidad internacional.  
UTR. Región del mRNA no traducida (*Untranslated region*).

## V

v. Volumen.  
V. Voltio.  
VLDL. Lipoproteínas de muy baja densidad (*Very low density lipoprotein*).  
Vldlr. *VLDL receptor*.

**W**

WFS1.

*Wolframin.*

WNT.

*Wingless-type MMTV integration site family.*





## INTRODUCCIÓN

*“El trabajo del pensamiento se parece a la perforación de un pozo: el agua es turbia al principio, mas luego se clarifica.”*

- proverbio chino



Las enfermedades metabólicas: la diabetes melitus, la obesidad, dislipidemias, etc... constituyen uno de los mayores retos para la medicina actual. En los últimos años su prevalencia ha aumentado de manera significativa, siendo la principal causa de mortalidad. Pese a su gran importancia, aún se desconoce mucho sobre su componente genético. Estas enfermedades se han englobado dentro de la categoría de enfermedades complejas (1, 2).

Entre estas enfermedades se encuentran aquellas que se pueden englobar dentro de enfermedades metabólicas, como son la obesidad, las dislipemias o la diabetes mellitus tipo 2. Estas enfermedades se han asociado al denominado síndrome metabólico, un creciente problema de salud global (1-3). La resistencia a insulina es un factor estrechamente asociado al riesgo a desarrollar estas patologías, siendo el componente genético determinante para el desarrollo de ésta. Sin embargo aun se desconoce una gran parte de los genes asociados, por lo que localizar y caracterizar estos genes es una prioridad para entender la resistencia a insulina.

### **1.1. LAS MULTIPLES CARAS DE LA RESISTENCIA A INSULINA.**

#### **1.1.1. OBESIDAD.**

La obesidad es considerada actualmente como una enfermedad de origen multifactorial, caracterizada por una acumulación excesiva de grasa corporal. La OMS considera que una persona esta por encima de los niveles de grasa corporal normal cuando su IMC (*Índice de Masa Corporal*) es mayor de 25 Kg/m<sup>2</sup>. Para los valores de IMC comprendidos entre 25 y 29,9Kg/m<sup>2</sup> se considera que se padece sobrepeso y que a partir de 30Kg/m<sup>2</sup> se considera obeso. No obstante, este parámetro se usa de forma conjunta con distribución de la grasa en la circunferencia de la cintura o la medida del índice cintura cadera. Esto es debido a que el IMC no tiene en cuenta las proporciones de tejido adiposo y tejidos de otro origen (4).

## Introducción

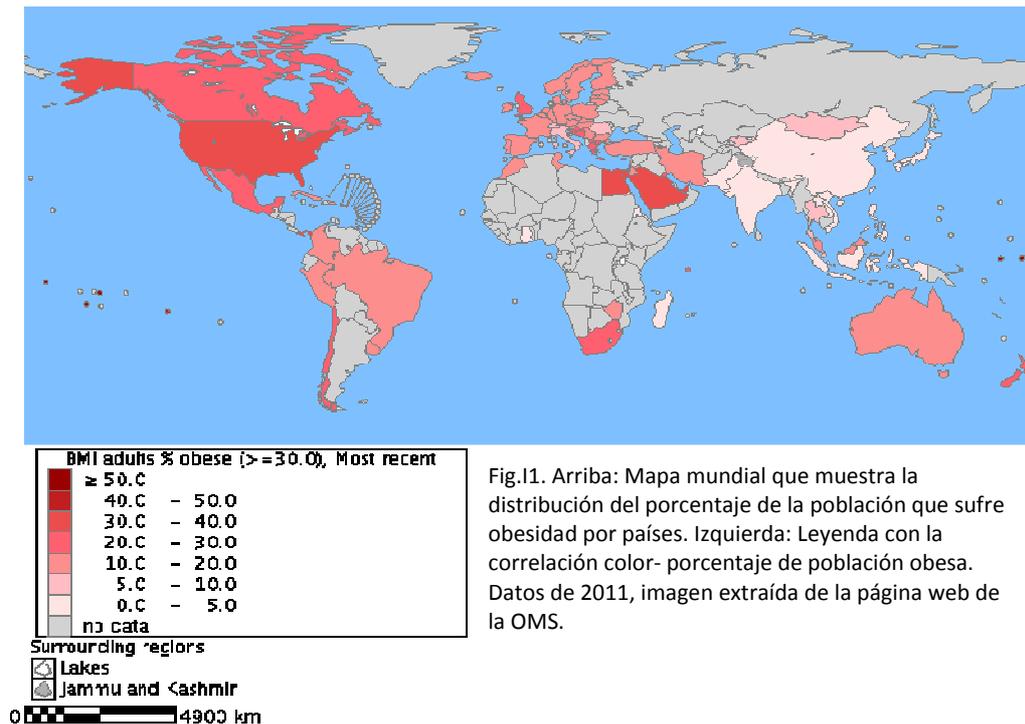


Fig.11. Arriba: Mapa mundial que muestra la distribución del porcentaje de la población que sufre obesidad por países. Izquierda: Leyenda con la correlación color- porcentaje de población obesa. Datos de 2011, imagen extraída de la página web de la OMS.

En una nota de prensa de mayo de 2012, la OMS estima que cada año se producen casi 3 millones de muertes como consecuencia del sobrepeso u obesidad. Una estimación de 2008 era que cerca de 1400 millones de adultos tenían un IMC  $\geq 25 \text{Kg/m}^2$ . De estos, cerca de 500 millones padecerían obesidad. En un estudio de 1998 se estimaba que en Europa el 15% de los hombres y el 22 % de las mujeres eran obesos; y que más de la mitad de la población adulta del continente tenía sobrepeso o era obesa (5).

En Estados Unidos un estudio sobre la evolución de la obesidad, entre 1999 y 2004, concluyó que en 2004 cerca del 32,2% de la población adulta del país sufría sobrepeso y que cerca del 5% obesidad. Así mismo el estudio señalaba un incremento en la obesidad infantil, situando el porcentaje de niños que sufrían sobrepeso u obesidad en el 17,1%.(6).

Además actualmente se considera que la obesidad es un factor de riesgo importante para sufrir otras enfermedades, las más relevantes parecen resumidas en la figura I3. Existen otras enfermedades, como ciertas patologías inflamatorias o dislipidemias que se suman a las anteriores (4).En la citada nota de la OMS se atribuye el 44% de la carga de diabetes, el 23% de la carga de cardiopatías isquémicas y entre el 7% y el 41% de la carga de algunos cánceres, al sobrepeso y la obesidad.

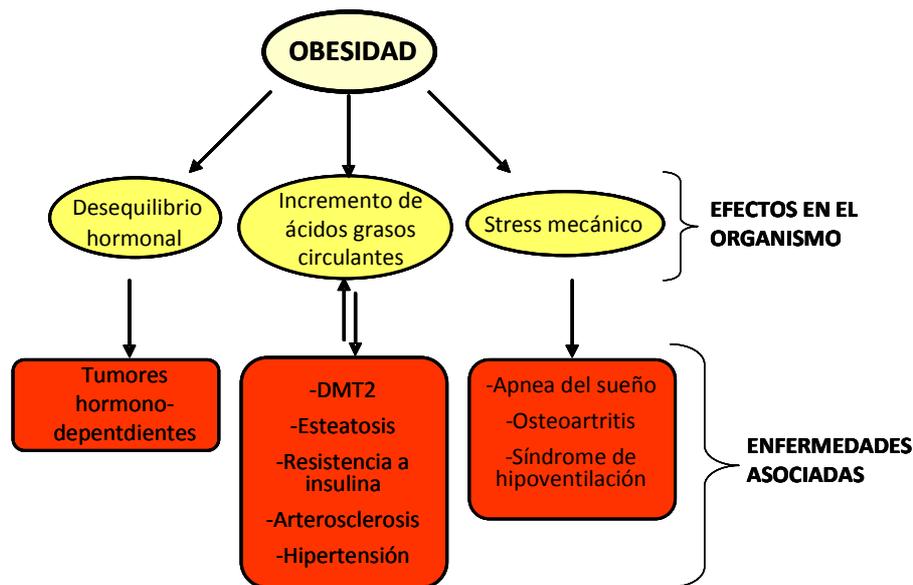


Fig. 12. Principales efectos en el organismo, y las enfermedades asociadas a estos, de la obesidad. La doble flecha indica el efecto de retroalimentación positiva en los niveles de ácidos grasos circulantes, las diferentes enfermedades asociadas y la obesidad.

#### 1.1.1.1. FACTORES ASOCIADOS A LA OBESIDAD.

La obesidad se considera una enfermedad compleja, con un factor genético multigénico. Sin embargo se han descritos varios genes que son capaces de inducir obesidad de origen monogénico (7-9). Los más importantes y mejor estudiadas, aunque no los únicas, son las obesidades inducidas por mutaciones en el gen de la leptina (*LEP*), de su receptor (*LEPR*) (7-10) y del receptor 4 de melanocortina (*MC4R*)(7,8,(11).

En el caso de la obesidad clásica, además de los factores genéticos, el ambiente y factores socioeconómicos juegan un papel en el riesgo de sufrir obesidad. La importancia relativa de estos factores ha sido debatida y, aunque es general su aceptación como factores asociados al desarrollo de la obesidad, su importancia relativa sigue siendo un objeto de controversia. Así, en los países desarrollados parece que existe relación entre el estilo de vida sedentario, con alta ingesta, y una mayor predisposición a la obesidad (4). No obstante, esta observación parece deberse más a la composición de la dieta que a la ingesta (4). En individuos obesos, seguir una dieta conjunto con ejercicio físico supuso una

## Introducción

disminución significativa de su IMC (5). Por otro lado, se ha sugerido que los factores socioeconómicos son determinantes a la hora de predecir el riesgo de un individuo a padecer obesidad. Esto se basa en estudios que muestran como la proporción de personas obesas es casi del doble en clases bajas que en clases altas (4).

Diversos estudios de niños adoptados y de gemelos adoptados (4, 7, 12) sugieren que los factores genéticos, asociados a la susceptibilidad a la obesidad, tienen mayor relevancia que el ambiente. Según estas investigaciones, las diferencias genéticas de una población podrían determinar qué individuos serían potencialmente obesos, en unas circunstancias ambientales determinadas. La mayoría de los investigadores están de acuerdo con que el balance energético y el peso corporal, es un fenómeno regulado. Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos que dirigen la ingesta, la actividad física y el metabolismo (12-14). Diversos estudios han señalado distintos grupos de genes, como asociados a la obesidad, desde la composición de la grasa corporal, su distribución anatómica, o su participación en procesos relacionados con la ingesta o el gasto energético, el tránsito y reparto de los nutrientes entre el músculo y el tejido adiposo (4, 15). Estos efectos, ya bien sea sobre la expresión o la actividad, sobre los distintos genes, son producidos por pequeños cambios en la expresión de estos grupos de genes. La acumulación de cambios induce un cambio fenotípico. Los principales responsables de estos cambios en la expresión son los polimorfismos de una sola base, o SNPs (16, 17). Los genes con SNPs asociados a obesidad son variados, siendo el más estudiado *FTO* (16-19), incluyendo a genes asociados a obesidades monogénicas (20).

La principal diferencia entre los factores ambientales y los genéticos, es que los primeros actúan afectando al balance ingesta/gasto, es decir estos factores producen obesidad si el individuo tiene un superávit de energía. Los segundos pueden afectar tanto, a este balance, como directamente al IMC y/o la distribución de grasa del individuo. Los factores que afectan al desarrollo de la obesidad, así como la forma en que producen este desarrollo aparecen resumidos en la figura I3.

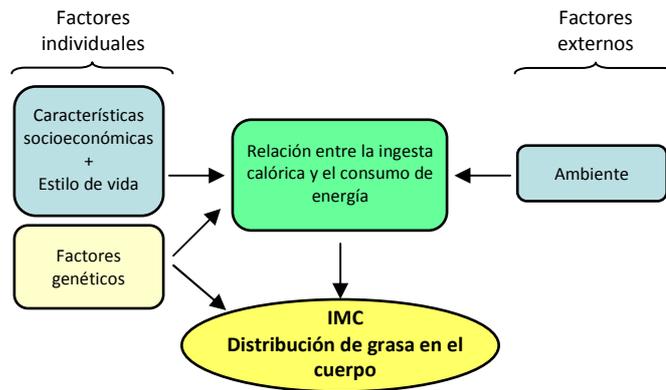


Fig. 13. Resumen de los distintos tipos de factores implicados en el desarrollo de la obesidad. Los distintos factores se pueden clasificar en factores propios del individuo, o individuales, y factores que no dependen del individuo o externos. Figura adaptada de (14).

### 1.1.2. HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (NAFLD).

El hígado graso no alcohólico o NAFLD, del inglés *nonalcoholic fatty liver disease*, es una enfermedad englobada dentro de las esteatosis hepáticas, o hígado graso. Este grupo de enfermedades hepáticas están asociadas a una acumulación anormal de ácidos grasos (Fig.14). Los ácidos grasos, principalmente TAG, se acumulan en forma de una macrovesícula, que ocupa casi todo el citoplasma. Esta acumulación induce lipotoxicidad, apoptosis, inflamación y mal funcionamiento del hígado (21, 22). Según la Asociación Americana de estudios de enfermedades hepáticas, se considera que una persona padece NAFLD cuando más del 5-10% del peso del hígado corresponde a los acúmulos de lípidos (21). Actualmente se considera que aquellas personas que padecen NAFLD tienen mayor riesgo de padecer dislipidemias, aterosclerosis, DMT2 y síndrome metabólico (21-23). Además se ha relacionado con el desarrollo de la resistencia a insulina (21, 22). Se considera que, actualmente, hay un prevalencia mundial del 20% (22), teniendo una

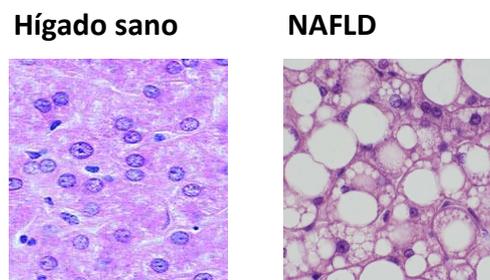


Fig. 14. Imágenes de cortes histológicos, teñidos con la técnica de hematoxilina eosina, de un hígado humano sano (Izquierda) y un hígado con NAFLD avanzada (Derecha). Los acúmulos de grasa aparecen de color blanco.

## Introducción

prevalencia del 75% en individuos obesos y del 50% en individuos con DMT2 (21).

El hígado graso no alcohólico, está considerado una enfermedad compleja, sin embargo dentro de esta se pueden distinguir distintos tipos: la NAFLD propiamente dicha y la NASH (*non alcoholic steatohepatitis*). La NASH es una forma más avanzada de NAFLD, asociada con hepatitis B o C y con deficiencia de la lipasa ácida lisosomal (21, 22). También se ha incluido dentro de la NAFLD formas de cirrosis hepáticas, la fase final de esteatosis no tratadas. Para que se considere un NAFLD propiamente dicha, no se debe de padecer hepatitis B o C, enfermedades autoinmunes que puedan inducir procesos inflamatorios y el consumo de alcohol no debe de superar los 20g/día (21). En la NAFLD se pueden distinguir 4 clases de estadios según la clasificación de Matteoni y cols. (21):

Estadio 1: Benigno, Hay acumulación de ácidos grasos, pero sin inflamación ni fibrosis.

Estadio 2: Esteatosis, con inflamación pero sin fibrosis.

Estadio 3: Esteatosis con inflamación y hepatocitos con forma esférica (acumulación masiva de lípidos).

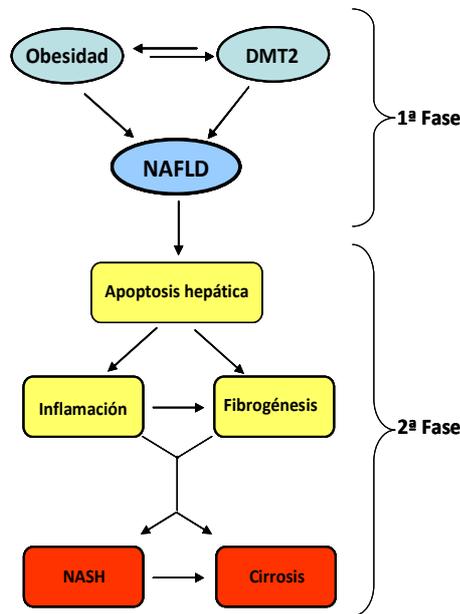
Estadio 4: Se presenta de forma adicional la fibrosis.

La NAFLD se considera una enfermedad con dos fases. En la 1ª fase se produce la acumulación de ácidos grasos en el hígado (21, 22), o esteatosis. En la 2ª fase se produce un daño asociado a lipotoxicidad: Apoptosis, incremento del estrés oxidativo, necrosis, inflamación y finalmente fibrosis (Fig.15). Si la 2ª fase se desarrolla con la suficiente intensidad la NAFLD deriva en NASH y, en el 10-15% de los casos, cirrosis (21). También se han documentado que en un pequeño número de casos, la NAFLD puede predisponer al individuo a ciertos tipos de hepatocarcinomas (21, 24, 25).

### 1.1.2.1. FACTORES ASOCIADOS A NAFLD.

Existen múltiples factores asociados a NAFLD siendo los más importantes, la sobrealimentación, el IMC junto con el perímetro de la cintura y la resistencia a

insulina (21-23). Otros factores a tener en cuenta son los niveles de VLDL (26, 27), la disminución de los niveles de HDL (28-30) o el desequilibrio de especies de ácidos grasos insaturados en la síntesis *de novo* (31, 32). Otros factores que



también influyen son la elevación de los niveles de citoquinas proinflamatorias (33, 34) y los sistemas de eliminación de ROS (*Reactive oxygen Species*) (32, 35, 36). Sin embargo en el caso de las enzimas asociadas a ROS se han asociado a NASH más estrechamente que a NAFLD, e incluso se ha sugerido que es a causa de su desregulación se produce el paso definitivo de NAFLD a patologías más avanzadas (35). La obesidad y la DMT2, son factores de

Fig. 15. Distintos estadios de la NAFLD. La primera fase, benigna, incluye las enfermedades asociadas y la primera fase de la NAFLD, la esteatosis. La segunda fase, incluye la patología asociada así como las posibles derivaciones a patologías más graves de la NAFLD.

riesgo debido al componente genético común con la NAFLD (21-24). Existen estudios de asociación con el riesgo de padecer NAFLD y su severidad, con las citoquinas proinflamatorias, IL-6 y TNF $\alpha$  (37, 38). También se han descrito

asociaciones con las hormonas leptina y adiponectina (37, 38), con los receptores nucleares de la familia PPAR (38) y con enzimas asociadas al stress oxidativo, como SOD2 (38, 39).

El efecto de la etnia ha sido constatado en diferentes estudios de asociación. Los resultados indican que las poblaciones latinoamericanas tienen un mayor riesgo a padecer NAFLD que las afroamericanas y las caucásicas (40). No obstante, no está claro si esto es debido a la genética, a la mayor prevalencia de la obesidad y de la resistencia a insulina, o a factores del estilo de vida y socioeconómicos (21, 22). La mayor incidencia en hombres y mujeres llevó a estudiar el efecto de las hormonas sexuales, comprobándose que existe un efecto protector del estradiol, debido a su acción como antioxidante (41).

## Introducción

### 1.1.3. DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DMT2).

La diabetes mellitus tipo 2 es el tipo de diabetes no insulino dependiente. Se trata de una enfermedad compleja que se caracteriza por la acumulación de glucosa en sangre, como consecuencia de una insulinoresistencia. Se considera que la diabetes mellitus tipo 2 supone en 80-90% de todas las diabetes. De este porcentaje el 75- 85%, aproximadamente, tienen origen multifactorial. El otro 15-25% se deben o bien a defectos monogénicos, como la diabetes MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) o a la diabetes LADA (*Latent Autoimmune Diabetes of Adults*) (42, 43).

#### 1.1.3.1. OTRAS DIABETES ASOCIADAS A LA DMT2.

Aparte de la DMT2 clásica, agrupada dentro de las enfermedades complejas, existía un tipo de DMT2 monogénica, la MODY, aunque en la actualidad ya no se la considera un tipo de DMT2, si no un tipo aparte de diabetes. La MODY engloba varios tipos de diabetes monogénicas, estando registradas 11. Cada MODY está producida por mutaciones en un único gen, produciendo defectos diferentes, aunque a la larga todas acaban induciendo diabetes (43). Se trata de enfermedades de tipo autosómico dominante, que se suelen expresar antes de los 25 años y en los que no hay efecto del ambiente. No hay obesidad ni esteatosis asociadas al desarrollo de este tipo de diabetes, además no suelen presentar hiperinsulinemia pese a la hiperglucemia en sangre (44). Aquellos que padecen este tipo de diabetes no necesitan, al menos los primeros años, el uso de insulina y su hiperglucemia se puede corregir mediante dieta. Los genes implicados son, en su mayoría, factores de transcripción asociados al desarrollo de las células beta pancreáticas, aunque existen excepciones como las MODYs asociadas a mutaciones en los genes de la *GCK* o *CEL*, así como en la síntesis y secreción de insulina (43).

La forma denominada LADA es debida a un defecto autoinmune. A diferencia de la DMT1, se da en adultos, pero su patología es, por lo demás, idéntica a la DMT1. En 2007, el Comité de expertos en diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus la incluyó como una forma tardía de DMT1 (44).

### 1.1.3.2. DESARROLLO DE LA DMT2.

En el riesgo a padecer una DMT2 clásica aparecen distintos factores. Por un lado se han descrito factores que afectan a la secreción de insulina o a la sensibilidad a esta, como la edad, el IMC, la distribución de grasa corporal, fumar y el ejercicio regular (42, 43). Dentro de los factores genéticos se pueden distinguir aquellos que directamente están asociados a padecer DMT2 y aquellos que están asociados a otras enfermedades. Entre las enfermedades que se encuentran asociadas a un aumento del riesgo de padecer DMT2 (42, 43) están la obesidad (13) y el NAFLD (30). Dentro de la génesis de la DMT2 podemos distinguir dos fases, una primera fase, en la que se inducirá resistencia a insulina (30, 42, 43) y una segunda donde se produce intolerancia a glucosa (42, 43) (Fig.16).

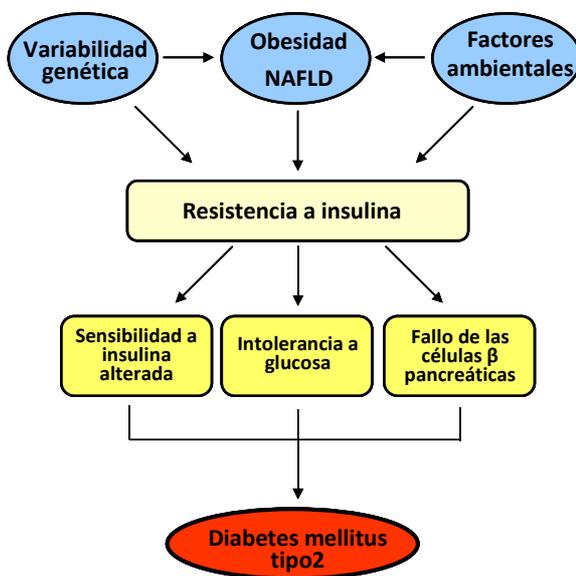


Fig. 16. Esquema del desarrollo de la DMT2.

En la primera fase los factores anteriormente mencionados, afectarán al metabolismo induciendo un incremento de los niveles de resistina, disminución de los niveles de adiponectina y de HDL (43, 45, 46); en el hígado se induce un incremento de la

En la primera fase los factores anteriormente mencionados, afectarán al metabolismo induciendo un incremento de los niveles de resistina, disminución de los niveles de adiponectina y de HDL (43, 45, 46); en el hígado se induce un incremento de la síntesis de glucosa (45) y de la síntesis de TAG (43, 46); en el tejido adiposo se produce una liberación de NEFAs por lipólisis (45, 46), además se produce hipertensión y liberación de citoquinas inflamatorias (45). Todo esto induce una desregulación entre los niveles de glucosa y los niveles de insulina efectivos, creando una hiperglucemia mantenida en el tiempo (45, 46). En el segundo paso el organismo responde elevando los niveles de insulina en sangre (hiperinsulinemia) (47, 48). El estado continuo de hiperinsulinemia acabará derivando en resistencia a insulina hepática y muscular. Esto produce una alteración de la sensibilidad a insulina e intolerancia a glucosa (42, 45, 48). Lo que induce que los niveles de glucosa en sangre se mantengan elevados, dando lugar a un círculo vicioso, así

## Introducción

como una disfunción y apoptosis de las células beta pancreáticas (47, 48). Cuando estos tres factores confluyen se considera que se ha desarrollado DMT2.

### 1.1.3.3. FACTORES ASOCIADOS A LA DMT2.

Los primeros locus asociados, se descubrieron en 1996, NIDDM1 (49) y NIDDM2 (50). En la actualidad se han asociado más de 36 genes con el riesgo de padecer esta enfermedad, sin embargo, se estima que esto sólo explica alrededor de un 10% del componente genético de la enfermedad (51). Entre los genes asociados a DMT2, los que más frecuentemente aparecen son, *CAPN10*, *TCF7L2*, *GCKR*, *PPARG*, *FTO*, *KCNJ11*, *NOTCH2*, *CEPT*, *WFS1*, *IGF2BP2*, *SLC30A8*, *APOB* y *HHEX* (43, 51-54). Además se encuentran asociadas variantes comunes de genes implicados en el desarrollo de otras enfermedades relacionadas. Ejemplos de esto son la leptina (55), su receptor (55-57), la IL-6 (58) o la adiponectina (59, 60). También se han encontrado variantes de genes los asociados a MODYs, *HNF-1α* y *HNF-4α*, asociados al riesgo de padecer DMT2 (43, 61).

La DMT2 se ha asociado a otras enfermedades, como la arterosclerosis (62, 63), dislipidemias (45) o NAFLD (43).

## 1.2. LA VARIABILIDAD GENÉTICA COMO FACTOR DE SUSCEPTIBILIDAD.

A diferencia de las enfermedades monogénicas, las enfermedades complejas no siguen un patrón de tipo mendeliano en su herencia. Como consecuencia no se puede predecir con la misma eficiencia si un individuo padecerá o no la enfermedad. Esto es debido, en primer lugar, a que las condiciones ambientales y los hábitos de vida del individuo tienen una mayor contribución al desarrollo de la misma. Y, en segundo, a que el componente genético es debido a varios *locus*. Cada uno de estos *locus* tiene una contribución muy pequeña al desarrollo de la enfermedad. Además el número de *locus* suele ser lo suficientemente alto y, en muchas ocasiones, desconocido como para no poder realizar una predicción sobre la predisposición real de un individuo a padecer la enfermedad (1-3) (Fig.17).

El acervo génico de una especie, o variabilidad genética de una especie, es producido por variaciones en la secuencia nucleotídica de los genes. Estas variaciones pueden deberse a sustituciones puntuales, como en el caso de los SNPs, variaciones del número de copias de secuencias genómicas concretas, como las secuencias microsatélites o los CNVs (*Copy Number Variations*), deleciones, inserciones o inversiones entre otras (64, 65). Cuando estas variaciones producen un cambio en el gen, ya bien sea a nivel de expresión o de actividad de la proteína codificada, se produce un cambio en el fenotipo del individuo (64-66). Cuando el cambio es muy grande es muy probable que tenga un efecto deletéreo o negativo

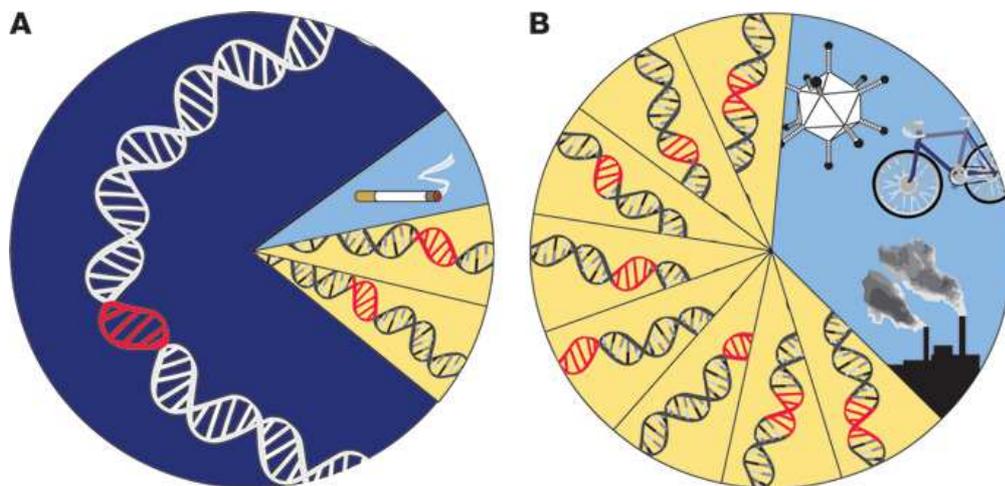


Fig. 17. Factores asociados a las enfermedades monogénicas clásica (A) o compleja (B) y su importancia relativa. Mientras en el caso de las enfermedades monogénicas el componente es básicamente genético y limitado a un locus, en el caso de las enfermedades complejas el componente ambiental tiene mayor relevancia y el componente genético se encuentra distribuido en un mayor número de locus. Figura extraída de (2).

para el individuo. Estos efectos hacen que tiendan a eliminarse de la población por presión selectiva, siendo éste tipo de cambios característicos de las enfermedades monogénicas. Si el efecto es muy pequeño es más probable que se fije en un porcentaje de la población, ya que el efecto global de esta mutación será tan leve que no supondrá un gran cambio a nivel de fenotipo. La suma de múltiples cambios en genes asociados entre sí dará lugar a cambios fenotípicos mayores en el individuo. Incluso cuando estos cambios no afectan a la viabilidad o la capacidad de reproducción del individuo, pueden producir alteraciones en el equilibrio celular y/o tisular. Como consecuencia el individuo tendrá una capacidad de respuesta diferente ante un stress o una variación ambiental (64, 66).

## Introducción

En una enfermedad poligénica se habla de riesgo, o susceptibilidad, de padecer ya que portar una variante alélica asociada a una enfermedad no implica necesariamente que se vaya a desarrollar (1, 3). Esto dificulta la caracterización de las enfermedades comunes, ya que dos individuos pueden padecer la misma enfermedad compleja y sin embargo, deberse a un componente genético diferente. Además la interacción ambiente-componente genético sumado a los hábitos de vida del individuo juegan un papel en el riesgo del desarrollo de la enfermedad (1-3, 64, 65). Todo esto ha convertido la caracterización de variantes asociadas en un reto de gran dificultad, pero prioritario para la biomedicina.

Se ha propuesto que en el caso de ciertas enfermedades complejas, el que existan tantas variantes que predisponen a padecerlas no es producto del azar. Se cree que debió existir una presión selectiva que favoreció su fijación en la población, como en ese momento estas variantes suponían una ventaja para el individuo, se fueron fijando en la población. Cuando se sufrió un cambio ambiental brusco, como el que ha tenido lugar en el estilo de vida de la actual sociedad, estas variantes dejaron de tener efectos favorables y pasaron a predisponer al individuo que las portaban a padecer una enfermedad. Esta teoría fue sugerida por primera vez por James V. Neel, en 1962, para explicar el por qué hay un porcentaje mayor del esperado de individuos predispuestos genéticamente a padecer enfermedades como la obesidad y la DMT2. A esta teoría se denomina "*Teoría del gen ahorrador*" (66) y permite explicar por qué ciertas poblaciones han sufrido, con el cambio de estilo de vida, un incremento exponencial de la incidencia de enfermedades metabólicas como la obesidad, la NAFLD o la DMT2 (67, 68). No obstante, esta hipótesis ha sido muy criticada desde que se planteó por primera vez y numerosos autores la tachan de incompleta o de "interesante, pero irreal" proponiendo correcciones o teorías alternativas (69-71).

### 1.3. POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO.

Los polimorfismos de un sólo nucleótido, o SNPs (del acrónimo inglés *single nucleotide polymorphisms*) son considerados la fuente de variabilidad genética más abundante en el genoma (72, 73). Actualmente se considera que hay un SNP por cada 100-300pb (73, 74). Se han registrado, actualmente, más de 53 millones de

SNPs del genoma humano en la página del NCBI dbSNP. Se define como SNP la variación de un sólo nucleótido, con dos variantes alélicas y cuya incidencia en la población sea mayor o igual al 1%. Aquellos cuya incidencia sea menor se consideran mutaciones puntuales (72, 73). No obstante, en la práctica se acepta el término SNP para aquellos cuya incidencia en la población sea ligeramente menor del 1% y las deleciones puntuales así como variantes tri- o tetra- alélicas (72, 74). Cuando un conjunto de SNPs se encuentran cercanos, en la misma región cromosómica, se puede definir un haplotipo, una combinación de diferentes variantes alélicas de SNPs en desequilibrio de ligamiento (72).

Se considera que los SNPs son producto de mutaciones, errores en la replicación del DNA. En teoría la probabilidad para que surja un SNP debería de ser similar en todo el genoma, sin embargo, estos tienen una mayor probabilidad de aparecer en zonas concretas (73, 75). Además ciertas mutaciones son más probables que otras, así el 25% de las mutaciones registradas son cambios metil-CpG a TpG (75-77). Se ha propuesto que esto es causante del incremento de heterozigosidad en las zonas de islas CpG (76). También se han localizado zonas donde no se localizan SNPs, los denominados “desiertos de SNPs” (78). Para explicar este fenómeno se han propuestos distintas hipótesis, como zonas sometidas a una intensa selección

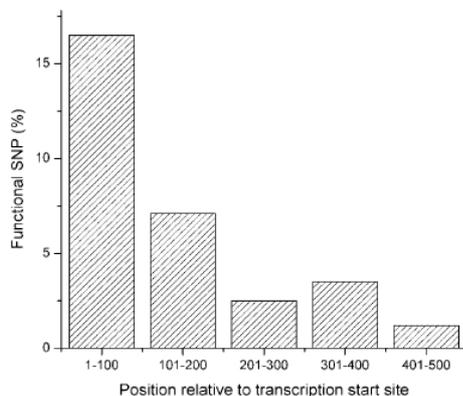


Fig.18. Porcentaje de SNPs con efectos funcionales en zonas reguladoras. Los SNPs se han clasificado en función de su posición respecto al inicio de transcripción. Figura extraída de (82).

evolutiva o a un cuello de botella, que eliminaría rápidamente las variantes funcionales no ventajosas (78), o que las diferencias de empaquetamiento de la cromatina generan zonas con mayor, o menor, susceptibilidad de tener mutaciones (78, 79) y de que estas sean reparadas. No obstante, hay descritas zonas en las que existe una cantidad menor de la esperada de variantes, pese a existir una alta tasa de recombinación (78, 79).

Cuando un SNP no tiene ningún efecto sobre el gen en el que se encuentra, es muy probable que acabe desapareciendo, ya que será portado por un muy bajo número

## Introducción

de individuos dentro de la población. Este proceso de eliminación de variantes neutras se ve aumentado en poblaciones que sufren un drástico descenso del número de individuos, como el cuello de botella o el efecto fundador (80). Si el nuevo alelo tiene un efecto sobre el gen, puede terminar fijándose en un porcentaje de la población. Según Miller y cols. en menos de 300.000 años algunos SNPs se fijarán en toda la población, siendo este mecanismo el responsable de las divergencias genéticas entre especies cercanas (78).

Cuando un SNP tiene un efecto sobre el gen en el que se localiza, se denomina SNP funcional (72, 73, 81, 82). Los SNPs funcionales pueden localizarse en regiones codificantes, siendo denominados cSNPs. Los cSNPs se clasifican en función de si producen o no cambios en la secuencia de aminoácidos, denominándose no sinónimos o sinónimos, respectivamente (72). Los SNPs también pueden localizarse en zonas no codificantes, como promotores, secuencias UTR o intrones. Cuando un SNP situado en una zona asociada a la regulación de un gen afecta a la expresión de éste, se denomina rSNP o SNP regulador (72, 81, 82). La distribución de los SNPs en el genoma no es homogénea, si no que muestra una mayor densidad en las zonas no codificantes. Más concretamente en las regiones del promotor más próximas al inicio de la transcripción (75, 81, 82) (Fig.18), lo que sugiere un efecto evolutivo asociado a la regulación de la expresión (82). Además son este tipo de SNPs, los de regiones reguladoras, los que más frecuentemente se dan y más habitualmente muestran efectos funcionales en el gen en el que se localizan (72, 81).

### 1.3.1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS SNPs.

Los SNPs con un efecto sobre el gen en el que encuentran, se pueden clasificar en función de si el efecto es sobre la actividad de la proteína o de los niveles de ésta (72). Es el caso de los cSNPs no sinónimos, que suponen cerca del 50% de los SNPs localizados en zonas codificantes (83). Estos SNPs pueden producir una alteración de la secuencia de aminoácidos con cambios en la actividad de la proteína, su estructura o cambios en la pauta de lectura y la aparición de un nuevo codón de parada (72, 83), aunque existen SNPs localizados en zonas codificantes cuyo efecto es alterar la estabilidad del mRNA o su *splicing* (72, 84, 85). Los SNPs localizados en

partes no codificantes de mRNA pueden modificar la estabilidad de mRNA o su estructura secundaria, así como producir cambios en el *splicing* y en la traducción de exones del mRNA. Otros efectos son la alteración de la estructura secundaria del mRNA y/o de su estabilidad, lo que altera el número de copias de proteína por copia de mRNA, la alteración de la secuencia de apareamiento con el ribosoma, modificando la eficiencia de la traducción (72) o cambios en el *splicing* que producen formas alteradas de la proteína (72, 86).

Los rSNPs localizados en zonas de regulación de la expresión, como promotores, tienen por efecto la modificación de los niveles de transcripción. Esto se produce por dos mecanismos distintos: mediante la modificación de la secuencia de un sitio de unión para factor de transcripción, denominado TFBS (72, 74, 81, 82), o por modificaciones de la topología del DNA (81). Cuando un SNP se localiza en un TFBS los alelos del SNP pueden variar la afinidad del factor de transcripción por su TFBS.

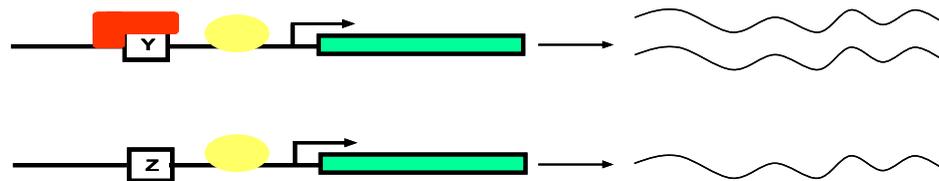


Fig. 19. Efecto de un SNP en la unión a factores de transcripción. Un SNP localizado en la secuencia de unión de un factor de transcripción puede afectar a su afinidad, lo que se traduce en una variación en los niveles de mRNA.

Si esto sucede la eficiencia del promotor se verá modificada, produciéndose una variación en los niveles de mRNA (72, 74, 81, 82). Aunque lo más habitual es el cambio de afinidad, existen algunos casos en los que un SNP puede crear o eliminar un TFBS (87) (Fig. 19).

El otro mecanismo de acción, de los rSNPs, es la modificación de la topología del DNA. Este tipo de SNPs no tienen que localizarse en TFBS, aunque también afectan a la capacidad de unión de los factores de transcripción a su TFBS. La topología del DNA es necesaria para la expresión de un gen, localizándose acumulación de zonas de curvatura del DNA en regiones reguladoras de la expresión (81). Así se demostró que la inserción de una secuencia de curvatura ( $A_6CGTG$ ) en tándem inducía un incremento de la transcripción (81). Esto llevó a teorizar que un factor de transcripción reconoce una secuencia en conjunto con una topología

## Introducción

determinada del DNA. En ocasiones un SNP puede inducir un cambio de la curvatura, lo que puede ocasionar diferentes efectos (Fig I.10):

- Una zona de curvatura del DNA permitiría la unión de factores de transcripción, que por imposibilidad estérica no podrían estar unidos a sus secuencias a la vez (Fig.110 A).
- Una zona de curvatura permitiría la estabilización de un factor de transcripción o de un complejo al permitir interacción entre factores de transcripción cercanos (Fig.110 B).

A este último tipo de SNP se les concede menos relevancia y se considera que se dan con menos frecuencia que los rSNPs clásicos. Aunque estudios como los de la modificación de la afinidad del factor de transcripción de levaduras MCM1 por variación de flexibilidad del DNA (88) confirman la existencia de este tipo de SNP. También se ha argumentado que su menor frecuencia se debe a las dificultades para identificar y caracterizar este tipo de SNPs (81).

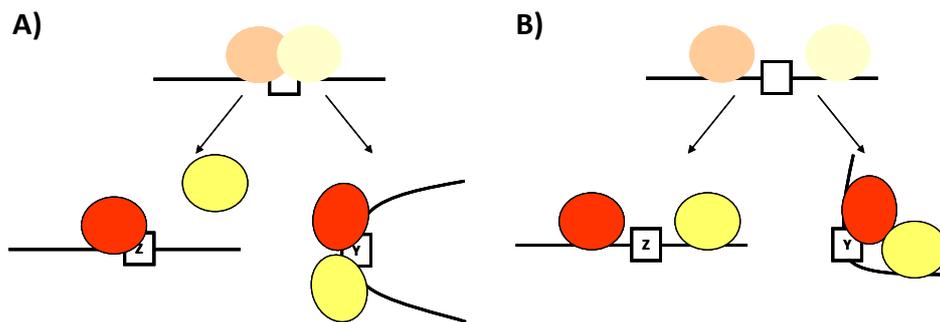


Fig.110. Efectos de los rSNPs sobre la topología del DNA. Los efectos se pueden clasificar en, A) Alteraciones de la capacidad de unión a DNA y B) Cambios en la estabilidad de la unión a DNA e interacción entre factores de transcripción. Adaptado (82).

## 1.4. RECEPTORES NUCLEARES.

Los receptores nucleares (NR) conforman una familia de factores de transcripción. En 1962 Jensen y cols. describieron el primer receptor nuclear al observar que las células retenían estradiol y que éste llevaba a cabo su función mediante un receptor de alta afinidad localizado en el núcleo (89). Veintitrés años más tarde, Holleberg y cols. clonaron el primer receptor nuclear, el receptor de glucocorticoides, en 1985 (89, 90). Hasta ahora se han descrito 48 receptores nucleares diferentes en humanos y cada uno de ellos regula de forma única y no

solapada la expresión génica (89, 90). Para su correcto funcionamiento precisan de una regulación de su actividad tras la unión de su ligando específico, normalmente un compuesto hidrofóbico, como un fosfolípido o una hormona (90-92). Por ello constituyen un nexo entre los cambios ambientales y la regulación génica (91). En la actualidad no se han encontrado los ligandos de todos los NR conocidos, por lo que a estos NR se les denomina huérfanos. De hecho algunos receptores nucleares, como NR5A1 o NR4A2 presentan actividad sin necesidad de unión a ligando (90, 91, 93, 94), algunos presentan un dominio de unión a ligando carente del bolsillo, o bien éste adopta una estructura tridimensional no apta para la unión, en ocasiones la disposición del dominio AF-2 podría no permitir la interacción con ligandos (90, 94). Todo esto ha llevado a postular que algunos de estos receptores podrían carecer de ligando y ser activos constitutivamente, no obstante esto no implica que su actividad no pueda ser modulada, ya que se ha descrito que varios de estos receptores nucleares sufren modificaciones como fosforilaciones y unión de coactivadores y correpresores.

### 1.4.1. CLASIFICACIÓN.

En 1999 el Comité de Nomenclatura y Clasificación de Receptores Nucleares estableció una clasificación de los mismos, en función de su homología de secuencia, a la vez que les asignaba un nombre sistemático (89, 95). El nombre sistemático es del tipo NRxyz, en donde NR es la denominación de la superfamilia, x, un número, es la subfamilia, que hace referencia al tipo de receptor nuclear al que se parecen todos sus miembros y al ligando que los regula, y, una letra, el grupo y z, un número, el gen concreto (89).

Subfamilias:

- 1- Es la subfamilia de mayor tamaño. Son los receptores nucleares semejantes a TR. Incluye a los TRs, los PPARs, al VDR y los RARs. También incluye a los receptores huérfanos como RORs y LXRs.
- 2- Es la segunda subfamilia en tamaño. Incluye a los RXRs y HNF4.
- 3- Es la familia de los ERs y los parecidos a ellos. Incluye a ERRs y a GR.
- 4- Es la familia de NGF1B y los receptores parecidos, NURR1 y NOR1
- 5- Es la familia de los homólogos de Ftz-f1, SF-1 y LRH-1.
- 6- Está formada por un único receptor nuclear, GCNF.

## Introducción

Existe otra subfamilia adicional de NR, la denominada subfamilia 0. Los miembros de ésta familia carecen de dominio de unión a DNA, por lo que llevan a cabo su función mediante la regulación de otros factores de transcripción o complejos de transcripción. Además en humanos existen tres pseudogenes, siendo uno de ellos, NR1H5, funcional en ratón (89, 96). Se ha observado que existe una relación entre la homología, la capacidad de dimerización y la naturaleza de la misma (89). Esto hace que la clasificación en grupos sea no sólo filogenética, si no que tenga una relevancia funcional. Los NR descritos en humanos así como su clasificación y ligandos aparecen resumidos en la tabla suplementaria 1.

### 1.4.2. ESTRUCTURA.

Los receptores nucleares presentan una estructura modular que se encuentra muy conservada. En 1990 David D. Moore hipotetizó acerca de un posible receptor nuclear original, con terpenoides como ligando (92). Tras el alineamiento de secuencias de los receptores nucleares conocidos entonces, se consideró que otro posible origen de los NR actuales podría ser un receptor nuclear ancestral huérfano. Este receptor nuclear ancestral aparecería en una fase temprana de la evolución, sufriendo duplicaciones de gen y ganancias y pérdidas de unión a ligando a lo largo de la misma (92, 97, 98).

El NR típico presenta 6 módulos o dominios (Fig. I11 A) (89, 91, 99) comunes a todos los NR. La única excepción es la subfamilia 0, que carece de dominio C. En algunos casos estos dominios están muy conservados, mientras que otros tienen mucha variación.

Región N-terminal: Contiene los dominios A y B y se denomina también región A/B o AF-1. Es uno de los dos dominios encargados de la activación de la transcripción, siendo el que más varía entre NRs, tanto en secuencia como longitud, conservándose menos del 15% de homología entre los receptores nucleares humanos (99). Se ha descrito que puede mostrar actividad independiente de ligando, aunque esto sólo se observa cuando no se encuentra en el NR completo (91, 100). En condiciones normales su actividad está regulada por unión del ligando. Además puede interactuar con cofactores y factores de transcripción

(90, 91, 101). Se ha observado que puede sufrir modificaciones postraduccionales (91) y modificaciones en la actividad mediante fosforilaciones (90, 101, 102) o unión de ligandos (103). En casos concretos, como en los receptores de estrógenos y de andrógenos existe interacción con el extremo C-terminal (103, 104).

Dominio de unión a DNA: Es el dominio C, o DBD, del inglés *DNA binding domain*, presente en todos los receptores nucleares salvo en la familia NROB (89-91). Este dominio es el que determina la secuencia específica que reconoce el receptor nuclear o secuencia HRE, *Hormone Response Element*, siendo con AF-1, el otro dominio encargado de unión a DNA. El HRE suele estar formado por dos medios HRE, separados por 1-5 nucleótidos. La orientación de las medias HRE es característica del tipo de dimerización (Fig.111.B). El DBD típicamente se compone de 66 aminoácidos, con dos dedos de zinc con secuencias ricas en cisteína y dos  $\alpha$ -hélice que pueden estar solapadas a los dedos de zinc (89). Dependiendo del receptor nuclear estas estructuras tendrán un papel tanto en unión específica a DNA y/o dimerización. Así, el receptor de glucocorticoides, *GR*, emplea ambas  $\alpha$ -hélice para la unión a DNA (99). Mientras que en el caso de los receptores testiculares, *TR*, una se emplea para estabilizar la unión a DNA mientras que la segunda es necesaria para la heterodimerización con RXR (105).

Dentro del DBD se encuentran las denominadas cajas A, D, P y T. De éstas, la caja P determina la secuencia de unión específica que reconocerá el receptor nuclear (98), estando formada por el primer dedo de zinc. El segundo dedo de zinc conforma la caja D, que determina la dimerización y el espacio que debe de existir en los dímeros (89) entre las secuencias de unión (99). Las cajas A y T interaccionan de forma inespecífica estabilizando la unión NR-DNA (89, 99). En el caso de los heterodímeros, la región denominada CTE, del inglés *C-terminal extension*, es donde se lleva a cabo la desorganización de  $\alpha$ -hélice necesaria para la dimerización (99).

Dominio bisagra: O dominio D, este dominio sirve de puente entre el dominio de unión a DNA y el dominio de unión a ligando. Tiene una estructura desordenada, lo que le confiere flexibilidad, permitiendo a la proteína adoptar diferentes

## Introducción

conformaciones (89, 90). En algunos casos también sirve como sitio de unión de correpresores (90).

Dominio de unión a ligando: Es el dominio F o LBD, del inglés *ligand binding domain*. Es el dominio de regulación alostérica en el que se da la unión al ligando e interviene en la dimerización y en la activación de la transcripción (89, 90, 99). La estructura de los LBDs está muy conservada, siendo una estructura denominada “Sándwich de  $\alpha$ -hélices”. Está formada por 12  $\alpha$ -hélices y un giro beta cada 4  $\alpha$ -hélices. Existen excepciones a esta estructura canónica, como la familia 5 que presenta una cuarta capa de  $\alpha$ -hélices (89, 99). En el LBD se pueden distinguir cuatro regiones distintas: El “bolsillo” de aminoácidos hidrofóbicos donde se da la interacción con el ligando, el tamaño y la conformación espacial determina la especificidad de ligando (89, 106); la región de interacción con corre reguladores (89, 99), los cuales interaccionan mediante una secuencia repetida rica en leucinas, cuya unidad de repetición es LxxLL (107); la región de dimerización con otros LBDs, asociada a la dimerización con otros NRs; la región situada en la zona c-terminal, es la denominada AF-2, suele estar formada por la  $\alpha$ -hélice anfipática 12. La función de esta región es regular la activación de la transcripción, además esta región induce la reorganización del dominio y estableciendo interacciones con el DNA (89, 90, 99, 100, 106). La estructura de AF-2 suele ser una secuencia formada por unidades repetidas del motivo LLIEML, presente en la mayoría de receptores nucleares.

La dimerización entre receptores nucleares se da en la misma región del LBD, independientemente si se forman homo u heterodímeros. En ambos casos participan las hélices de la H7 a la H11, aunque principalmente intervienen la H9-10. La diferencia radica en que en los homodímeros existe una simetría perfecta entre las interfaces de los monómeros, en los heterodímeros existe una asimetría (89). Se ha propuesto que el espacio del LBD que se oculta por la interacción está asociado a la afinidad entre heterodímeros. Así cuanto más superficie se oculte más afinidad presentarán los heterodímeros. El receptor de glucocorticoides presenta una dimerización distinta en la que intervienen los giros  $\beta$  3 y 4. También interviene la secuencia de unión entre las hélices H1 y H3 y el último residuo de la H5.

Dominio C-terminal: O dominio F, es una secuencia desordenada poco conservada, tanto en secuencia como en longitud (89).

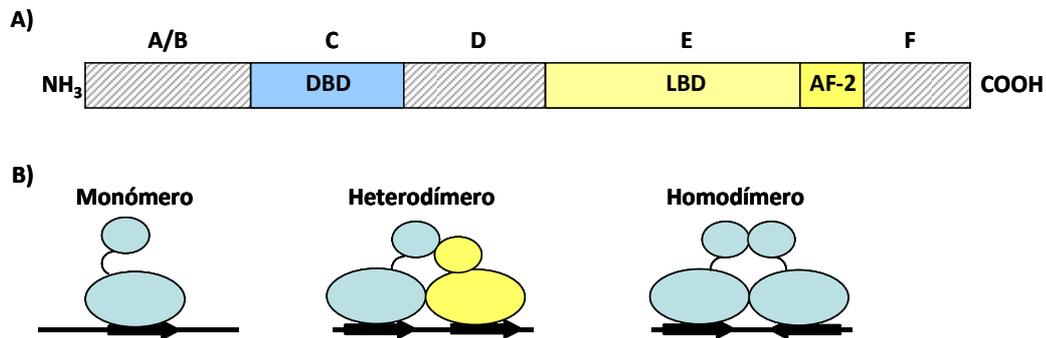


Fig.111. Estructura y tipos de interacción de los NR. A) Estructura lineal de un NR clásico. Las secuencias conservadas aparecen en forma de cajas con color, mientras que las no conservadas aparecen en gris rayado. Dentro de cada dominio se señalan las principales estructuras funcionales. B) Mecanismos de unión a DNA. Las flechas señalan la dirección de las secuencias de unión HRE más habituales en cada tipo de receptor nuclear. Figura modificada de (90).

### 1.4.3. MECANISMO DE ACCIÓN.

Clásicamente se diferencian tres pasos en la acción de un receptor nuclear: Represión del receptor nuclear, desrepresión y activación de la transcripción (89, 90). Los receptores nucleares generalmente están inactivos cuando no están unidos a su ligando, aunque existen excepciones (89, 90). Los receptores nucleares pueden distinguirse por su localización, pudiendo encontrarse en el citoplasma o el núcleo (89-91). Cuando el receptor nuclear se localiza en el citoplasma, clásicamente los receptores de hormonas esteroides, se encuentra formando un complejo con HSPs (91, 108). La unión del ligando produce la disociación del complejo y la homodimerización, siendo el dímero lo que se transloca al núcleo (Fig. 112 A) (108). Los receptores nucleares localizados constitutivamente en el núcleo suelen ser aquellos que heterodimerizan con RXR, (NR2B) (Fig. 112 B) y los que actúan como monómeros (91). Existe un tipo de homodímeros que se encuentran localizados exclusivamente en el núcleo, la familia HNF4 (NR2A) (109). En ausencia de ligando los receptores nucleares localizados en el núcleo se encuentran unidos a un complejo correpresor. Este complejo suele estar formado por enzimas que modifican las histonas, como acetilasas, metilasas etc... y complejos remodeladores de la cromatina (89, 91). Estos receptores nucleares pueden estar unidos a su HRE, además de al complejo correpresor, pero en este caso la unión tiene efecto de represión de la transcripción (Fig. 112 C). Los complejos se disociarían por los cambios conformacionales inducidos por la unión

## Introducción

del ligando (89, 91). Cuando el receptor nuclear actúa como un monómero puede producirse una activación basal de la transcripción. Sin embargo ésta puede modificarse como en el caso de SF-1 (NR5A1), cuya actividad basal se puede regular mediante modificaciones, como la fosforilación o la sumoilación, por unión a ligando o por interacción con otros factores de transcripción (89, 91, 100, 110-112) (Fig. 112 D). Este tipo de regulación es característica de los receptores nucleares huérfanos (92).

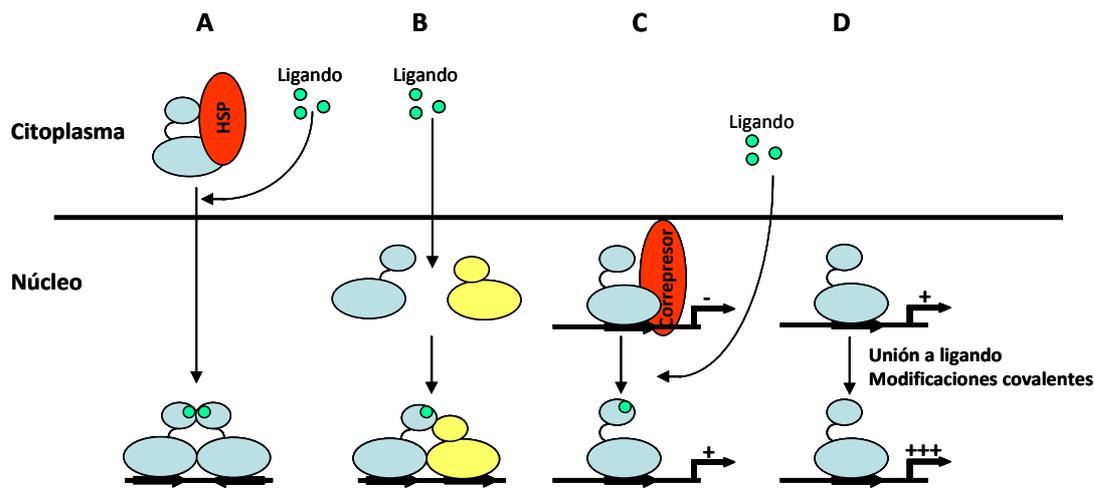


Fig. 112. Mecanismos de activación de los receptores nucleares. A) Los receptores nucleares que homodimerizan, suelen localizarse en el citoplasma, unidos a HSPs, tras la unión a ligando se liberan de la unión y se induce la dimerización y su transporte al núcleo. B) Los receptores nucleares que heterodimerizan se localizan en el núcleo, la dimerización y unión a DNA es dependiente de unión a ligando. C) Algunos receptores nucleares están unidos constitutivamente a DNA, pero sin ligando interaccionan con complejos correpresores de la transcripción. La unión a ligando induce la liberación de estos complejos. D) Los receptores nucleares con actividad intrínseca se regulan mediante modificaciones covalentes y/o unión a ligando modificando su actividad. Figura modificada de (109).

Tras la dimerización se produce el reclutamiento de coactivadores o de correpresores de la transcripción. Estos suelen realizar funciones sobre la condensación y remodelación de la cromatina, aunque también se producen interacciones con otros factores de transcripción y proteínas asociadas al complejo iniciador de la transcripción, como la proteína de unión a secuencias TATA, TBP o los factores de transcripción TFIIA y TFIIB(99, 100).

Los NR pueden producir transrepresión. Este mecanismo se aleja del clásico de regulación de la expresión por unión a su HRE. En este mecanismo el NR regularía la expresión mediante interferencia con rutas de señalización (89). Éste es el caso

del factor de transcripción AP-1, cuya unión a DNA se puede inhibir por competición con GR, RXRs o RARs. Otro ejemplo es GR, que además de competir con AP-1, inhibe la actividad de NF- $\kappa$ B mediante interacción directa (89, 113). En algunos casos este *cross-talk* favorece la acción del otro factor de transcripción (114). Otro mecanismo de regulación es la competición por la unión a DNA propuesto para la expresión de *CYP8B1*, donde NR5A2 y NR2A1 compiten por la unión a DNA. NR0B2 regula el factor de transcripción que se une a la secuencia de unión DR-1 mediante unión directa (115)..

### 1.5 NR5A2

NR5A2 (*Nuclear Receptor family 5 group A member 2*) o LRH-1 (*Liver Receptor Homolog-1*), es un receptor nuclear, de la familia *Fusi Tarazu*. Junto con SF-1 constituye la subfamilia NR5A. NR5A2 está considerado huérfano y con actividad intrínseca (116), aunque recientemente se ha descrito un ligando sintético, la dilaurilfosfatidilcolina o DLPC (117), y se haya caracterizado, *in vitro*, su capacidad de unión a diferentes especies de fosfolípidos (118). Sin embargo se han descrito diversos correpresores y modificaciones covalentes que regulan la actividad de NR5A2 (115, 119-121). NR5A2 fue descrito por primera vez en 1993, por Becker-André y cols. (116) con el nombre de PHR-1, receptor homólogo del páncreas 1. Fue descrito como un factor de transcripción en células HUVEC, análogo estructural del receptor nuclear de ratón Lrh-1. Otros grupos lo aislaron y caracterizaron posteriormente en diferentes tejidos, con nombres diferentes, CPF, hBIF, FTF o FTZ-F1 (116).

El gen que codifica NR5A2 está localizado en el brazo largo del cromosoma 1, en 1q32.1. El gen tiene una extensión de más de 150Kb y tiene 8 exones (116). El promotor descrito tiene una longitud de 1200pb y una secuencia UTR en 3' de 3Kb (122). Aunque en humanos sólo se ha descrito un promotor, tanto en *D. Rerio* como en *X. Laevis* se han descrito distintos promotores específicos de tejido (116). En la región 3' UTR se localizan repeticiones del pentanucleótido AUUUA, una secuencia AREs, una señal de regulación del mRNA que afecta a la estabilidad del transcrito, normalmente disminuyéndola (123). Hasta el momento se han descrito dos isoformas en humanos de 3,8Kb y 5,2Kb. Estas isoformas se obtienen por

## Introducción

*splicing* alternativo del exón 2, que produce una pérdida de la región AF-1. Sin embargo la pérdida de esta región no afecta ni a la unión, ni a la actividad (Fig.113). En el hígado adulto sólo se encuentra la isoforma de 5,2Kb (116).

La expresión de NR5A2 se da principalmente en tejidos derivados del endodermo, páncreas, preadipocitos, hígado e intestino (116, 124). También se expresa en otros tejidos como ovarios, testículos (116) o músculo (125), así como en fases tempranas del desarrollo embrionario (116, 124).

### 1.5.1. ESTRUCTURA.

NR5A2 presenta la estructura típica de un receptor nuclear huérfano. NR5A2 se une a la secuencia YCA AGG YCR, en la que Y es una pirimidina y R una purina, por la caja *Fushi Tarazu*. Esta caja es característica de su familia de receptores nucleares y está muy conservada evolutivamente, estando formada por 26 aminoácidos localizados en la zona c-terminal del dominio de unión a DNA (126).

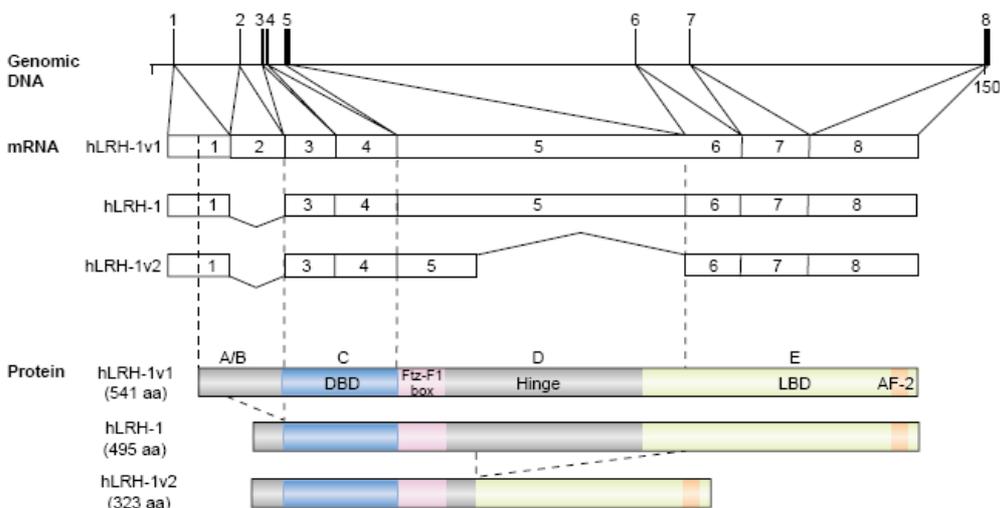


Fig. 113. Estructura del gen de NR5A2 y de las isoformas descritas. En la figura se representa la organización del gen de NR5A2 (*genomic DNA*), así como los distintos mRNA que hay descritos, obtenidos por *splicing* alternativo (mRNA) y la estructura lineal de las distintas isoformas a nivel de proteína de NR5A2 (proteín). La diferencia entre las dos isoformas de NR5A2, hLRH-1v1 y hLRH-1, consiste en una delección parcial del dominio A/B, correspondiente al exón 2. La isoforma hLRH-1v2 se corresponde con una isoforma no activa exclusiva de la línea celular HepG2. Figura extraída de (117).

El dominio LBD clásico presenta la estructura de 12 hélices, de la H1 a la H12, formando tres capas. El LBD de NR5A2 tiene cuatro capas, de las que la cuarta está formada por la hélice H2. La estructura cristalográfica muestra que esta cuarta

capa establece una interacción con la segunda, lo que a su vez permite una estabilización de la tercera, permitiendo una unión estable del dominio AF-2 al DNA (106, 127). Esta variación estructural se ha utilizado para explicar la capacidad de la familia NR5A de unirse como monómeros a DNA y poseer actividad independiente de unión a ligando (116). No obstante, las estructuras cristalográficas de NR5A2 muestran un bolsillo hidrofóbico de  $820\text{\AA}^3$  bien definido (127) que, a diferencia de otros receptores nucleares huérfanos, permitiría la unión a un ligando. Esto ha llevado a proponer que NR5A2 ha perdido su capacidad de unión a ligando a lo largo de la evolución por la adquisición de una conformación constitutivamente activa (118). Hasta el momento no se ha encontrado ningún ligando *in vivo* que rebata este argumento. Aunque se han encontrado diversas especies de fosfolípidos con capacidad de unirse *in vitro* (118), no se ha demostrado que esta unión tenga efectos sobre la actividad de NR5A2. Estos ligandos incluyen la fosfatidilcolina y fosfatidilinositoles. Más recientemente se ha descrito un fosfolípido sintético, el DLPC, que se une de forma específica a NR5A2 induciendo un aumento de su actividad (117).

El dominio AF-2 de NR5A2 está formado por un dominio hexamérico de repeticiones de LLIEML, una secuencia típica de los receptores nucleares. Además de la de 5,2Kb HepG2 tiene otra isoforma (Fig. I13). Esta isoforma carece del dominio AF-2, actuando como un dominante negativo. Tiene capacidad de unión a DNA pero no tiene capacidad de activar la transcripción.

### 1.5.2. REGULACIÓN.

Dado que NR5A2 es un receptor nuclear huérfano, la regulación de su actividad se da por:

- Correpresores.
- Coactivadores.
- Modificaciones covalentes.
- Ligandos sintéticos.

Los correpresores mejor descritos de la actividad de NR5A2 son DAX-1 (NR0B1) y SHP-1 (NR0B2) (115, 116, 124, 128, 129). Estos receptores nucleares huérfanos

## Introducción

reprimen la actividad transcripcional de NR5A2 e inhiben su unión a DNA mediante la interacción de secuencias LXXLL con el dominio AF-2. Ambos tienen la misma función y mecanismo de acción, pero actúan en distintos tejidos. DAX-1 regula a NR5A2 en los tejidos esteroideogénicos y SHP-1 en los enterohepáticos (116). SHP-1 también puede reclutar otros factores de transcripción, como SIRT-1 para inhibir la activación de la transcripción de NR5A2 mediante la deacetilación de histonas H3 y H4 (121). Además PROX-1 fue descrito como un correpresor de NR5A2 que inhibía la expresión de CYP7A1 (130), aunque posteriormente se ha caracterizado su actividad represora de NR5A2 más ampliamente (124, 130). Otro correpresor es SMTR, la proteína de represión de los receptores tiroideos y retinoicos, aunque no se sabe si la regulación es directa o indirecta (116). DP103 también se ha descrito como un correpresor de NR5A2 (131). DP103 se une al dominio bisagra de la familia NR5A, un dominio muy conservado en esta familia, reclutando a las deacetilasas de histonas HDAC2 y HDAC4 e induciendo la sumoilación en el dominio bisagra (131).

Dentro de los coactivadores de NR5A2 se encuentra MBF-1, mediante la interacción con la caja *Fushi Tarazu* (116). Otras proteínas que interactúan con NR5A2 activándolo son las de la familia SRC, SRC-1 y SRC-3 (131, 132), las cuales interactúan con NR5A2 vía AF-2 (116). Esta activación se ve reprimida por PIASy, un miembro de la familia de proteínas inhibidoras de STAT, que compite por la unión con las SRC, lo que evita la activación (132). PGC-1 $\alpha$  es un activador de NR5A2, induciendo un incremento de su actividad mediante unión directa (133, 134). Esta interacción se da mediante los motivos LXXLL de PGC-1 $\alpha$  con el dominio AF-2 de NR5A2. Se ha propuesto un mecanismo de regulación de NR5A2 en células esteroideogénicas (134) en el que PGC-1 $\alpha$  y DAX-1 compiten por unirse a NR5A2. Recientemente se ha encontrado que ILF3 coactiva a NR5A2 en complejo con PGC-1 $\alpha$  y PRMT1 (135).

Las modificaciones covalentes más conocidas de NR5A2 incluyen fosforilación y sumoilación. La fosforilación de NR5A2 se lleva a cabo en el dominio bisagra, en las serinas 238 y 243 (119, 124), de forma análoga a las fosforilaciones en NR5A1. Estas fosforilaciones inducen un aumento de la actividad de NR5A2, por lo que se ha propuesto que las fosforilaciones del dominio bisagra aumentan la estabilidad

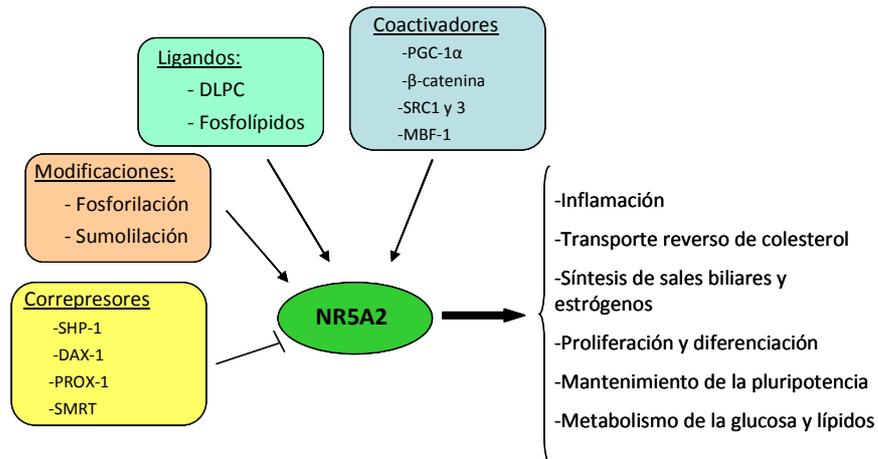


Fig.114. Resumen de los principales moduladores de la actividad de NR5A2. Estos incluyen modificaciones, ligandos y correuladores. También se muestran las distintas rutas reguladas por NR5A2.

de la unión a DNA. Esta hipótesis se basa en que la mutagénesis de las serinas por aminoácidos cargados positivamente, inducen una mayor actividad intrínseca de NR5A2 (116, 119) Además, la gran conservación de los dominios bisagra de NR5A sugiere que existen más sitios de fosforilación, análogos a los de NR5A1. También sugiere una regulación de la actividad por quinasas activadas por mitógenos (110, 116, 124). Por contra, la sumoilación de NR5A2 suele inducir una represión de la actividad (120, 124, 131). La sumoilación induce la inclusión de NR5A2 en los cuerpos nucleares de leucemia promielocítica, lo que impide su unión a DNA (120). Se ha propuesto que la sumoilación sucede en el dominio bisagra, en los motivos  $\Psi$ KXE, donde  $\Psi$  es un aminoácido hidrofóbico y X un aminoácido cualquiera (131). Los reguladores de la actividad de NR5A2 se encuentran resumidos en la fig.114.

### 1.5.3. FUNCIONES DE NR5A2.

NR5A2 fue originalmente descrito como diferentes factores de transcripción, en diferentes tejidos, pertenecientes a la misma familia (124). Sus primeras funciones descritas fueron la activación de la expresión de *CYP7A1* y la potenciación del promotor del virus de la hepatitis B (116).

El tejido donde más ampliamente se ha estudiado NR5A2 ha sido en el hígado. Originalmente se encontró que NR5A2 era un activador de la síntesis de sales biliares en humano y ratón. En ratón, NR5A2 regula de forma directa y positiva la

## Introducción

expresión de los enzimas clave CYP7A1 y CYP8B1 (129, 136), además favorece la unión de NR1H3, LXR $\alpha$  (136). El estudio del papel de NR5A2 en la síntesis de sales biliares mostró que existe una regulación negativa por producto, de forma que las sales biliares inducen la expresión y activación de NR1H4, FXR, que a su vez induce la expresión de SHP-1. SHP-1 por su parte, reprimiría la expresión de CYP7A1 y CYP8B1 mediante la inhibición de NR5A2 (116, 129, 136). Sin embargo, algunos estudios parecen discutir este modelo de regulación (137) e incluso que NR5A2 sea un regulador de la expresión de CYP7A1 en ratón (138). También existe un estudio en ratón que obtiene los resultados contrarios, encontrando que NR5A2 es un represor de la expresión de CYP7A1 y que disminuye los niveles de sales biliares (139).

La regulación del colesterol por NR5A2 no se limita sólo al metabolismo de sales biliares. En el estudio del papel de NR5A2 en el transporte reverso de colesterol al hígado, se encontró que NR5A2 regulaba de forma directa y positiva la expresión de las apolipoproteínas APOA1 (140) y APOM (141), dos componentes de las HDL. También regula a CETP, proteína de transferencia de ésteres de colesterol (142), una proteína encargada del intercambio entre triglicéridos de LDL y VLDL y ésteres de colesterol de HDL. Además NR5A2 activa, en ratón, la expresión SR-B1 (143), un receptor de membrana que recoge el colesterol de las HDL. Todo esto sugiere que NR5A2 juega un papel fundamental en el transporte reverso de colesterol y podría tener un efecto antiaterogénico (116, 141).

NR5A2 es uno de los principales reguladores de los niveles de estrógenos y progesterona (133, 134). Regula la expresión de la aromatasa, CYP19, uniéndose al promotor 2 (P.II) de ésta (133), y de los genes CYP11A1 y HSD3B2 (134) implicados en la síntesis de progesterona. NR5A2 es un activador de la expresión de estos genes, siendo regulado por PGC-1 $\alpha$  y DAX-1 (116, 133, 134). En el ovario NR5A2 se expresa en las células granulosas y lúteas, resultando esencial para la ovulación (144). Estudios en ratones con ovarios sin expresión de NR5A2 muestran descompensaciones hormonales y bajada de las proteasas extracelulares implicadas en la ovulación, teniendo como consecuencia final la esterilidad (144). Además la asociación entre NR5A2 y expresión de aromatasa ha convertido a

NR5A2 en una diana potencial para el tratamiento de tumores estrógeno-dependientes (116, 133).

En los últimos años se le ha asociado a distintos tipos de cáncer. En el cáncer de mama se ha encontrado relación entre su expresión en los preadipocitos asociados al tumor (144, 145) y el desarrollo de éste (116, 133, 145, 146). Esta relación se sugirió al observar que existía un incremento de la expresión de NR5A2 en los tejidos tumorales y peritumorales que se correspondía con el desarrollo del tumor (146) y con el incremento de la expresión de aromatasa (146, 147) del tejido adiposo peritumoral. También se ha asociado a un incremento de la PGE<sub>2</sub> del tejido tumoral. Todo esto llevó a pensar en un ciclo en el que NR5A2 era estimulado por PGE<sub>2</sub>, vía factores de transcripción GATA (147), induciendo la expresión de aromatasa, lo que elevaba los niveles de estradiol en el tumor y favoreciendo la proliferación (146, 147). Se ha observado que NR5A2 induce un incremento de la proliferación vía NR3A1, ER $\alpha$ , (148), y de la invasividad del tumor al producir un cambio en la expresión de cadherina E, al inducir la expresión de una forma truncada no funcional (149). Por contra, se ha observado que NR5A2, junto con PGC-1 $\alpha$  y PPAR $\alpha$ , activa la expresión del miR-200C (150). Este micro RNA se asocia a una disminución de la invasividad de tumores por incremento de la expresión de cadherina E en cáncer de mama y de células pequeñas de pulmón. Sin embargo, su expresión aumentada se ha asociado a otros tipos de cáncer, como el de colon, ovarios y adenocarcinomas pancreáticos, tejidos con elevados niveles de NR5A2. Además de su papel proliferativo en cánceres estrógeno-dependientes, NR5A2 induce la proliferación, promoviendo el paso de fase G<sub>1</sub> a fase S mediante la activación de la expresión de c-MYC y de las ciclinas E1 y D1 (124, 151). Este mecanismo se ha asociado a la regeneración del epitelio intestinal (124).

Se ha descrito que algunas de sus funciones las realiza mediante la interacción con la ruta WNT. En la forma clásica NR5A2 se une al promotor y esta unión se encuentra coactivada por  $\beta$ -catenina. El segundo mecanismo es el clásico de la ruta WNT, TCF7L2 y  $\beta$ -catenina forman un complejo uniéndose a DNA y promoviendo la expresión de las ciclinas. En este caso NR5A2 actuaría como un coactivador, aumentando la actividad del complejo TCF7L2/  $\beta$ -catenina (124, 151). En los últimos años NR5A2 ha sido implicado en el desarrollo y la susceptibilidad de

## Introducción

padecer otros tipos de cáncer, como el gástrico (124, 152) o el de páncreas (153-155). En el caso del cáncer de páncreas se ha propuesto un modelo, según el cuál, NR5A2 presentaría unos niveles mayores debido a la regulación de la ruta *Hedgehog* y/o PDX-1 o mutaciones que aumentarían la actividad intrínseca de NR5A2. Esto induciría un incremento de la progresión del tumor (153).

Se le ha descrito como un factor de transcripción fundamental durante el desarrollo embrionario, resultando su deficiencia letal para los embriones de ratón en el estadio E6.5 (156). Es el único factor de transcripción capaz de reemplazar a Oct-4 en células embrionarias de ratón (157), siendo fundamental para el mantenimiento de la pluripotencia. Además, regula la expresión de los genes *Oct-4* (156, 157), *Tbx3* (157, 158) y *Nanog* (154, 157, 158), interaccionando para ello con la ruta WNT y la ruta *Hedgehog* (156). La  $\beta$ -catenina induce la activación, y la expresión, vía TCF-3, de NR5A2. Sin embargo, el silenciamiento de  $\beta$ -catenina no inhibe la capacidad de NR5A2 de mantener la pluripotencia y mantener los niveles de OCT-4 y NANOG (157). En el desarrollo embrionario NR5A2 se ha asociado a diferenciación de tejidos enterohepáticos debido a que presenta sitios de unión en genes implicados en la diferenciación de páncreas, hígado e intestino, como *HNF-1a*, *HNF-3b*, *HNF-4a* (116, 159, 160). NR5A2 también participa en la diferenciación y organización entre distintos tipos de fibra muscular en pez cebra (125), aunque su expresión disminuye al madurar éstas.

Se le ha encontrado asociado a la diferenciación de adipocitos, en 3t3-L1, como un marcador de diferenciación (145), ya que su expresión sufre una disminución durante la diferenciación a adipocitos. El mecanismo por el que se produce esta bajada de expresión está mediado por GATA-3, que sufre una represión transcripcional por PPAR $\gamma$  al interaccionar con SHP-1, que actuaría como un coactivador de PPAR $\gamma$  impidiendo la unión de correpresores compitiendo por la unión de los sitios de regulación (161).

En los últimos años diversos estudios han sugerido que tiene un papel como antiinflamatorio(124). Se ha asociado a la enfermedad de Bowel (162), un conjunto de enfermedades inflamatorias del intestino, y a la respuesta hepática de fase aguda (163), una inflamación producida en respuesta a una infección, trauma o

necrosis del hígado. En el primer caso NR5A2, induce la expresión de glucocorticoides (162, 164), principalmente corticosterona en el epitelio intestinal. Esto se produce porque NR5A2 activa de forma directa la expresión de *CYP11A1* (132, 162, 164) y *CYP11B1* (162, 164), lo que induce la síntesis de glucocorticoides en el intestino de ratones. La activación de NR5A2 en la síntesis de corticosterona se ve aumentada por la unión de linfocitos T a las células del epitelio intestinal (163), lo que asociaría este proceso a respuesta inmune. En el ser humano se ha encontrado que los que sufren del síndrome de Bowel, como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, poseen unos niveles de expresión de NR5A2 significativamente menores a las personas sanas (162). La síntesis de glucocorticoides se ha observado que también se da en el páncreas exocrino, donde se ha asociado a efectos antiinflamatorios y antiapoptóticos (165). Además activa la síntesis de lipasas y proteasas del fluido pancreático (166) como CEL, la lipasa dependiente de sales biliares (167).

En la respuesta hepática de fase aguda, NR5A2 juega también un papel antiinflamatorio (168, 169). NR5A2 inhibe la expresión de haptoglobina, la proteína amiloide del suero A (SAA), y de fibrinógeno  $\beta$ , inducida por IL-1 e IL-6 mediante la inhibición de la unión a DNA del factor de transcripción CEBP $\beta$  (163). Complementariamente a este mecanismo NR5A2 induce, de forma directa, la expresión del antagonista de la acción de IL-1 (*IL-1RA*), en células HepG2 (169). Estos resultados se confirmaron con la observación de que en ratón con sólo una copia de NR5A2, la inyección de LPS producía una mayor inflamación y una mayor secreción de SAA y fibrinógeno  $\beta$  que en los ratones control (169) así como una disminución de la expresión de NR5A2 (168). Curiosamente IL-1 actúa como represor de la expresión de SHP-1 en la respuesta hepática de fase aguda (170). En otro estudio del papel de NR5A2 en la respuesta hepática de fase aguda se encontró que existe una sumoilación de NR5A2 asociada a efectos antiinflamatorios (163, 171). La sumoilación activaba, mediante estabilización de la proteína, e inducía la unión en forma de complejo correpressor a DNA, lo que resulta en la disminución de la expresión de genes implicados (163, 168).

Más reciente es el papel de NR5A2 en el metabolismo de la glucosa. Existe un estudio previo sobre la regulación de la sintasa de ácidos grasos, FASN (172),

## Introducción

donde se muestra la regulación directa y positiva de NR5A2. Esto está en contraposición de la regulación negativa que produce la síntesis de sales biliares, una vía estimulada por NR5A2. Sin embargo, son estos estudios en ratones con la expresión de NR5A2 silenciada en el hígado, los que más profundamente han estudiado la función de NR5A2 en el metabolismo de la glucosa (117, 173). Ambos estudios muestran una regulación de distintos genes del metabolismo de la glucosa y de ácidos grasos, así como modificaciones en el flujo hepático de la glucosa y en la acumulación de ácidos grasos. Curiosamente los resultados difieren hasta el punto de que las conclusiones que extraen sobre el papel de NR5A2 en el metabolismo de la glucosa y su supuesto papel en el desarrollo de la DMT2 y el NAFLD son opuestas. Mientras Lee y cols. (117) sugieren que la activación de NR5A2 tendría efectos antidiabéticos y esteatogénicos, Osterveer y cols. (173) concluyen que la inhibición o la bajada de los niveles de NR5A2 tendrían un efecto protector contra la esteatosis. No obstante, ambos dejan en evidencia que NR5A2 tiene un papel en la regulación del metabolismo de glucosa y de ácidos grasos, así como un posible papel en el desarrollo de la DMT2 y la obesidad. Esta posibilidad ya fue sugerida en el estudio que mostraba la regulación positiva de la síntesis de adiponectina por NR5A2 y PPAR $\gamma$  en 3T3-L1 y adipocitos de rata (174). En este estudio se sugería que la expresión de estos dos receptores nucleares tendría un efecto antidiabético. Además este papel de NR5A2 como regulador del metabolismo ha servido para estudiar su papel en el tejido óseo, basándose en la observación en diferentes estudios cuyos resultados sugieren una interrelación metabolismo energético-metabolismo óseo (175). El resultado muestra que existen variantes de NR5A2 asociadas a la densidad ósea, lo que sugiere que podría jugar un papel en el metabolismo óseo y en la susceptibilidad a padecer enfermedades asociadas a la densidad ósea (176).





## **OBJETIVOS**



**2.1. OBJETIVO PRINCIPAL.**

-Determinar el papel de NR5A2 en el desarrollo de las enfermedades asociadas a la resistencia a insulina.

**2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.**

- Determinar si el SNP rs2816948, del promotor de NR5A2, asociado a IMC es un SNP funcional.
- Caracterizar el papel de NR5A2 en el metabolismo de hígado.
- Caracterizar el papel de NR5A2 en el metabolismo de músculo.







## MATERIALES Y MÉTODOS

*“La práctica debería ser producto de la reflexión, no al contrario.”*

-Herman Hesse.



### 3.1. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES.

Para los ensayos *in vitro* se utilizaron las siguientes líneas celulares:

#### **HepG2:**

(ATCC Number: HB-8065), obtenida originariamente a partir de un carcinoma hepatocelular. Las células se cultivaron en medio DMEM- Glutamax (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) complementado con FBS al 10%, 100 UI de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina. Las células se crecieron a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### **C2C12:**

(ATCC Number: CRL-1772), obtenida originariamente por David Yaffe and Ora Saxel, en 1977, a partir de mioblasto de músculo esquelético del muslo de ratones C3H. Las células se cultivaron en medio DMEM- Glutamax suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 100 UI de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina. Las células se crecieron a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5 % de CO<sub>2</sub>. Para la diferenciación a mioblasto, se utilizó el siguiente medio de diferenciación: DMEM- Glutamax suplementado HS al 2%, 100 UI de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina. Las células se crecieron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### **293T [HEK 293T]:**

(ATCC Number: CRL-1573). Línea celular derivada de la línea HEK 293, que expresa el antígeno T SV40. Se cultivaron en medio DMEM- Glutamax complementado con FBS al 10%, 100 UI de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina.

Todas estas líneas celulares utilizadas son adherentes, por lo que se subcultivaron antes de que alcanzasen la confluencia. Para ello, se lavaron las placas de células con PBS (tampón fosfato salino) 1x (4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y se añadió una solución de tripsina-EDTA precalentada a 37°C. Se incubaron las células durante 5 o 15 minutos, dependiendo de la línea, y se le añadió el volumen deseado de medio de cultivo completo. Se resuspendieron y se sembraron en placas con medio fresco. Todos los reactivos de cultivo celular fueron adquiridos en Gibco® BRL (*Life Technologies™*, California, USA).

### 3.2. EXPERIMENTO DE RETARDO EN GEL (EMSA).

Se utilizó la técnica de retardo en gel o de movilidad electroforética (EMSA) para comprobar el efecto de un SNP sobre la capacidad de unión de un factor de transcripción a su secuencia de unión putativa. La técnica se realizó como describió Ausbel y cols. (177) con la diferencia de que en este caso se optó por sondas ya marcadas previamente con un fluoróforo, fluoresceína, para la detección de las sondas, en vez de marcarlas radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ .

#### 3.2.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES.

La obtención de extractos nucleares de la línea HepG2 se realizó empleando el kit de *Actif Motif* (California, USA), *Nuclear Extract Kit*. Se crecieron las células en placas Petri de 150mm de diámetro, P-150. Cuando los cultivos estaban al 80% de confluencia, se eliminó el medio y se lavaron dos veces con PBS 1x, para eliminar cualquier resto de medio de cultivo o de restos celulares suspendidos en él. Se añadió 3ml de PBS 1x suplementado con 1% (v/v) de inhibidores de fosfatasas, por P-150, y se rascó la placa para recoger las células. Para eliminar el exceso de PBS con inhibidores de fosfatasas se centrifugó la suspensión de células durante 5 min. a 500rpm y 4°C, aspirándose el sobrenadante y dejando el pellet de células en el tubo Falcon. Se resuspendieron las células en 500µl/P-150 de tampón hipotónico 1x y se dejó 15 min. en hielo. Tras la incubación se añadió 25µl/P-150 de Nonidet P-40 (NP-40) 0,1% (v/v), vorteándose durante 10 seg. y se centrifugó 30seg. a 14000rpm. Tras esto se descartó el sobrenadante (fracción citoplasmática) y se resuspendió el pellet en 50µl/P-150 de tampón de lisis completo (Tampón de lisis AM1, suplementado con DTT 10mM e inhibidores de proteasas al 1% (v/v)), agitándose en una noria durante 30min. en la cámara fría, tras lo cual se centrifugaron a 14000rpm durante 10min. Se recogió el sobrenadante, se dividió en alícuotas y se midió la concentración de proteína utilizando el método Bradford.

#### 3.2.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO BRADFORD.

La medida de la cantidad de proteína que contenía la muestra, se llevó a cabo mediante una adaptación del método colorimétrico descrito por Bradford y cols.

(178). La mezcla de ensayo tenía 200  $\mu$ l de reactivo comercial *Bio-Rad Protein Assay* de *Bio Rad* (California, USA) diluído 1:5 en H<sub>2</sub>O, y 1  $\mu$ l del extracto proteico diluido 1:10 en H<sub>2</sub>O. La reacción se incubó 10 min. a temperatura ambiente, y posteriormente se midió la absorbancia a 595nm. Para cada medición, se hizo una recta patrón por duplicado, con distintas concentraciones de BSA.

### 3.2.3. ANILLAMIENTO DE SONDAS PARA RETARDO EN GEL.

Para la realización deL EMSA precisamos usar cadenas dobles , por lo que en el primer paso hibridamos los oligonucleótidos para obtener una doble hebra de DNA, mezclando en un tubo eppendorf un oligonucleótido a una concentración final de 10  $\mu$ M, para las sondas marcadas, y de 40 $\mu$ M, para las sondas no marcadas de la competición (sonda fría), y su complementario a la misma concentración que el anterior, y llevando la mezcla a un volumen total de 100  $\mu$ l con tampón de anillamiento, a una concentración final de 1x (0,05 M Tris pH 7.5, 0,01 M Cl<sub>2</sub>Mg). Se hirvió durante 5 min. para dejar las sondas sin estructuras secundarias y se dejó enfriar durante varias horas, permitiendo que se establecieran las uniones complementarias entre ambas cadenas de DNA.

### 3.2.4. RETARDO EN GEL.

Los ensayos se realizaron en geles de poliacrilamida no desnaturizantes al 5%, corriéndose durante 1h 45min. a 160V en tampón Tris Borato EDTA (TBE) al 0,25x (Tris-HCl 50 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1 M y EDTA 1 mM), tras precorrerlos durante 45min. al mismo voltaje.

Las muestras, de un volumen final de muestra de 20 $\mu$ l, cargadas en el gel se prepararon de la siguiente manera: Se incubaron 20 $\mu$ g de extractos nucleares junto con un tampón de retardo (mix 5X, compuesto por: HEPES 100 Mm, KCl 250 mM, EDTA 0,5 Mm y glicerol al 50%, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, espermidina 2 mM, DTT 0,75 mM, BSA 3  $\mu$ g y poli-dIdC 0,8  $\mu$ g ) y el volumen necesario de H<sub>2</sub>O para tener 20 $\mu$ l de mix tras la adición de las sondas. Esta mezcla se incubó en hielo 10min. tras lo cual se adicionó 1 $\mu$ l de sonda marcada con fluoresceína y en las calles con competición un exceso 50x de sonda fría. Tras esto se incubaron las mezclas

## Materiales y métodos

30min. en hielo. Trascorrido este tiempo de incubación se cargaron en el gel. Los geles fueron escaneados en el FUJIFIL FLA-5000 usando una longitud de onda de excitación a 483nm con una intensidad de 650V.

### 3.3. CLONADO.

Para comprobar el efecto del SNP rs2816948, se clonó un fragmento del promotor de NR5A2 en el vector luciferasa pGL3basic, que contiene el cDNA de la luciferasa de *Photinus pyralis*. Los diferentes alelos del SNP, se obtuvieron a partir de DNA genómico de muestras de pacientes, cedidas amablemente por el Doctor Riancho del Moral.

#### 3.3.1. PCR.

Las muestras se amplificaron mediante PCR (*Polymerase Chain reaction*), descrita por primera vez por Mullis y cols. (179). Para ello se diseñaron cebadores específicos que flanqueasen la región del promotor de NR5A2 que contenía el SNP y la región próxima al inicio de la transcripción, para poder realizar los estudios de actividad luciferasa. A los cebadores se les añadieron, en sus extremos 5', las dianas de los enzimas de restricción Kpn1 y Xho1, ya que al emplear dos enzimas diferentes se puede controlar el sentido en el que se inserta el fragmento. Para la amplificación a partir de DNA genómico se utilizó el sistema *Expand High Fidelity PCR system* de Roche (Basilea, Suiza), una polimerasa de alta fidelidad. La secuencia de los cebadores empleados aparecen en la Tabla M1.

La PCR de amplificación se realizó con el protocolo recomendado por el fabricante, ajustando la temperatura de hibridación de los cebadores a 55°C. La PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE 0,5x (0,02M de Tris acetato y 1mM de EDTA), a 100V durante 15min. Para visualizar las bandas, se adicionó bromuro de etidio al gel. El gel se visualizó en un transiluminador de *Fotodyne* (Wisconsin, USA). Las bandas a la altura esperada se cortaron del gel, purificándose el DNA mediante el kit de extracción de banda de *QIAGEN* (Hilden, Alemania), resuspendiéndose en un volumen de H<sub>2</sub>O final de 20µl.

### 3.3.2. DESFOSFORILACIÓN DE LOS VECTORES.

Los vectores fueron previamente digeridos con los mismos enzimas que los empleados en la digestión de los fragmentos de DNA. Tras realizar la digestión y la purificación de banda se desfosforilaron, utilizando para ello la fosfatasa *rAPId Alkaline Phosphatase* de Roche. Se utilizó 1U de enzima y 1µl de tampón de desfosforilación (0,5M Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,5), en un volumen final de 10µl, durante 10min a 37°C, seguido de una desnaturalización a 72°C durante 15min. Tras esto se purificó el vector empleando el método de purificación de banda anteriormente descrito.

### 3.3.3. LIGACIÓN.

Los fragmentos de DNA se ligaron a sus respectivos vectores, previamente digeridos y purificados de banda de la misma forma que los fragmentos, empleando la Ligasa T4 de Takara (Otsu, Japón), utilizándose 3 U/µl de T4 DNA-ligasa y tampón de ligado rápido suministrado junto a la enzima (Tris-HCl, 60 mM pH 7'8, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM y polietilenglicol al 10%) en un volumen final de 10µl, empleándose en diversas relaciones de vector y de inserto. Se dejó la ligación toda la noche a 4°C. Tras esto, para evitar interferencias del tampón o el enzima en la transformación, se dializaron las ligaciones, empleándose membranas para la dialización de Millipore (Massachusetts, USA), con un diámetro de poro de 0,05µm en una placa petri con agua milli Q durante 30 minutos, tras lo cuál se recogieron las ligaciones para la transformación.

### 3.3.4. TRANSFORMACIÓN.

La transformación de las células competentes se hizo añadiendo 10 µl del producto de la ligación a 30 µl de bacterias competentes de la cepa de *E. Coli* DH-5α, que se mantuvieron en hielo durante 60 minutos. A continuación se sometieron a un shock de calor, 5 min. a 37 °C, y se mantuvieron en hielo otros 5 min. Se añadieron 800 µl de LB y se incubó durante 1h. a 37 °C en agitación. Las bacterias se centrifugaron, y el precipitado se resuspendió en 100 µl de LB. Se distribuyó este cultivo en placas de medio LB-agar con AP 100 µg/ml, y se incubaron a 37 °C toda

## Materiales y métodos

la noche. Las colonias que crecieron en estas placas se comprobaron mediante PCR o corte con enzimas de restricción y las que resultaron positivas se enviaron a secuenciar.

<b>A)</b>	Secuencia del cebador (5'→3')	Diana para subclonaje
Fw:	<u>GGTACCT</u> GTGCTGCATAGCACCTCTC	KPN1
Re:	<u>CTCGAGAGCAAGTCTTCCCTGGACTC</u>	XHO1
<b>B)</b>	CTGTGCTGCATAGCACCTCTCCACTTCTGAGTTAATCATTCTTTGCCATTATCTG GCAAGAATTCTTATCTCTTTTGCTGTCACTTTATAACAGGGTCCTTTATCAACCT GCATAGAGTCATGTGATGAGTCAAAGCCTAT[C/G]AAAAGTTTCCATTCTTCTGA TTAGAAACCATCATGAACTGGATACATGGTTTACAGCAGGTCACTAATGTTGG AAAAAGTACAGAGTCCAGGGAAAGACTTGC	

Tabla M1. Cebadores y secuenciada clonada del promotor de NR5A2. A) Secuencia de los cebadores empleados para el clonaje del fragmento de promotor de NR5A2. La secuencia correspondiente a las dianas de los enzimas de restricción aparece subrayada. B) Secuencia del fragmento del promotor de NR5A2 clonado. El SNP rs2816948 aparece en rojo.

### 3.4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD LUCIFERASA.

Se utilizó la técnica de actividad luciferasa para determinar si el SNP, rs2816948, del promotor de NR5A2 tenía un efecto funcional. Para ello se clonaron los dos alelos del SNP, junto con un fragmento del promotor, en el vector luciferasa pGL3basic, de -212pb a +36pb, donde 0 es el inicio de la transcripción. Los ensayos se realizaron en células HepG2. Se transfectaron mediante polímeros policatiónicos, el vector con el fragmento de promotor, y un vector con la luciferasa de *Renilla*, como normalizador de la transfección.

#### 3.4.1. MEDICIÓN DE ACTIVIDAD LUCIFERAS.

Para la determinación del efecto del SNP de promotor de NR5A2, rs2816948, se utilizó el *Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)*. Contiene una disolución del sustrato para la enzima luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*), una solución de inactivación de esta actividad y sustrato de luciferasa de *Renilla reniformis (Sea pansy)*. Para la transfección, partimos de 10<sup>5</sup> células sembradas en placas de 35 mm de diámetro. La transfección de los plásmidos se realizó

empleando el sistema de transfección de polímeros policatiónicos *JetPEI™*. Para ello se cotransfectaron 2µg de plásmido luciferasa con el fragmento de promotor y un plásmido de normalización de la transfección, plásmido con la luciferasa de *Renilla* bajo el promotor de la timidin kinasa (TK). La relación de los plásmidos fue de 100:1. Los plásmidos se diluyeron en 100µl de NaCl 150mM al que se adicionó la solución de *JetPEI™* (4µl de *JetPEI™* en 100µl de NaCl 150mM), se vorteoó la mezcla y se incubó a temperatura ambiente durante 20min. Acto seguido se añadió gota a gota la mezcla sobre las células y se mantuvieron 48h a 37°C, en las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente.

Para la determinación de la actividad luciferasa, se lavaron las células dos veces con PBS 1x, y a continuación se lisaron en placa con 200µl del tampón *Reporter Lysis buffer* 1x según las instrucciones del fabricante. Los extractos centrifugaron 5 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante se recogió en otro eppendorf. Se midió una alícuota de 10 µl en un luminómetro TD 20/20 (*Turner Designs*) con 75µl de la solución del sustrato para la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*). La medida de la actividad luciferasa se normalizó con respecto a la medida obtenida añadiendo de manera inmediata otros 75µl de la solución que contenía un tampón de inactivación de la primera actividad enzimática y el sustrato de luciferasa *Renilla* sobre la muestra.

### 3.5. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

Para comprobar el efecto de NR5A2 sobre los distintos genes del metabolismo y comprobar los resultados del secuenciado de RNA, se utilizó la técnica de la PCR a tiempo real. La PCR a tiempo real se basa en la medición de la incorporación de un fluoróforo al fragmento amplificado. La fluorescencia emitida es analizada por el programa, lo que nos permite una cuantificación más precisa de los niveles de expresión relativos de nuestros genes de interés.

#### 3.5.1. EXTRACCIÓN DE RNA.

Para obtener el RNA, de las diferentes líneas, con el que realizar las PCR cuantitativas, se utilizó el kit *RNeasy® plus* de *QIAGEN*. Las células, lavadas

## **Materiales y métodos**

previamente dos veces con PBS 1x., se lisaron directamente sobre la placa empleando 350µl del tampón de lisis *RLT plus*. El lisado se recogió con una jeringuilla de 1ml con una punta G20 (diámetro 0,9mm), pasándose 4-5 veces por ella. Tras esto se pasó el lisado a la columna de eliminación de DNA genómico, *gDNA eliminator*, se centrifugó 1min. a 10000rpm y se recogió el eluido . Tras añadirle un volumen de etanol al 70% (vol/vol), el eluido se pasó a la columna de purificación de RNA. La mezcla se centrifugó a 10000rpm durante 1min. desechándose el eluido. Posteriormente se pasó por la columna 700µl de tampón de lavado RW1, y posteriormente dos lavados de 500µl de tampón RPE. En todos los pasos se centrifugó a 10000rpm durante 45seg. y se desechó el eluido. Para eliminar los restos de los tampones de la columna se procedió a una última centrifugación a 120000rpm durante 45 seg. Se pasó la columna a un tubo eppendorf de 1,5ml, se añadieron a la columna 50µl de H<sub>2</sub>O libre de RNAasas y se incubó 5min a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugó a 7500rpm durante un minuto. Este último paso se repitió añadiendo el eluido en vez de agua nueva. La concentración del RNA se midió mediante espectrometría utilizando el espectrofotómetro *Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA)*. El RNA se conservó a -20°C.

Para los estudios de expresión con DLPC se cambió el medio por medio sin suero suplementado con 100µM de DLPC 24h antes de la extracción del RNA.

### **3.5.2. SÍNTESIS DE cDNA.**

Se utilizó el kit *iScript cDNA Synthesis Kit* de *Bio-Rad*. A partir de 500ng de RNA en un volumen final de 20µl, se añadieron 4 µl del mix 5x, 1 µl del enzima y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. La mezcla se incubó durante 5min. para facilitar la unión de los cebadores al RNA, y luego se incubó 45 minutos a 42 °C finalizando con una inactivación enzimática de 10 minutos a 95 °C. El cDNA se conservó a -20 °C.

### **3.5.3. PCR CUANTITATIVA.**

La técnica de la PCR a cuantitativa se basa en la unión de un fluoróforo a las dobles hebras de DNA formadas en cada ciclo de la PCR. La fluorescencia emitida por el

fluoróforo es captada cada ciclo, de ahí que también se denomine PCR a tiempo real.

Todas las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron de la siguiente forma: En un volumen final de 12,5µl/ pocillo se añadieron 6,25µl de IQ™ SYBR Green Supermix 2x de Bio Rad, 1µl de cDNA, el volumen para la concentración de cebadores deseada y se completó con agua milli Q. Las condiciones específicas para cada gen, así como la secuencia de cebadores y la concentración de los mismos se hallan resumidas en la tablas suplementarias 2 y 3.

### 3.5.4. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN.

Se utilizó el método delta-delta Ct para la determinación de la expresión relativa. El método delta-delta Ct expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control tal y como se muestra en la siguiente ecuación: Relación=  $2^{-[\Delta CP_{muestra} - \Delta CP_{control}]}$

Para el análisis estadístico se utilizó el método de la chi-cuadrado.

### 3.6. GENERACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.

Para poder estudiar los efectos de NR5A2 sobre el transcriptoma de las distintas líneas celulares, se recurrió a distintas estrategias, silenciar o disminuir la expresión de NR5A2 con siRNAs, crear líneas estables que tengan la expresión de NR5A2 silenciada mediante shRNAs específicos usando lentivirus o aumentar los niveles de NR5A2 creando transfectantes estables que sobreexpresasen el cDNA de NR5A2.

#### 3.6.1. TRANSFECCIÓN DE siRNAs

La transfección, en células HepG2, de un mix de tras siRNAs diferentes y específicos de NR5A2 o un siRNAs sin diana, se realizó según el protocolo de transfección de Santa Cruz Biotechnology (California, USA). Se sembraron  $10^5$  HepG2 en pocillos de 35mm de diámetro, y se esperó a que alcanzasen una confluencia del 60-70%. Para la transfección se prepararon, de forma independiente, dos mezclas: Mezcla A contiene el siRNA, de entre 40 a 80pmoles, por pocillo, en 100µl de medio de

## **Materiales y métodos**

transfección. Mezcla B, por pocillo, 6µl de reactivo de transfección en 100µl de medio de transfección. Se añadió la solución A sobre la B mezclándose mediante pipeteo. Tras mezclarlo se dejó incubar a temperatura ambiente 30min. Tras la incubación se añadieron 800µl de medio de transfección, por pocillo, y se añadió a las células, lavadas previamente, con PBS 1x. A las 6 horas se añadió 1 ml de medio DMEM con 20% de FBS y se dejó en el incubador entre 24 y 72horas. Tras la incubación se extrajo el RNA según como aparece detallado en el punto correspondiente de materiales y métodos.

### **3.6.2. ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA QUE SOBREPRESA NR5A2.**

Para establecer una línea de HepG2 que sobreexpresase NR5A2, se clonó la secuencia del cDNA de NR5A2 el vector de expresión en eucariotas pCEFL. Una vez clonado se transfectó en la línea celular HepG2. Los clones se seleccionaron empleando el gen de resistencia a geneticina que se encuentra codificado en el plásmido.

La transfección se realizó en células HepG2 sembradas en una p-100, dejándolas crecer hasta alcanzar una confluencia del 50%. Para la transfección se utilizó el sistema *Jet Pei*<sup>®</sup> de *Polyplus Transfection* (Nueva York, USA). Se prepararon dos mezclas. La mezcla A, contiene 250µl de NaCl 150mM, a los que se añadieron 20µl de *Jet Pei*<sup>®</sup>, se vorteo la mezcla y se añadió a la solución B. La mezcla B contiene 10µg del plásmido a los que se añadieron 250µl de NaCl 150mM. La mezcla soluciones se vorteo y se dejó incubando 20 min. a temperatura ambiente. Tras esto se añadieron a las placas gota a gota por toda la placa. A las 48h se cambió el medio de las placas y se le suplementó con geneticina (*Santa Cruz Biotechnology*) a una concentración de 750µg/ml. Se seleccionaron los clones resistentes y se crecieron independientemente. Se comprobó si expresaban la construcción de NR5A2 mediante PCR cuantitativa.

### **3.6.3. ESTABLECIMIENTO DE LAS LÍNEAS CON SILENCIAMIENTO DE NR5A2.**

Se establecieron líneas de HepG2 y C2C12 con expresión silenciada de NR5A2. Para ello se usaron lentivirus que contuviesen plásmidos que expresasen shRNAs (*small*

*hairpin RNA*) específicos contra los RNA mensajeros de NR5A2 de SIGMA-ALDRICH (Missouri, USA). El plásmido en el que se encuentran insertados los shRNA, el TRC-1, es un vector diseñado para la infección con lentivirus. Para la generación de lentivirus se utilizó la línea 293T.

Una vez obtenidos los lentivirus, éstos se adicionaron con medio fresco a las células, dejándose 48h. Tras esto se procedió al cambio de medio y a la selección con puromicina 1,5µg/ml. Tras otras 48 horas se eliminó el medio, se lavaron las placas con PBS 1x y se aislaron los clones mediante una punta de pipeta con tripsina, cultivándose de forma aislada.

### 3.6.3.1. SÍNTESIS DE LENTIVIRUS.

Para la síntesis de lentivirus en 293T se utilizaron tres plásmidos diferentes. El plásmido con el shRNA específico contra NR5A2, un vector con el gen que codifique para envuelta proteica, pCI-VSVG, y un vector de empaquetado, psPAX2 (Fig.M1). Se utilizó el sistema de transfección por cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), recogiendo el medio y purificándose los lentivirus por ultracentrifugación.

Los plásmidos con los shRNA específicos contra NR5A2 humano empleados en HepG2 fueron TRCN0000019654 y TRCN0000019656. Los plásmidos con los shRNA contra Nr5a2, específicos de ratón, utilizados en C2C12 fueron TRCN0000025966, TRCN0000025985 y TRCN0000025971.

### 3.6.3.2. TRANSFECCIÓN POR EL MÉTODO DE CaCl<sub>2</sub>.

Para la transfección de los plásmidos lentivirales se utilizó el método del CaCl<sub>2</sub>. Este método consigue la transfección mediante la formación de un precipitado formado por el calcio y los grupos fosfato libres y del DNA. Estos precipitados se adsorben a las células teniendo como resultado final la transfección del DNA.

Para la transfección, se plaquearon células 293T en placa p-150. Cuando las células alcanzaron un 60% de confluencia se las cambio el medio por medio fresco y se procedió a realizar la transfección: Por cada placa a transfectar se mezcló en un tubo Falcon, 20µg del plásmido correspondiente, 15µg del vector de empaquetado

## Materiales y métodos

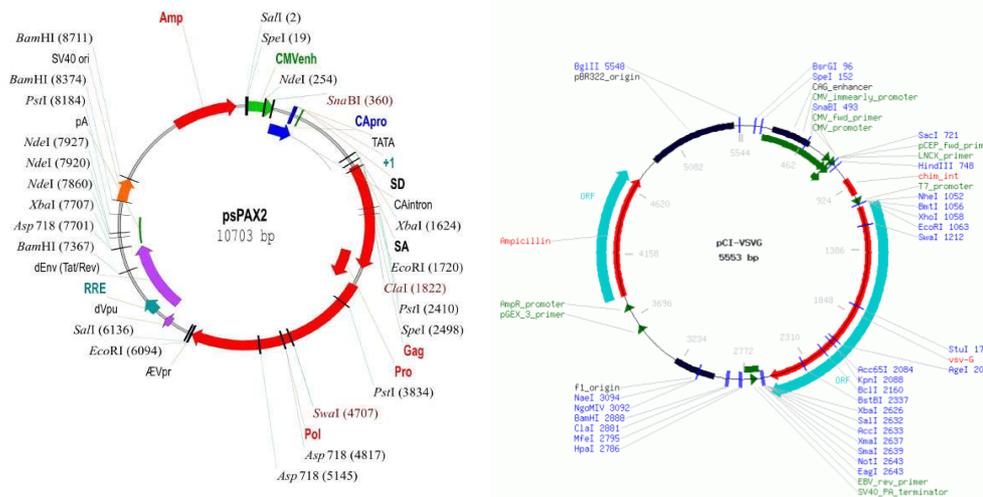


Fig.M1. Mapas de los vectores empleados para la síntesis de lentivirus. Mapas de psPAX2, vector de empaquetado y pCI-VSVG, vector para la envuelta proteica, respectivamente.

y 6µg del vector que codifica para la envuelta. Esta mezcla se llevan a un volumen de 438µl con agua milli Q filtrada. A la solución de plásmidos se añadió 62µl de CaCl<sub>2</sub> 2M y se dejó incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se adicionaron 500µl de tampón HBS 2x (2g de glucosa, 250mM de NaCl, 5mM de KCl, 1,5mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 42mM de HEPES a pH de 7,05), se vorteo la mezcla y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos, tras lo cual se adicionó a las células gota a gota por toda la placa. A las 12 horas se cambió el medio por medio fresco, tras esto cada 24 horas durante 3 días se recogió el medio, cambiándose por medio fresco. El medio recogido de esta manera se centrifugó a 3000rpm durante 3 minutos descartándose el pellet compuesto por células y restos celulares y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,45µm. Los medios obtenidos de esta forma se almacenaron a -80°C para su posterior centrifugación.

### 3.6.3.3. PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN.

Para purificar y concentrar los lentivirus se recurrió a la ultracentrifugación. Para ello, los medios que contenían los lentivirus se ultracentrifugaron en una ultracentrífuga Optima™ XL-100K, usando un rotor SW28, ambos de *Beckman Coulter* (Pasadena, California, USA), a 26000rpm durante 2 horas 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en medio fresco, se alicuotó y se almacenó a -80°C.

### 3.7. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE GLUCOSA.

Para la determinación del consumo de glucosa se utilizó el sistema enzimático GOD-POD. Este colorimétrico se basa en el uso de dos enzimas, la glucosa oxidasa (GOD) y la peroxidasa (POD), para generar un compuesto coloreado, la quinoaimina con un máximo de absorción a 505nm.

Se plaquearon las células en una placa de 24 pocillos, para las HepG2 se dejaron hasta una confluencia del 60% y para las C2C12 se las dejó en medio de crecimiento hasta alcanzar la confluencia, tras esto se las cambió a medio de diferenciación durante 7 días. Cuando las células se encontraban en las condiciones anteriormente descritas se las cambió el medio por DMEM con 2g/l de glucosa. El medio de las C2C12 se suplemento con DLPC, 100µM, y/o insulina, 100nM. El medio se recogió a los tiempos deseados y se usaron una alícuota de 40µl en 2ml de solución de determinación de glucosa, 1ml de H<sub>2</sub>O y 1ml de reactivo GOD-POD (*Spinreact*, Gerona, España). Se incubó la solución con el medio durante 10 minutos a 37°C en un baño y se midió la absorbancia a 505nm, en un espectrofotómetro GENESYS 20 (*Thermo Scientific*). Para la determinación de la cantidad de glucosa se construyó una recta patrón y se normalizó el consumo de glucosa por el número de células.

### 3.8. DETERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE TRIACILGLICÉRIDOS.

Se sembraron en placa de 24 pocillos, unos 70-80.000 células de HepG2. Al alcanzar una confluencia de aproximadamente 60%, se cambió su medio por el medio de incubación. DMEM sin suero y suplementado con 0,2 µM de oleico y 2,5 µM Ci de [3H] glicerol. A las 6h de adicionar el medio, se eliminó y se lavó dos veces con PBS 1x. La extracción de los TAG se realizó mediante una variación del método descrito por Folch y cols. (180). Se añadieron 300µl de tampón de lisis (0,1% NP-40 en 0,1N de NaOH) a cada pocillo y se dejó 5 min. a temperatura ambiente. Se recogió el lisado y se pasó a un tubo eppendorf donde se añadieron 300µl de cloroformo:metanol 2:1 (v/v). Se mezcló mediante pipeteo y se añadieron 400 µl de KCl 0,88% (p/v), vorteándose durante 10segundos, tras lo que se centrifugaron las muestras a 2000rpm durante 10min. a 4°C. Se desechó la fase

## Materiales y métodos

acuosa, guardándose la fase orgánica. Se midió la radiactividad por duplicado para cada muestra, usando 100µl de la fase orgánica por 2ml de líquido de centelleo (*National Diagnostics*, Atlanta, Georgia, USA) se utilizó el contador de centelleo LS6000IC (*Beckman-Coulter*). Los resultados se normalizaron por la concentración de proteína.

### 3.9. MEDICIÓN DE SECRECIÓN DE VLDL.

Para comprobar el efecto sobre la secreción de TAG en HepG2 se utilizó un ELISA de *MABTECH* (Nacka Strand, Suecia) contra ApoB, el componente mayoritario de las VLDL.

Se sembraron HepG2 en una placa de 24 pocillos y se mantuvieron en medio de crecimiento hasta que alcanzaron una confluencia del 60%. Tras esto, se las cambio el medio por DMEM 4g/l de glucosa y ácido oleico 200nM durante 24h. A las 24h se recogió el medio, diluyéndose en una relación 1:10 en tampón de incubación (PBS 1x, Tween-20 al 0,005% (v/v) y BSA al 0,1% (p/v)). Se adicionaron 100µl de medio 1:10 a una placa de ELISA, a la que previamente se había dejado durante la noche con un anticuerpo específico contra ApoB a una concentración 2µg/ml en PBS 1x. Tras la incubación se lavó 3 veces con 200µl con tampón de lavado (PBS 1x, Tween-20 al 0,005% (v/v)). Este proceso de lavado se repitió tras cada incubación. Se incubó el medio diluido y los estándares durante 2h a temperatura ambiente. Tras los lavados se adicionaron, por pocillo, 100µl de anticuerpo anti ApoB biotinilado a concentración 1µg/ml y se incubó durante 1h a temperatura ambiente. Tras la incubación se lavó tres veces con 200µl con tampón de lavado. Tras los lavados se añadió, por pocillo, 100µl de estreptavidina-HRP 1:1000, en tampón de incubación, incubándose durante 1h a temperatura ambiente. Tras los lavados se añadieron 100µl de una solución de peróxido de hidrógeno al 30% y TMB y se dejó reaccionar durante 20 min. tras lo cual, se paró la reacción adicionando 50µl de una solución de ácido sulfúrico 2N. Se leyó la absorbancia a 450nm y se le sustrajo el valor de absorbancia a 570nm, interpolándose los resultados en una recta patrón de ApoB purificada. Los resultados se normalizaron por la cantidad de proteína.

### 3.10. DETERMINACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.

Para la determinación de la tasa de degradación de ácidos grasos se plaquearon C2C12 en una placa de 24 pocillos y se dejaron en medio de crecimiento hasta la confluencia. Tras esto se cambiaron a medio de diferenciación y se dejaron durante 7 días hasta la completa formación de miotubos. A los 7 días se las cambió el medio con el tratamiento, DLPC, 100µM, y/o insulina, 100nM, durante 24 horas. A las 24 horas se las cambio el medio por 500µl de DMEM suplementado con [Oleil-1-14C]- Oleil coenzima A 0,1µCi/ml. A las 2 horas se recogió el medio para la recogida del <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. La precipitación se realizó en tubos Falcon de 15ml a los que se les pegó, en la parte superior, un tubo eppendorf de 1,5ml sin tapa. En el eppendorf se añadieron 500µl de NaOH 2N, para la precipitación del <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Al medio recogido se le adicionaron 250µl de HCl 6N. Se dejó durante 24h a temperatura ambiente, tras lo cuál se recogió la solución del eppendorf y se midió en un contador de centelleo. Los resultados se normalizaron por la cantidad de proteína.







## RESULTADOS

*“Lo que se necesita no es la voluntad de creer si no el deseo de averiguar, que es exactamente lo contrario.”*

- Bertrand Russell.



#### 4.1. ASOCIACIÓN DEL SNP DEL PROMOTOR DE NR5A2 rs2816948.

NR5A2 es un receptor nuclear con diversas funciones, entre ellas el metabolismo de apolipoproteínas y del colesterol y sus derivados. Por esto se le consideró un buen candidato para un estudio de asociación entre SNPs localizados en la zona del promotor de NR5A2 con IMC y DMO. Previamente a los estudios realizados en esta tesis doctoral, se había realizado un estudio de asociación entre diversos SNPs con IMC e DMO en una cohorte de Cantabria de mujeres postmenopáusicas. Inicialmente el SNP rs2816948, localizado en el promotor de NR5A2, a -85pb del inicio de la transcripción, mostró una tendencia a la asociación, tanto en IMC como con DMO.

Aunque la asociación con IMC no se observó en estudios de asociación posteriores, la asociación con DMO se mantuvo por lo que se decidió hacer un estudio funcional del SNP.

##### 4.1.1. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL SNP DEL PROMOTOR DE NR5A2 rs2816948.

En el estudio de asociación previo se encontró un SNP del promotor de NR5A2, rs2816948 (C>G), localizado a -85pb del inicio de la transcripción, no descrito

###### Alelo C

Model	Name(s)	Strand	Start	End	Score	E-value
<a href="#">M00037</a>	NF-E2	+	3	13	4.4	9.1
<a href="#">M00513</a>	ATF3	-	3	12	2.8	19
<a href="#">T01978</a>	JunD	-	6	12	2.2	16
<a href="#">T00029</a>	AP-1	+	6	12	3.2	18

###### Alelo G

Model	Name(s)	Strand	Start	End	Score	E-value
<a href="#">T01823</a>	Pax-2	-	3	13	2.7	18
<a href="#">MA0051</a>	Irf-2	+	4	21	2.8	7.4

Tabla R1. Resultados de los análisis bioinformáticos para los dos alelos del SNP rs2816948 en el programa ChIP MAPPER. El programa predice que el alelo del SNP define de forma determinante las proteínas que pueden unirse a la secuencia.

## Resultados

como funcional. Esto sugería que el cambio de alelo podría producir un efecto sobre la transcripción al alterar el sitio de unión de un factor de transcripción. Para ello en primer lugar se analizaron los posibles sitios de unión afectados por el SNP (tabla.R1) usando para ello el programa bioinformático *Chip MAPPER* (<http://www.mapper.chip.org/>). El programa predecía la desaparición para un sitio de unión de Jun-D y otro de ATF-3 (factor de transcripción dependiente de AMPc-3) en la hebra antisentido y la desaparición en la hebra codificante de un sitio de unión de NFE2 (factor nuclear derivado de eritrocitos-2) y otro de AP-1 (proteína activadora-1).

Para determinar si el SNP provocaba cambios funcionales se utilizaron dos técnicas, el ensayo de retardo en gel, o EMSA y el ensayo luciferasa. Los resultados del EMSA (Fig.R1 A) mostraron que no había cambios en el patrón de bandas en función del alelo del SNP. Sin embargo se observó una disminución de la intensidad de la banda en el alelo G, respecto del alelo C. Los resultados de los ensayos de retardo en gel sugerían que el SNP podría tener un efecto funcional. Para confirmar esto se procedió a clonar un fragmento del promotor de NR5A2 que comprendía la región proximal del mismo, desde -212 a +36pb, considerando 0pb como el inicio de la

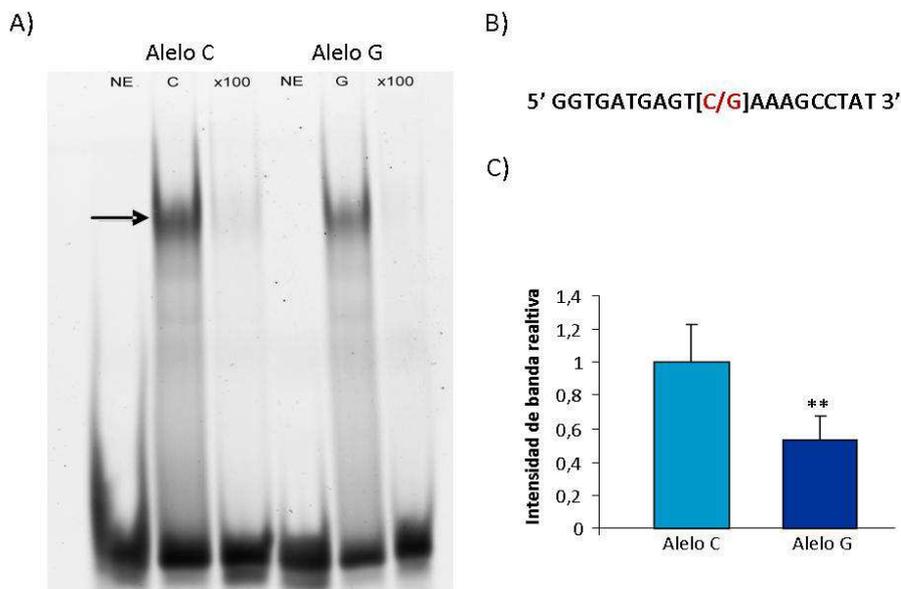


Fig.R1. EMSA del SNP rs2816948. A) EMSA para los dos alelos del SNP. Se emplearon 20µg de extractos nucleares de HepG2. NE: Sin extracto nuclear, C/G: Calle con la sonda con el alelo del SNP indicado, x100: Calle con un exceso de sonda sin marcar de 100 veces. B) Secuencia de la sonda empleada, los distintos alelos del SNP aparecen en rojo. C) Análisis estadístico de los EMSAs del SNP. En 4 experimentos realizados independientemente mostraron una disminución de la capacidad de unión del alelo G respecto del alelo C del 47% con una  $p < 0,01$

transcripción. Se clonaron los dos alelos del fragmento a partir de muestras de pacientes previamente genotipados, y se insertó en el vector de expresión luciferasa pGL3basic. La transfección se realizó en la línea celular HepG2, una línea celular derivada de hepatocarcinoma que presenta expresión de NR5A2, lo que garantizaba que la línea fuese capaz de expresar el gen luciferasa.

Los resultados de los experimentos luciferasa (Fig. R2) mostraron, en cuatro experimentos independientes llevados a cabo por duplicado, que la variación de C (alelo ancestral) a G, producía una disminución de la expresión de la luciferasa de luciérnaga del 25%, de forma estadísticamente significativa.

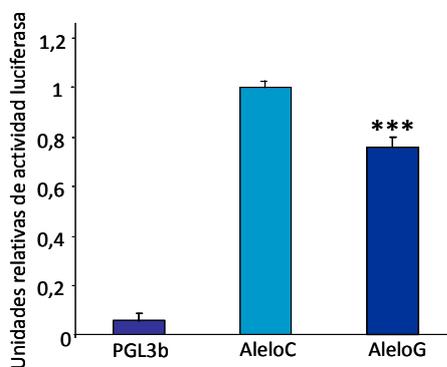


Fig.R2. Resultados de los experimentos de actividad luciferasa. Con un n=4, el resultado medio muestra que el alelo G induce una disminución de la actividad del promotor del 25% con una  $p \leq 0,005$ . pGL3b: Vector vacío. Alelo x: Vector con el fragmento de promotor con la variante alélica x para rs2816948.

#### 4.2. PAPEL DE LA EXPRESIÓN DE NR5A2 EN EL TRANSCRIPTOMA DE HEPG2.

Dado que hasta el momento no se había descrito ninguna conexión entre NR5A2 e IMC se procedió a realizar un estudio sobre el efecto que tenía la expresión de NR5A2 en el transcriptoma de células HepG2. Para ello se llevó a cabo el silenciamiento de la expresión de NR5A2 empleando siRNAs específicos. Como control de la especificidad de los siRNAs se empleó un RNA de tamaño similar sin diana conocida (siRNAc). Los resultados del efecto de los siRNAs determinaron que el pico de acción se producía a las 24h del tratamiento, e inducía una disminución del mRNA de NR5A2 de forma específica y estadísticamente significativa (Fig.R3).

Se realizó un análisis de la expresión diferencial mediante secuenciación de tres muestras con silenciamiento de NR5A2 frente a tres muestras control. Para ello se utilizó la plataforma *Illumina* (Hayward, CA, USA). Esta plataforma sintetiza una

## Resultados

librería de fragmentos de, aproximadamente 300pb, que cuantifica la abundancia relativa de los mRNAs.

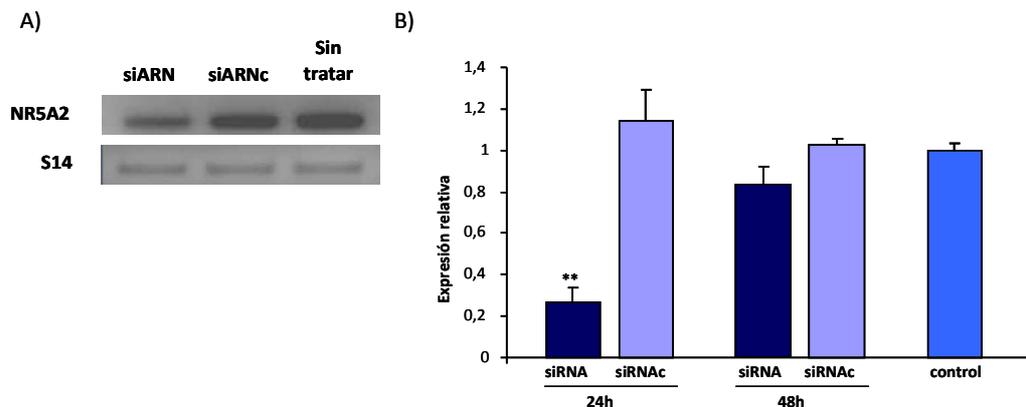


Fig.R3. Expresión de NR5A2 tras el tratamiento con siRNAs. A) Gel de agarosa con la expresión del mRNA de NR5A2 tras 24h de tratamiento con los siRNAs. B) Expresión del mRNA de NR5A2 a 24 y 48h en células tratadas con el siRNA específico o el control a las 24 y 48h. Los resultados mostraron que hay una disminución del 74% a las 24h del tratamiento, con una  $p < 0,01$ . siRNA: HepG2 tratadas con los siRNAs contra NR5A2. siRNAc: HepG2 tratadas con un siRNA sin diana. Sin tratar: HepG2 control. \*\* $p \leq 0,01$ .

Los resultados de los respectivos secuenciados y cuantificaciones del mRNA, mostraron diferencias de expresión en 4463 genes. Se descartaron los genes cuya variación en la expresión era inferior a la de APOA1, una diana cuya regulación por NR5A2 había sido descrita (140). Tras emplear este filtro se obtuvieron diferencias de expresión en 2525 genes. Para comprobar los resultados del secuenciado se usaron dos dianas conocidas de NR5A2, CYP7A1 y CYP8B1 (129, 136), dos genes implicados en la síntesis de sales biliares. Estos genes tenían disminuidos los niveles de su mRNA en la muestra de células tratadas con los siRNAs, lo que está en consonancia con el papel activador de NR5A2 descrito previamente. A continuación se clasificaron los genes afectados en función de la ruta a la que pertenecen, de acuerdo con las rutas establecidas por el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). El valor-p, o nivel de significación, del porcentaje de genes cuya expresión se hallaba modificada en las muestras tratadas con los siRNAs se obtuvo usando el test de la chi cuadrado.

Los resultados (tabla R2) mostraron que entre existían varias rutas afectadas por el silenciamiento de NR5A2. Entre las rutas más afectadas, se encontraban la de metabolismo de carbohidratos, así como las subrutas de la glucólisis y la gluconeogénesis, con un porcentaje de genes afectados del 25,74% y del 35,48%

RUTA	GENES AFECTADOS	Nº GENES	% DE GENES AFECTADOS	VALOR-p
Complemento y coagulación	26	69	37,68	1,61E-10
Glucólisis y gluconeogénesis	22	62	35,48	3,09E-08
Metabolismo de la glicina, serina y treonina	12	31	38,71	8,18E-06
Metabolismo de carbohidratos	26	101	25,74	4,30E-05
Oxidaciones biológicas	30	124	24,19	6,12E-05
Ruta de señalización PPAR	18	69	26,09	0,0005
Metabolismo de drogas	18	72	25	0,0011
Hemostasia	48	256	18,75	0,0019
Metabolismo del retinol	16	64	25	0,0021
Metabolismo de xenobióticos por el citocromo P450	17	70	24,29	0,0024
Biosíntesis de hormonas esteroideas	14	55	25,45	0,0031
Metabolismo de la tirosina	12	46	26,09	0,0046
Metabolismo de aminoácidos	31	163	19,02	0,0097
Metabolismo del almidón y de la sacarosa	12	52	23,08	0,0187
Diabetes Mellitus tipo II	11	47	23,4	0,0213
Peroxisoma	16	78	20,51	0,0285
Metabolismo del glutatión	11	50	22	0,0381

Tabla R2. Clasificación, por rutas, de los genes afectados por el silenciamiento de NR5A2. Se señala el porcentaje de genes de la ruta afectados, así como el valor estadístico de éstas variaciones.

respectivamente. En ambas rutas el nivel de significación era inferior a  $1E-05$ , lo que daba robustez a los datos obtenidos en el secuenciado de mRNA. En la tabla se puede observar que también aparecen afectados un número importante de genes asociados diabetes mellitus tipo II, no obstante su valor p es muy bajo. Por tanto se concluyó que los genes que sería más interesante analizar eran los integrados en los otros dos grupos anteriormente mencionados. Dado que los estudios metodológicos requieren una manipulación a lo largo de varios días, se decidió

## Resultados

construir una línea de HepG2 que tuviese su expresión de NR5A2 silenciada de forma constitutiva. Así mismo, control adicional se construyó también una línea de HepG2 que sobreexpresase NR5A2.

### 4.3. VALIDACIÓN DE LAS LÍNEAS.

El método de construcción de ambos tipos de líneas se ha descrito en la sección de materiales y métodos. En el caso de la línea silenciada se construyó empleando dos shRNA diferentes, empaquetados en lentivirus, con el gen de resistencia a puromicina para la selección de los clones infectados. Para construir la línea que sobreexpresa NR5A2 se empleó una construcción plasmídica, basada en el vector pCEFL, que expresase el cDNA de NR5A2 que está bajo el control del promotor Ef1. Los clones fueron seleccionados mediante la resistencia a geneticina. En ambos casos la comprobación de los niveles de NR5A2 se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa.

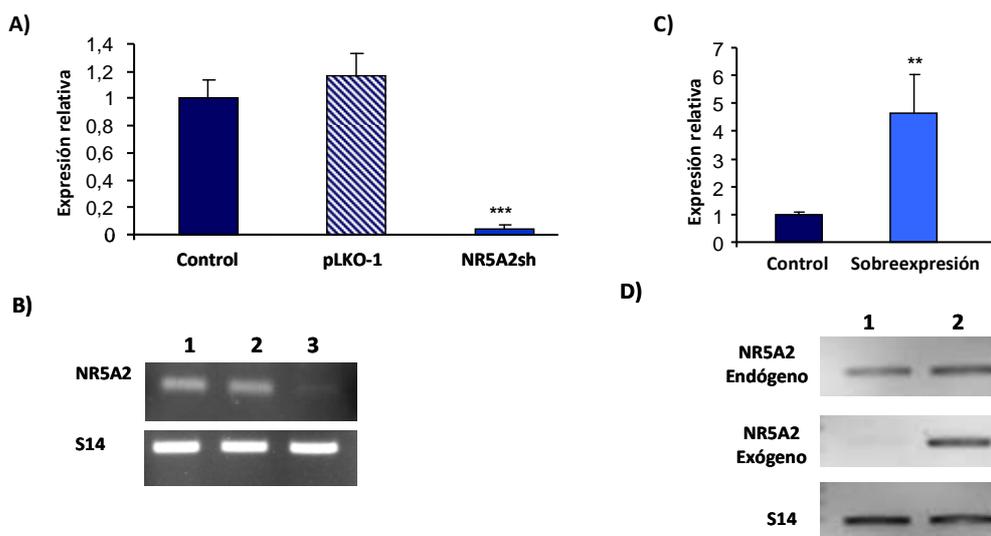


Fig. R4. Caracterización de las líneas de HepG2. A) Expresión de los niveles de mRNA de NR5A2 en HepG2 sin tratar (Control), infectadas con un vector vacío (pLKO-1) o con un vector que expresa shRNA para NR5A2 (NR5A2sh). B) Gel de agarosa con los resultados de A). (1) control, (2) pLKO-1, (3) NR5A2sh. Se usó la expresión del S14 como control de carga. C) Expresión del mRNA de NR5A2 total en la línea con el vector de expresión de NR5A2 (sobreexpresión) y en el control del vector de sobreexpresión (control). D) Gel de agarosa con los resultados de las PCR cuantitativas para el mRNA propio de las HepG2 (NR5A2 endógeno) y para el mRNA del NR5A2 del vector de sobreexpresión (NR5A2 exógeno). (1) HepG2 control, (2) Sobreexpresión. Se usó la expresión del mRNA de S14 como control de carga. Los valores de las gráficas son las medias de 5 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar. \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,005$ .

Los resultados (Fig.R4) mostraron que la línea infectada con los shRNA específicos para NR5A2 presentaba una disminución del 95% del mRNA de NR5A2 y que ésta

era específica del shRNA (Fig. R4. A y B). Los resultados de las PCR cuantitativas en la línea nucleofectada con el vector de expresión de NR5A2 mostraron un incremento de 4,5 veces en los niveles de mRNA de NR5A2 (Fig. R4, C). Este incremento estaba producido por la expresión del NR5A2 codificado en el vector de expresión (NR5A2 exógeno) y no por un incremento de la expresión del gen de NR5A2 (NR5A2 endógeno). No se observó expresión del NR5A2 exógeno en las muestras control (Fig. R4 D).

Como comprobación de los efectos de alterar la expresión de NR5A2, se analizó, mediante PCR cuantitativa, la expresión de dos genes diana conocidos, CYP7A1 y CYP8B1, dos enzimas que intervienen en la ruta de síntesis de sales biliares. El objetivo era comprobar si la regulación seguía el mismo sentido que el del secuenciado de RNA y si el incremento del grado de silenciamiento, en el caso de

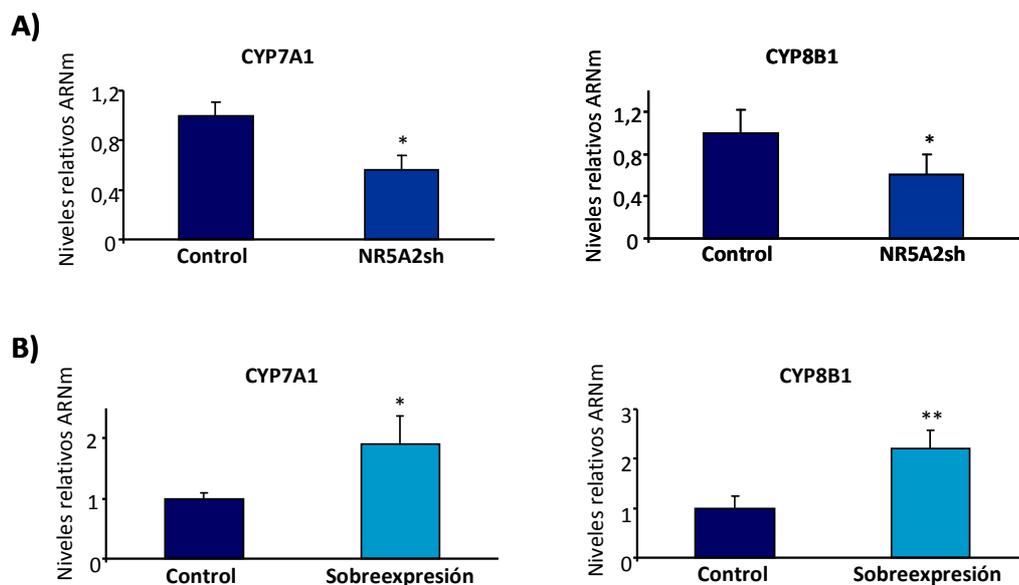


Fig. R5. Comprobación de la modificación de la expresión de NR5A2. Se utilizó la técnica de PCR cuantitativa para analizar la expresión de dos dianas conocidas de NR5A2 A) CYP7A1 y B) CYP8B1. En ambos casos se comprobó la expresión en las dos líneas, la silenciada (NR5A2sh) y la sobreexpresada. Resultados de un n=4, las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar. \*  $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ .

los shRNA, inducía un mayor efecto sobre la regulación de estas dianas. Los resultados indicaron que la regulación de CYP7A1 y CYP8B1, en estas dos líneas, iba en el mismo sentido que en el secuenciado de RNA y en lo previamente descrito en la bibliografía, ya que en HepG2 NR5A2 regula positivamente la expresión de estos dos genes (129, 136).

## Resultados

### 4.4. EFECTOS EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA.

Para comprobar el papel de NR5A2 en el metabolismo de la glucosa, se analizó la expresión de genes cuya expresión se encontraba modificada en el secuenciado de RNA y que se encuentran relacionados con éste: Los genes analizados fueron, hexoquinasa 1, *HK-1*, la subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa, *G6Pc*, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, *G6PD*, la fructosa-1,6- bisfosfatasa 1, *FBP-1*, la

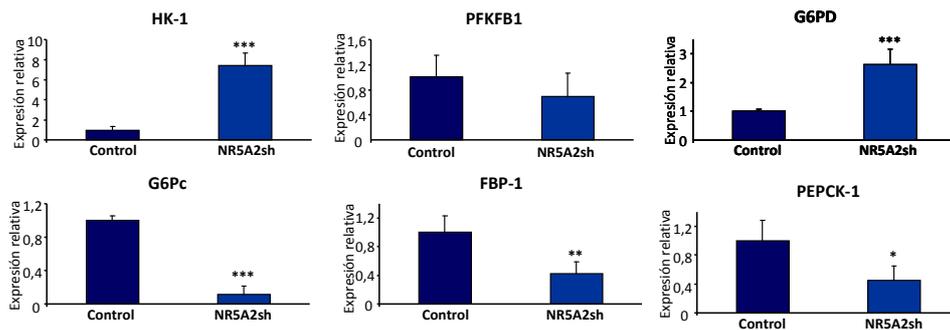


Fig.R6. Efectos del silenciamiento de NR5A2 en la expresión de genes implicados en el metabolismo de la glucosa. Se analizó por PCR cuantitativa la expresión de diferentes genes en HepG2 control (Control) o en clones con silenciamiento de NR5A2 (NR5A2sh). Las barras indicaron la expresión media de 4 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

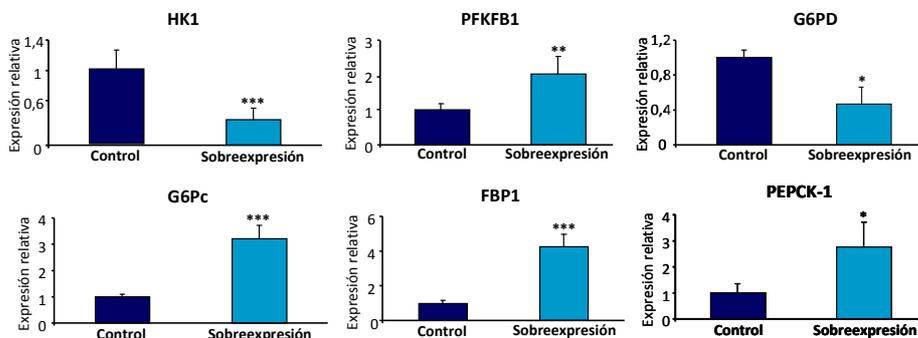


Fig.R7. Efectos de la sobreexpresión de NR5A2 en la expresión de genes implicados en el metabolismo de la glucosa. Se analizó por PCR cuantitativa la expresión de diferentes genes en HepG2 control (Control) o en clones con sobreexpresión de NR5A2 (Sobreexpresión). Las barras indicaron la expresión media de 4 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

6-fosfofructokinasa 2/fructosa-2,6-bisfosfatasa 1, *PFKFB1* y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1, *PEPCK-1*. Los resultados de los estudios de expresión, por qPCR, en las dos líneas de HepG2 confirmaron los resultados del secuenciado de RNA, salvo que en todos los casos la modificación de la expresión en las células tratadas con lentivirus fue superior, un posible efecto del mayor grado de silenciamiento en esta línea, ya que presenta 5 veces menos mRNA de NR5A2 en las células tratadas

con los lentivirus que en las tratadas en los siRNAs. NR5A2 se confirmó como un regulador positivo, en HepG2, de la expresión de *FBP1*, *G6Pc*, *PEPCK1* y *PFKFB1*. Así mismo se confirmó que NR5A2 es un represor de la expresión de *HK-1* y *G6PD* en HepG2 (Figs. R6 y R7).

### 5.5. EFECTOS EN EL METABOLISMO LIPÍDICO.

Se analizó también la expresión de tres genes asociados al metabolismo lipídico, que aparecían afectados por NR5A2 en el secuenciado de RNA. Estos tres genes fueron *FABP1*, un transportador de ácidos grasos intracelular y los factores de transcripción *PGC1A* y *PPARA*, asociados a la degradación de ácidos grasos. Además, se analizó la expresión de los genes implicados en la síntesis de ácidos grasos, *FASN*, la sintasa de ácidos grasos dependiente de NADPH y *ACC1*, el enzima limitante en la síntesis de ácidos grasos.

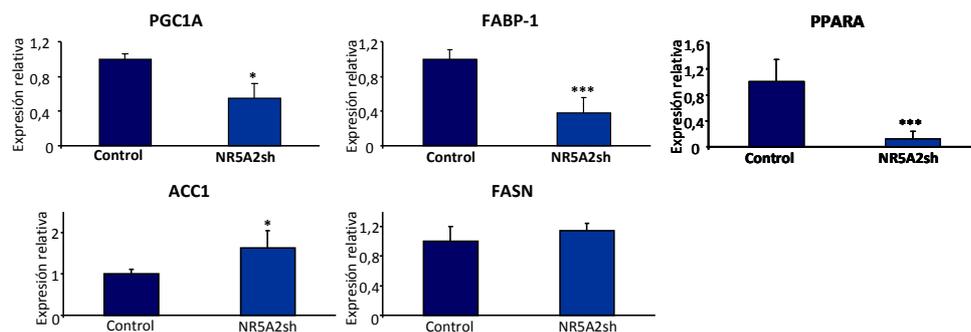


Fig.R8. Expresión de genes del metabolismo lipídico en la línea con shRNA. Se analizó por PCR cuantitativa la expresión de diferentes genes en HepG2 control (Control) o en clones con silenciamiento de NR5A2 (NR5A2sh). Las barras indicaron la expresión media de 4 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

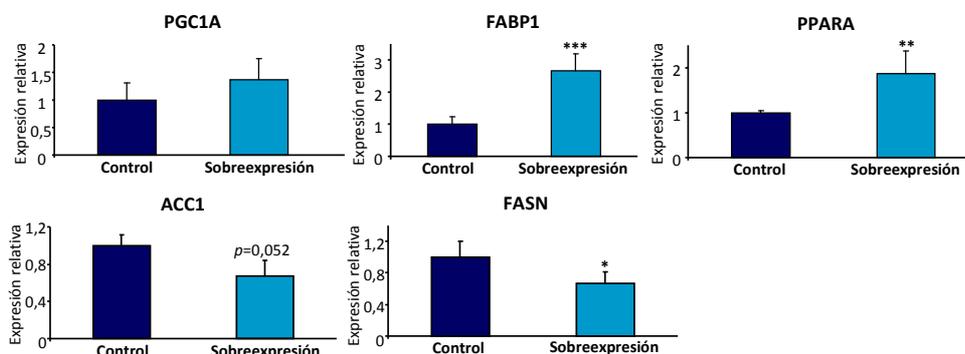


Fig.R9. Efectos de la sobreexpresión de NR5A2, en HepG2, en la expresión de los genes asociados al metabolismo lipídico. Se analizó por PCR cuantitativa la expresión de diferentes genes en HepG2 control (Control) o en clones con sobreexpresión de NR5A2 (Sobreexpresión). Las barras indicaron la expresión media de 4 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

## Resultados

Los resultados (Figs. R8 y R9), indicaron que NR5A2 regula de forma positiva y estadísticamente significativa la expresión de *PPARA*, *PGC1A* y *FABP1*. Además regula de forma negativa la expresión de *ACC1* y *FASN*.

### 5.6. EFECTOS SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA.

Dado que nuestros resultados de expresión mostraban una alteración significativa de un gran número de genes asociados al metabolismo de la glucosa, se decidió comprobar si la modificación de la expresión producía alteraciones observables en el metabolismo. Por esta razón se analizaron los cambios en el metabolismo de la glucosa, utilizando como parámetro la capacidad de eliminar glucosa del medio en las distintas líneas de HepG2.

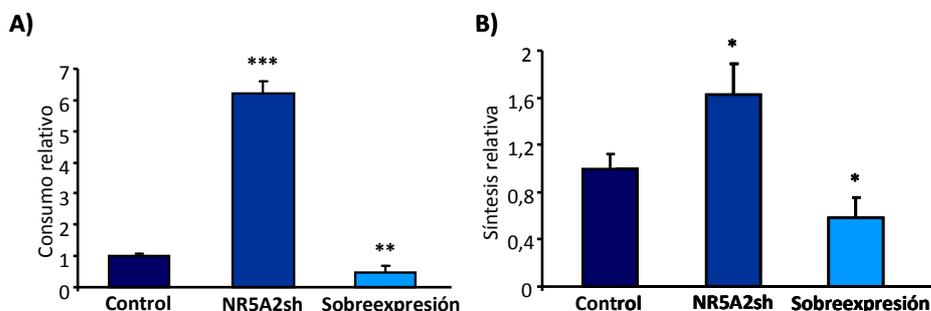


Fig. R10. A) Consumo de glucosa en las distintas líneas de HepG2. HepG2 control (control), con silenciamiento de NR5A2 (NR5A2sh) o con incremento de expresión (sobreexpresión). Se normalizaron los datos por número de células. B) Síntesis relativa de TAG. Se midió la incorporación de [<sup>3</sup>H]-glicerol en TAG y se normalizó por la cantidad de proteína en las distintas líneas de HepG2, HepG2 control (control), con silenciamiento de NR5A2 (NR5A2sh) o con incremento de expresión (sobreexpresión). En ambos experimentos se representa el valor medio de 4 experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar. Valores \*\* $p \leq 0,01$  \*\*\* $p \leq 0,005$ .

Los resultados (Fig. R10 A) mostraron que se producía un incremento, estadísticamente significativo, en la línea con NR5A2 silenciado. En la línea con sobreexpresión de NR5A2 se observó el resultado opuesto, un descenso estadísticamente significativo de la eliminación de glucosa del medio.

### 4.7. EFECTOS SOBRE LA SÍNTESIS DE TAG.

De forma complementaria, se estudió el efecto de la expresión de NR5A2 en la síntesis de TAG (triacilglicéridos), en las mismas líneas de HepG2 empleadas para el estudio del consumo de glucosa. Los resultados (Fig. R10 B), mostraron que la línea

con silenciamiento de NR5A2 presentaba un incremento, estadísticamente significativo, de la síntesis de TAG respecto a las células control. Por contra, la línea con sobreexpresión presentaba una disminución, estadísticamente significativa de la misma.

#### 4.8. EFECTO DEL DLPC EN LA ACTIVIDAD DE NR5A2.

En 2011, Lee y cols. describieron el DLPC como un agonista sintético y específico de NR5A2 (117). En ratones, el DLPC inducía una disminución de los niveles de glucosa en sangre, sin embargo no alteraba la expresión de los enzimas hepáticos asociados. Se comprobó si el efecto del DLPC era equivalente a la sobreexpresión de NR5A2, y por tanto si se podían comparar los resultados de ambos modelos. El análisis del efecto del DLPC en la expresión de *CYP7A1* y *CYP8B1*, mostraba que se producía un incremento estadísticamente significativo de la expresión en ambos, lo que sugería que el tratamiento con DLPC tenía un efecto similar al de la sobreexpresión de NR5A2 (Fig. R11 A).

Este incremento parecía ser dependiente de NR5A2, ya que el DLPC no tenía efecto en la línea con silenciamiento de NR5A2 (Fig.R10 A). Además, este efecto no se debía a una modificación de la expresión de *NR5A2*, ya que el DLPC no inducía una modificación de los niveles de su mRNA (fig.R11 B).

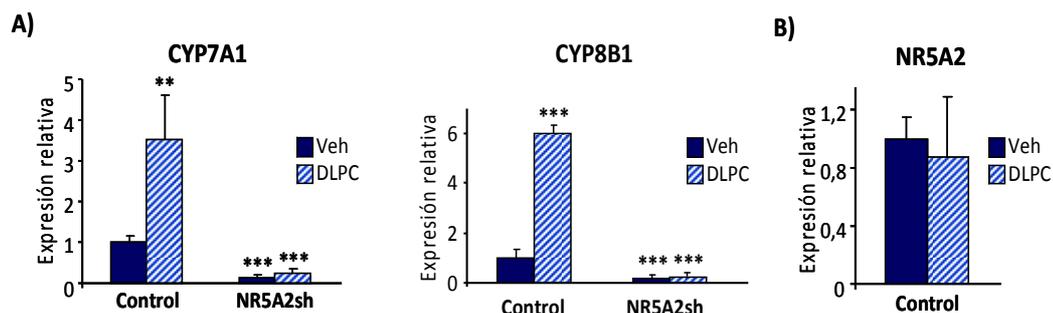


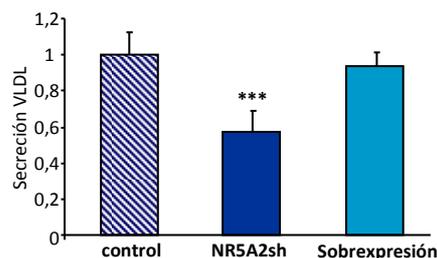
Fig. R11. Efecto del DLPC sobre NR5A2. Tras tratar durante 48h con DLPC a una dosis de 100µM (DLPC) o con el vehículo (Veh). A) Análisis por PCR cuantitativa de la expresión de *CYP7A1* y *CYP8B1* en HegG2 control (control) y con silenciamiento de NR5A2 (NR5A2sh). B) Efecto del tratamiento con DLPC sobre la expresión de NR5A2. Las barras mostraron la media de 4 experimentos independientes  $\pm$  Desviación estándar. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ .

## Resultados

### 4.9. EFECTO EN LA SECRECIÓN DE VLDL.

Como el hígado empaqueta los TAG sintetizados en las lipoproteínas VLDL para su secreción, se analizó la secreción de VLDL en las distintas líneas con expresión de NR5A2 modificada. Para ello se realizó un ELISA contra APOB, el componente mayoritario de las VLDL. Los resultados del ELISA (Fig.R12) mostraron que en las HepG2 sin expresión de NR5A2 había una disminución de los niveles de APOB estadísticamente significativa. Por contra, la sobreexpresión no producía ninguna variación en los niveles de VLDL.

Fig.R12. Medición de la secreción de VLDL, mediante un ELISA de APOB, en HepG2 con el vector vacío (control), con silenciamiento de NR5A2 (NR5A2sh) y con sobreexpresión de NR5A2 (sobreexpresión). Las barras mostraron el valor medio  $\pm$  Desviación estándar de 4 experimentos independientes \*\*\* $p \leq 0,005$ . Los resultados se normalizaron con la cantidad de proteína.



## EXPERIMENTOS EN C2C12

### 4.10. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NR5A2 EN C2C12.

Dado que el músculo es otro tejido de gran importancia para el metabolismo energético y el desarrollo de la resistencia a insulina, decidimos estudiar los efectos de NR5A2 sobre éste. Para ello se empleó como modelo la línea celular C2C12, una línea derivada de fibroblastos de ratón con capacidad de diferenciación a miotubos.

Debido a que aunque existía un estudio previo modelo de Pez Cebra (125), pero no existían estudios previos de expresión de nr5a2 en músculo o en modelos musculares de ratón, como primer paso se estudió si C2C12 presentaba expresión de *Nr5a2*. Los resultados de expresión (Fig.R13 A) indicaron que en células C2C12 indiferenciadas no hay expresión de *Nr5a2*. La expresión de *Nr5a2* se indujo durante la diferenciación incrementándose su expresión a lo largo de ésta (Fig.R13 A).

Inicialmente se trato de utilizar el mismo modelo de estudio que en HepG2, estableciendo una línea de C2C12 con silenciamiento de la expresión de *Nr5a2*. Sin embargo la tratar de diferenciar esta línea se observó que había una disminución en la inducción del marcador de diferenciación, miogenina (*Myog*) (Fig.R13 B). También se observó un menor número de fibras diferenciadas y de menor tamaño (Fig.R13 C). Dado que los resultados indicaban que el silenciamiento de *Nr5a2* un efecto sobre la diferenciación, se utilizó como modelo alternativo el tratamiento con DLPC en miotubos ya diferenciados. El análisis del efecto del DLPC

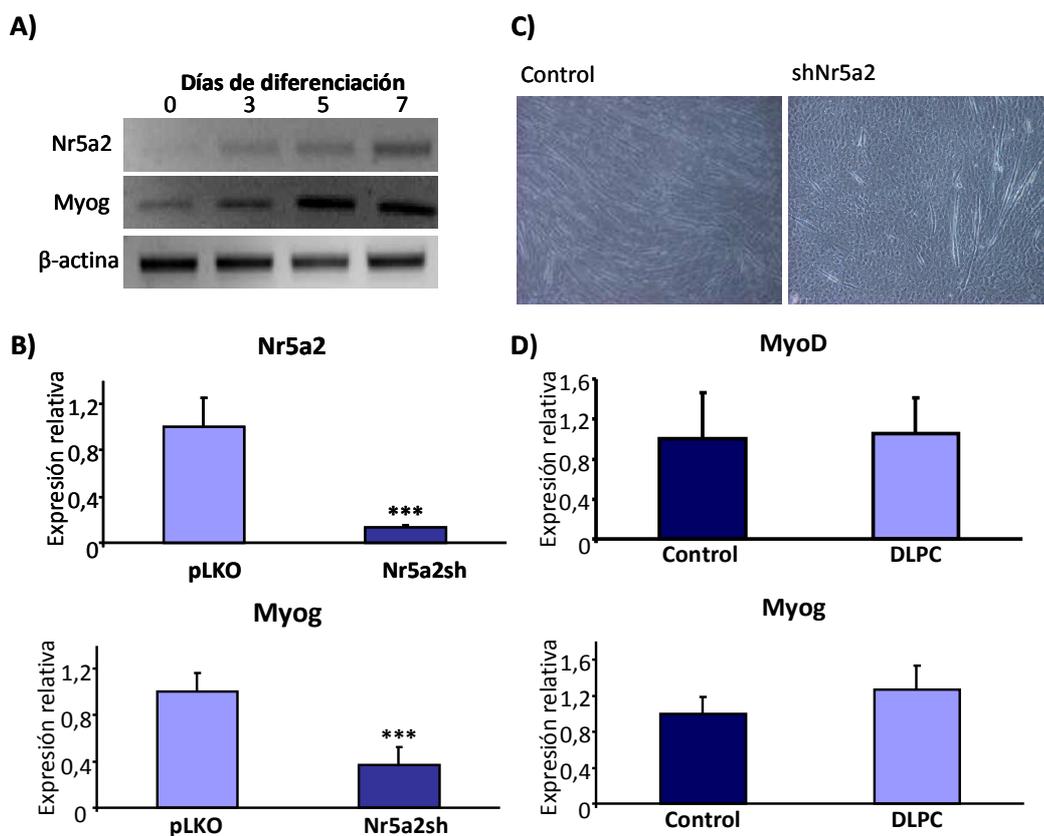


Fig.R13. Efecto de NR5A2 en la diferenciación de C2C12. A) Caracterización de la expresión de C2C12 a distintos estadios de la diferenciación, desde sin diferenciar (0 días) a completamente diferenciadas (7 días). Se empleó la expresión de *Myog* como marcador de diferenciación. Como control de carga se utilizó la expresión de la  $\beta$ -actina. B) Análisis de la expresión de *Nr5a2* y *Myog* en células infectadas con un vector vacío (pLKO) y uno con shRNAs contra *Nr5a2* (Nr5a2sh) tras 7 días de diferenciación. c) Fotografías a 20x de las células analizadas en B). D) Expresión de *Myog* y *MyoD*, en C2C12 diferenciadas, tratadas durante 24h con DLPC 100 $\mu$ M. Los resultados mostraron el valor medio  $\pm$  Desviación estándar de n=4. \*p $\leq$ 0,05, \*\*p $\leq$ 0,01, \*\*\*p $\leq$ 0,005.

en la expresión de los marcadores de diferenciación *Myog* y *MyoD* (proteína 1 de diferenciación miogénica) (Fig.R13 D), mostró que en C2C12 ya diferenciadas, el tratamiento con DLPC no produce variación en la expresión de *Myog*, asociado a la

## Resultados

diferenciación a miotubo en C2C12 y *MyoD*, asociado a la diferenciación a miotubos en C2C12 y a la transición del tipo de fibra muscular (181).

### 4.11. EFECTO EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA.

Se comprobó la expresión de los principales genes asociados a la glucólisis, la hexoquinasa 2 (*HK2*) y la 6-fosfofructokinasa 2/fructosa-2,6-bisfosfatasa 1 (*PFKFB1*). De los genes de la glucogenogénesis, la glucógeno sintasa muscular (*Gys1*) y la glucógeno fosforilasa muscular (*pGym*). Por último, se analizó la expresión de *Glut4*, el principal transportador de glucosa en músculo. Los resultados (Fig.R14) indicaron que la activación de NR5A2, induce un incremento de la expresión de los genes mencionados de forma estadísticamente significativa.

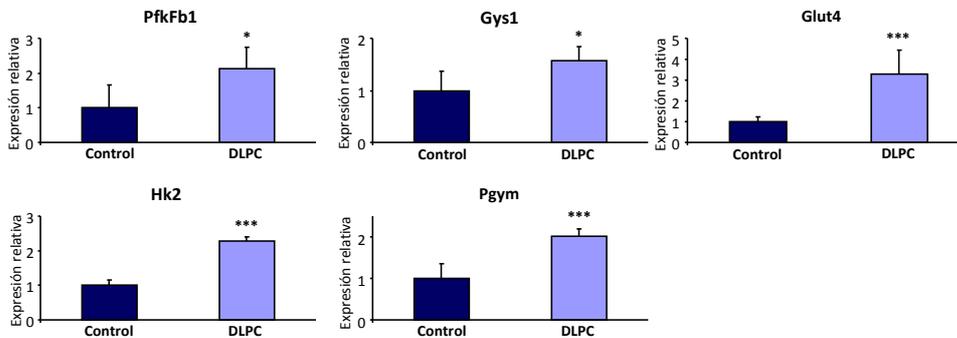


Fig. R14. Efecto de la activación de NR5A2 en genes del metabolismo de la glucosa. Se analizó la expresión de mRNA por qPCR, en C2C12 diferenciadas 7 días (Control) y de C2C12 diferenciadas 7 días y tratadas durante 24h con DLPC 100µM (DLPC). Las barras mostraron el valor medio  $\pm$  Desviación estándar de n=4. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,005$ .

#### 4.11.1. EFECTO EN EL CONSUMO DE GLUCOSA.

Como la expresión de distintos genes asociados al metabolismo de la glucosa estaban afectados, se estudió el consumo de glucosa en células tratadas con DLPC. También se estudió el efecto con insulina para comprobar si como se postulaba en el artículo de Lee y cols. (117) existía una sinergia con ésta o una sensibilización a insulina en las células tratadas con DLPC. Los resultados (Fig.R15) del consumo durante 24h, mostraron que existe un mayor consumo en células tratadas con DLPC y/o insulina. También mostraron que el tratamiento conjunto de DLPC e insulina induce un incremento del consumo respecto a las células tratadas sólo con

DLPC o con insulina, sin embargo, al analizarlo estadísticamente, este incremento resultó no ser significativo.

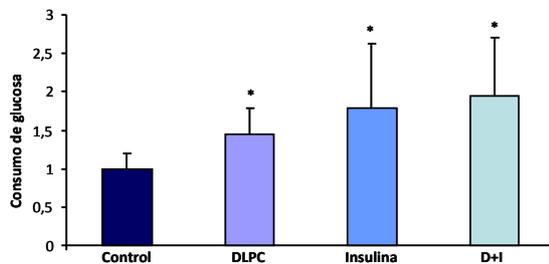


Fig. R15. Consumo de glucosa en C2C12. Se analizó el consumo de glucosa relativo en células diferenciadas durante 7 días, tras lo que se trataron durante 24 horas con medio suplementado con el vehículo (control), DLPC 100 $\mu$ M (DLPC), insulina 100nM o ambos (D+I). Las barras mostraron el valor medio  $\pm$  Desviación estándar de n=4. \*p $\leq$ 0,05.

#### 4.12. EFECTO EN EL METABOLISMO LIPÍDICO.

Para comprobar si existía algún efecto sobre el metabolismo lipídico fue analizada la expresión de diversos genes implicados en el mismo. Que incluían genes implicados en la entrada de lípidos en la célula, el receptor de vldl (*Vldlr*), la lipoproteinlipasa (*Lpl*) y la proteína de unión a ácidos grasos muscular (*Fabp3*). Además se analizaron genes asociados al transporte de lípidos a la mitocondria, las carnitil-palmitoil transferasas, *Cpt1b* y *Cpt2*, y su regulador la acetil CoA carboxilasa 2 (*Acc2*).

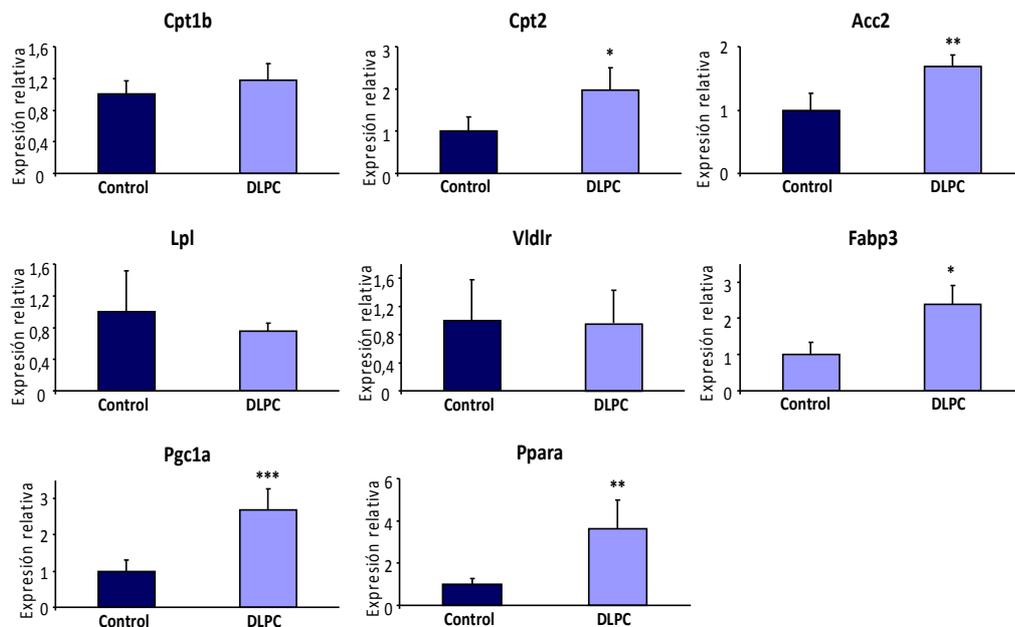


Fig. R16. Efecto de la activación de NR5A2 en genes del metabolismo lipídico. Se analizó la expresión por qPCR de C2C12 diferenciadas 7 días y tratadas durante 24h con el vehículo (control) o con DLPC 100 $\mu$ M (DLPC). Las barras mostraron el valor medio  $\pm$  Desviación estándar de n=4. \*p $\leq$ 0,05, \*\*p $\leq$ 0,01, \*\*\*p $\leq$ 0,005.

## Resultados

También fue analizada la expresión de dos factores de transcripción asociados al metabolismo lipídico, *Pgc1a* y *Ppara*, cuya expresión habíamos encontrado alterada en las líneas de HepG2, al modificar los niveles de NR5A2. Los resultados (Fig.R16) mostraron que NR5A2 regulaba positivamente, de forma significativa, la expresión de *Acc2*, *Cpt2*, *Fabp3*, *Pgc1a* y *Ppara*. No se observaron variaciones en la expresión de *Cpt1b*, *Lpl* y *Vldlr*.

### 4.12.1. EFECTO EN LA DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.

Para comprobar si la variación de la expresión, anteriormente mostrada, tenía algún efecto funcional en la capacidad de degradar lípidos se estudió el efecto de NR5A2 sobre la lipólisis. Además se volvió a comprobar si existía alguna sinergia entre la NR5A2 y la acción de la insulina. Los resultados (Fig. R17 A) mostraron que tanto la insulina como el DLPC inducen una disminución sobre el consumo del Oleil-1-<sup>14</sup>C-CoA. El descenso de la lipólisis por DLPC aumentaba al tratar las células con insulina y DLPC, sin embargo este descenso no es estadísticamente significativo respecto al de las células tratadas con DLPC o insulina.

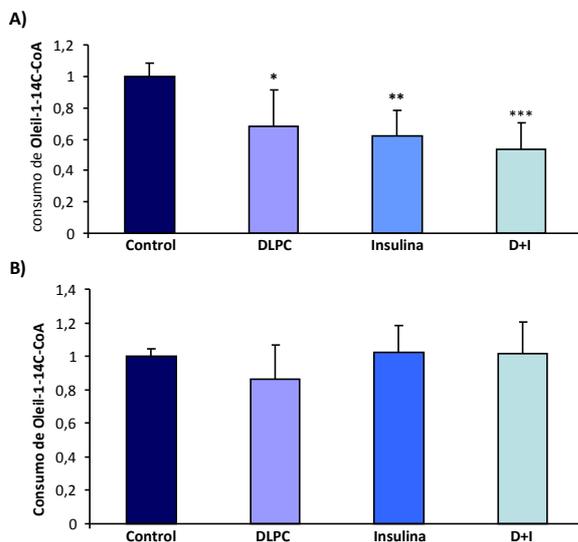


Fig. R17. Degradación de Oleil-1-<sup>14</sup>C-CoA a 25mM de glucosa A) y 3,125mM de glucosa B). C2C12 diferenciadas 7 días fueron tratadas, durante 24h, con DLPC 100µM (DLPC), insulina 100nM (Insulina) o ambas (D+I). Las barras representan la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> media ± desviación estándar de n=4. \*p≤0,05, \*\*p≤0,01, \*\*\*p≤0,005.

Dado que el experimento se realizó en una alta concentración de glucosa (25mM), se repitió el experimento a baja concentración (3,125mM) para comprobar si el efecto sobre la degradación de ácidos grasos se debía directamente a NR5A2 o era una consecuencia del mayor consumo de glucosa inducido por éste. Los resultados (Fig.R17 B) mostraban que en bajas concentración de glucosa no existía efecto sobre la lipólisis.





## DISCUSIÓN

*“No se puede desatar un nudo sin saber  
cómo está hecho.”*

-Aristóteles.



## 5. DISCUSIÓN.

NR5A2 es un receptor nuclear involucrado en transporte reverso de colesterol (140-143), esteroidogénesis (133, 134, 144), síntesis de sales biliares (129, 136) , proliferación (124, 151), diferenciación (116, 125, 159, 160) , mantenimiento de la pluripotencia (156-158), antiinflamatorio (162-171) y recientemente, se le ha implicado en el metabolismo de la glucosa y lípidos en ratones (117, 173).

En un estudio previo, el SNP rs2816948, localizado en el promotor de *NR5A2*, mostró asociación con IMC. Aunque este resultado no se replicó en otras cohortes, se encontraron otros SNPs del gen asociados con IMC, lo que parecía sugerir que *NR5A2* podía estar ligado a IMC. Los resultados de los retardos en gel (Fig. R2 A) indicaron que la sonda que porta el alelo C tiene una mayor capacidad de unión a la proteína. Sin embargo no se observó un cambio del patrón de bandas, a diferencia de lo que predecían los programas bioinformáticos. Los resultados de los ensayos de actividad luciferasa (Fig. R2 B) mostraron que el alelo C da más actividad luciferasa que alelo G. Tomando conjuntamente ambos resultados el SNP rs2816948 es funcional y se encuentra en un sitio de regulación positiva. Los resultados del análisis bioinformático (Tabla R3), muestran distintas posibilidades de unión a la secuencia empleada para el ensayo EMSA. NFE2 es un factor de transcripción asociado a hematopoyesis, pero no se ha descrito que se exprese en hígado. Otros factores de transcripción con posibilidad de unirse a la secuencia son ATF3 y JunD dos componentes del heterodímero AP-1. Sin embargo, serán necesarios estudios adicionales para comprobar si alguno de estos factores de transcripción es el que se une a la secuencia.

Los resultados del secuenciado de RNA indican que *NR5A2* es un regulador de la expresión de genes asociados al metabolismo de la glucosa y de lípidos (Tabla R4). No obstante existen diferencias entre los genes regulados por *NR5A2* en HepG2 y en los modelos de ratón previos (117, 173), ya que hay genes cuya expresión está regulada por *NR5A2* en ratón que no aparecen en el secuenciado de RNA y viceversa. Aunque desconocemos la razón de estas diferencias, podrían deberse a los diferentes modelos utilizados en los estudios. Además hay que tener en cuenta que el nivel de expresión residual de *NR5A2* de nuestro modelo (25%) podría ser

## Discusión

suficientemente elevado para impedir detectar todos los genes cuya expresión se encuentra regulada, directa o indirectamente, por NR5A2.

Los resultados de los análisis de expresión en HepG2 indican que NR5A2 regula negativamente genes asociados al consumo de glucosa (*HK-1* y *G6PD*) (Figs. R6 y R7). Estos resultados estarían de acuerdo con los del análisis del consumo de glucosa (Fig.R10 A), en los que se observa una relación inversa entre los niveles de NR5A2 y disminución de glucosa del medio. Recientemente Lee y cols. (117), en aparente contradicción con nuestros resultados, han demostrado que la activación de NR5A2 por DLPC induce una disminución de los niveles de glucosa plasmáticos y un aumento de su degradación hepática. Sin descartar que las diferencias sean consecuencia de los diferentes modelos utilizados, la contradicción es más aparente que real ya que en ambos modelos coinciden en que la activación de NR5A2 induce una disminución de la síntesis de ácidos grasos, lo que si está de acuerdo con nuestros resultados que demuestran la existencia de una relación inversa entre la expresión de *NR5A2* y la de *G6PD* (Figs. R6 y R7), el enzima regulador de la ruta de las pentosas fosfato. El incremento de NR5A2 induciría un descenso de expresión de *G6PD*, lo que produciría una menor producción de NADPH, necesario para la síntesis de ácidos grasos por el producto del gen *FASN*. Además se ha descrito que el incremento de expresión de *G6PD*, en ratón, induce resistencia a insulina asociada a obesidad (182). El incremento de *G6PD* también podría indicar un incremento del flujo de glucosa hacia la ruta de las pentosas fosfato, lo que supondría un incremento de los niveles de NADPH, asociado a la lipogénesis.

Por otra parte, resulta interesante que NR5A2 regule de forma positiva los genes de la gluconeogénesis, *G6Pc*, *FBP1* y *PEPCK1* (Figs. R6 y R7), ya que el incremento de la gluconeogénesis por SREBP-1c se ha asociado a la resistencia a insulina. La regulación de la gluconeogénesis por NR5A2 es un hecho controvertido ya que mientras en el ya mencionado modelo de Lee y cols. (117) la activación de NR5A2 disminuye la gluconeogénesis, en el de Osterveer y cols. (173) el silenciamiento de *NR5A2* induce su disminución de la gluconeogénesis. Además, dada la regulación simultánea de gluconeogénesis y glucólisis, la inducción de NR5A2 podría resultar más en una disminución de esta última que en una inducción de la primera, algo

que nuestros experimentos de consumo de glucosa no permiten distinguir. Además del aumento de la gluconeogénesis, el factor de transcripción SREBP-1c participa en la regulación de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, en respuesta a insulina (183). La expresión de SREBP-1c, un factor de transcripción cuya inducción podría dar lugar al denominado ciclo de Mc Garry y a un aumento de la resistencia a insulina (184), está reprimida por NR5A2 (185). Todo esto parece sugerir que la inducción de gluconeogénesis observada podría ser la consecuencia del aumento de la lipólisis, que a su vez podría estar inducida por el aumento de expresión de PPAR $\alpha$ , cuyo silenciamiento da lugar a descensos de la  $\beta$ -oxidación y de la gluconeogénesis (186).

Contrariamente a las controversias sobre el papel de NR5A2 en el metabolismo de glúcidos, su papel en el metabolismo de lípidos parece mucho más claro. Nuestros resultados indican que NR5A2 es un represor de la expresión de *FASN* y *ACC1* (Figs. R8 y R9), los principales enzimas de la síntesis de ácidos grasos. Además *FAS* es un enzima dependiente de NADPH y, en nuestros resultados, NR5A2 es un represor de la expresión de *G6PD*, el enzima que reduce el NADP<sup>+</sup> a NADPH para la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Tomando estos resultados conjuntamente parecen indicar que NR5A2 es un represor de la lipogénesis en HepG2. Esta no es la única conexión de la ruta de las pentosas fosfato con la lipogénesis, ya que el posible aumento de la ruta de las pentosas fosfato por silenciamiento de NR5A2, podría implicar un incremento de los niveles de xilulosa 5-fosfato. Este compuesto es, junto con G6P, un activador de ChREBP cuya activación está relacionada con el incremento de la lipogénesis (187). Nuestros resultados de expresión están apoyado por la represión de la síntesis de TAG por NR5A2 (Fig.R10) y tomados en conjunto con los ya mencionados resultados de expresión estarían de acuerdo la reducción de la lipogénesis inducida por activación de NR5A2 observados Lee y cols. (117). Por otra parte la variación de los niveles de NR5A2, en HepG2, no parecen modificar la secreción de VLDL (Fig.R11), sino que en el caso de los clones silenciados, que presentan una mayor síntesis de TAG, hay una disminución de la secreción de VLDL. Estos resultados, de mayor síntesis de TAG y menor secreción de VLDL parecen sugerir que, en nuestro modelo, la disminución de NR5A2 induciría un incremento de la acumulación de TAG en el hígado.

## Discusión

La acumulación de ácidos grasos, especialmente TAG, en el hígado es uno de los principales factores asociados al desarrollo de la esteatosis y de la resistencia a insulina en hígado(22, 46, 184, 188). NR5A2 ya se ha descrito como protector contra la esteatosis y la resistencia a insulina al disminuir la acumulación de lípidos en el hígado (117). De acuerdo con nuestros resultados de expresión la disminución de la esteatosis podrían atribuirse, en parte, a la disminución de la expresión de *PPAR $\alpha$*  y *PGC1 $\alpha$*  (Fig.R6), genes que ya han sido propuestos como posibles antiesteatógenos, y cuyo aumento de expresión se ha asociado a un descenso de la acumulación de ácidos grasos en el hígado y a un menor desarrollo de la esteatosis (189-191). Los resultados del secuenciado fueron confirmados por qPCR, lo que indica que NR5A2 es un activador, directo o indirecto, de su expresión en HepG2. Además está en consonancia con la disminución de los niveles de TAG y ácidos grasos en hígado, tras el tratamiento con DLPC, que se observa en el modelo de Lee y cols. (117).

En un artículo publicado en 1963, Randle y cols. postularon la existencia de una inhibición mutua entre la lipólisis y la glucólisis por la producción de inhibidores alostéricos (192). Esta regulación cruzada ha llevado a sugerir que los cambios observados en metabolismo de la glucosa en enfermedades como la obesidad o la diabetes, son en realidad una consecuencia del alteración del metabolismo lipídico (193). Así, la disminución del consumo de glucosa en los clones con sobreexpresión podría ser consecuencia de un incremento del consumo de ácidos grasos, ya que el incremento de la lipólisis aumentaría la concentración de citrato en el citoplasma, un inhibidor alostérico de la glucólisis. Esta hipótesis se apoya en que NR5A2 regula de forma positiva la expresión de *FABP1*, *PPAR $\alpha$*  y *PGC1 $\alpha$* , tres genes asociados al consumo y movilización de ácidos grasos en el hígado (190, 194-196). De producirse el incremento de la lipólisis, como consecuencia se incrementarían los niveles de acetil-CoA y citrato, dos activadores de la gluconeogénesis. El citrato es además un inhibidor alostérico de la glucólisis. Este incremento de la lipólisis reforzaría el papel de NR5A2 como protector contra la acumulación de lípidos en el hígado.

Se ha sugerido recientemente que la activación de NR5A2 podría favorecer la interrupción del denominado ciclo de Mc Garry (184) (Fig.D1 A), en el que el estado

de hiperinsulinemia induciría una redirección de glucosa al hígado, y como consecuencia aumentando la lipogénesis hepática por SREBP-1c. La lipogénesis a su vez, podría inducir un incremento de la liberación de VLDL, favoreciendo que el músculo utilice ácidos grasos como fuente principal de energía, lo que podría resultar en una menor utilización de glucosa. Al ser el músculo el principal tejido encargado en retirar glucosa de la sangre, la concentración de ésta se mantendrá alta, dando lugar a una continuada liberación de insulina por el páncreas, que en consecuencia produciría una disminución de la sensibilidad a insulina (193). Nuestros resultados concuerdan con esta hipótesis, ya que de acuerdo con ellos NR5A2 disminuiría la lipogénesis hepática, al oponerse a la acción de SREBP-1c, el factor de transcripción asociado al incremento de la lipogénesis en el ciclo de Mc Garry (184). Además sugiere que los cambios observados en el metabolismo de la glucosa podrían ser una consecuencia de la modificación del metabolismo de lípidos (193). Tomando los resultados del metabolismo de lípidos y glucosa conjuntamente parecen indicar que NR5A2 reprimiría la síntesis y la acumulación de ácidos grasos en el hígado. Así mismo, unos menores niveles de NR5A2 estarían asociados al incremento de la síntesis y la acumulación de ácidos grasos, especialmente TAG, en el hígado. Esta acumulación es el paso crítico para el desarrollo de la esteatosis y de la resistencia a insulina hepática, que tendrá como consecuencia el NAFLD y la DMT2 (188). Además, estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Lee y cols. (117), donde la activación de NR5A2 induce una disminución de la acumulación de lípidos en el hígado y en sangre. De ser así NR5A2 podría convertirse en una diana en el tratamiento de la NAFLD y la DMT2 al prevenir la esteatosis (188).

El papel de NR5A2 en el músculo apenas ha sido estudiado. Los estudios del papel de *ff1*, el homólogo de NR5A2 en pez cebra, muestran que induce la diferenciación, la organización y la transición de fibras musculares(125) . En C2C12 NR5A2 no se expresa en células no diferenciadas, sino que su expresión se da durante la diferenciación (Fig.R13 A). De forma similar a *ff1*, NR5A2 parece ser necesario para la completa diferenciación a miotubos, ya que los resultados en la diferenciación de C2C12 indican una función similar a *ff1*, las células con expresión silenciada de NR5A2 presentan una expresión disminuida de *Myog* (Fig.R13 B) y diferenciación morfológica parcial (Fig.R13 C). El DLPC induce la expresión de *Pgc1a*, un gen cuya

## Discusión

expresión se ha asociado diferenciación y a transición del tipo de fibra en C2C12 (197). Sin embargo, la adición de DLPC a C2C12 ya diferenciadas no altera la expresión de *Myog*, lo que parece indicar que no hay una mayor tasa de diferenciación. Tampoco altera la expresión de *MyoD* (Fig.R13 D), cuya expresión se ve alterada en los cambios en el tipo de fibra (181). Todo esto sugiere que los cambios observados en las células tratadas con DLPC no se deberían a cambios en la diferenciación.

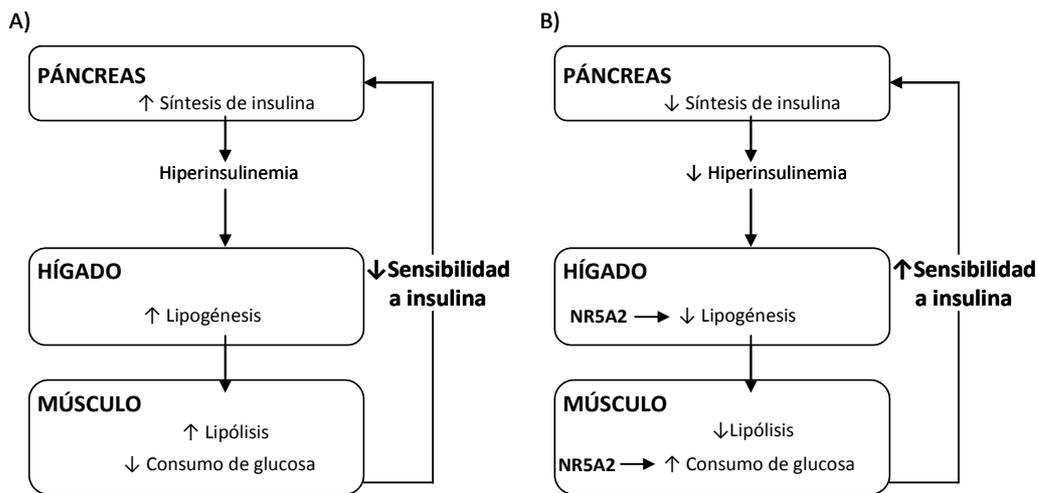


Fig.D1. Efecto de NR5A2 en el ciclo de Mc Garry. A) Ciclo de Mac Garry. B) Posible mecanismo de NR5A2 contra el desarrollo de la resistencia a insulina. NR5A2 inhibe la síntesis de ácidos grasos y TAG en el hígado, lo que bajaría los niveles de ácidos grasos circulantes. Así mismo, favorece la captación y consumo de glucosa por el músculo, lo que reduciría los niveles de glucosa en sangre. Este descenso revertiría el estado de hiperinsulinemia, aumentando la sensibilidad a insulina. Figura adaptada de (193).

La DMT2 es una enfermedad multifactorial, consecuencia de la resistencia a insulina. En la patogénesis de la DMT2 se produce una resistencia a insulina hepática, que a su vez induce resistencia a insulina muscular. La resistencia a insulina muscular resulta en una disminución de la retirada de glucosa de la sangre teniendo, como consecuencia, la inducción de un estado de hiperinsulinemia. Este estado de hiperinsulinemia es crítico en el desarrollo de la DMT2 y la NAFLD, al inducir el denominado ciclo de Mc Garry (188, 193). En el músculo se han asociado dos factores al desarrollo de la resistencia a insulina. Uno de estos factores es el incremento del contenido de ácidos grasos, aunque en varios modelos se ha encontrado que no existe relación entre los niveles de lípidos en músculo con la resistencia a insulina (198, 199). El otro factor que se ha asociado es disminución de la capacidad de retirar glucosa en sangre del músculo (200-202).

La activación de NR5A2 en C2C12 diferenciadas produce un incremento de la expresión de genes asociados tanto de la glucogenolisis como de la glucogenogénesis (Fig.R14). NR5A2 activa la expresión de *Gys1*, asociado a la síntesis de glucógeno, y de *pGym*, asociado a su degradación. La inducción simultánea de las dos vías podría indicar la existencia de un ciclo fútil, cuya función podría ser aumentar la disponibilidad de glucosa para la célula.

Lee y cols. (117) observaron que el tratamiento con DLPC disminuye los niveles de glucosa en sangre sin modificación de los niveles de enzimas hepáticas asociadas a la glucólisis. Nuestro modelo de C2C12 justificaría esta observación, ya que el tratamiento con DLPC induce un incremento de los niveles de *glut4* (fig.R14), cuya expresión, en músculo, se ha asociado a la protección contra la resistencia a insulina (201). De no ser directo, este incremento podría deberse al incremento de la expresión de *Ppara* (189) y *Pgc1a* (202), dos activadores de su expresión. Además el tratamiento con DLPC induce una mayor retirada de glucosa del medio (Fig.R15). Este consumo aumentado de glucosa por el músculo podría compensar el incremento de la gluconeogénesis y liberación de glucosa que parecen indicar los resultados de expresión en HepG2 y por lo tanto dar lugar a una disminución de los niveles de glucosa sanguínea. Además los resultados de expresión de la *Hk2* (fig.R14) parecen sugerir un incremento del flujo glucolítico, acorde con los de los análisis del consumo de glucosa y de ácidos grasos. Es necesario hacer notar que el aumento de la expresión de *Hk2* podría no deberse a un efecto directo de NR5A2, sino a efecto del incremento de la entrada de glucosa (203).

El tratamiento de DLPC e insulina no induce un aumento significativo del consumo de glucosa (Fig.R15), lo que parece estar en contradicción con Lee y cols. (117) que concluyen que NR5A2 induciría un incremento de la sensibilidad a insulina. Que el DLPC aumente el consumo de glucosa en ausencia de insulina podría indicar que está regulando la expresión de otros transportadores de glucosa independientes de insulina. Este aumento del consumo no dependiente de insulina funcionaría como un mecanismo de protección contra la esteatosis y la DMT2 al prevenir la hiperinsulinemia (188). Así, aunque nuestros resultados en C2C12 apoyan los resultados obtenidos en HepG2 y la hipótesis de que NR5A2 disruptora el ciclo de

## Discusión

Mc Garry (184) de ellos no puede concluirse si este efecto se debe a un incremento de la sensibilidad a insulina o a un mecanismo independiente.

El incremento del consumo de ácidos grasos se ha asociado a la resistencia muscular a insulina. El DLPC induce una disminución del mismo (Fig.R17 A), lo que está en consonancia con el aumento de *Acc2* (Fig.R16). Aunque a primera vista resulte contradictorio con el incremento de expresión de *Ppara* y *Pgc1a* (Fig.R16), que inducen un incremento de la lipólisis (191) (185,190), podría explicarse con facilidad como una consecuencia del incremento de disponibilidad de glucosa, lo que induciría la disminución de la lipólisis según se postula en el ciclo de Randle (192) y de esta forma explicaría por qué esta reducción desaparece al disminuir la concentración de glucosa a condiciones de hipoglucemia (Fig.R17 B). El que no exista una disminución de la expresión de genes asociados a la captación de ácidos grasos, *Lpl* y *Vldlr*, ni a la lanzadera de carnitina, *Cpt1b* y *Cpt2* (Fig.R15), parece indicar que la capacidad de captación y degradación de ácidos grasos no se ve disminuida por la activación de NR5A2. Aunque la insulina tiene el mismo efecto inhibiendo la degradación de ácidos grasos (Fig.R17 A), éste parece que no es sinérgico con la activación de NR5A2.

Los resultados sobre consumo de glucosa y ácidos grasos en C2C12, junto con el efecto no sinérgico con la insulina parece sugerir un posible cambio en la preferencia de sustrato. De ser así, la activación de NR5A2 predispondría a las células al consumo de glucosa sobre el de ácidos grasos, aunque este cambio desaparecería en condiciones de baja concentración de glucosa. Dado que la mayor capacidad de consumir glucosa en el músculo se ha asociado a un descenso de la resistencia a insulina, esta hipótesis cuadraría con los resultados obtenidos en HepG2. Además otra posible explicación para el efecto no sinérgico de la insulina y el DLPC, es que la insulina podría inducir la activación de NR5A2, por lo que la adición de ambos resultaría redundante.

Tomando conjuntamente los resultados en HepG2 y C2C12 se puede establecer un modelo metabólico (Fig.D2). En este modelo NR5A2, en hígado, induciría una disminución de la síntesis y acumulación de ácidos grasos. En músculo NR5A2 induciría un incremento del consumo de glucosa. Este incremento del consumo de

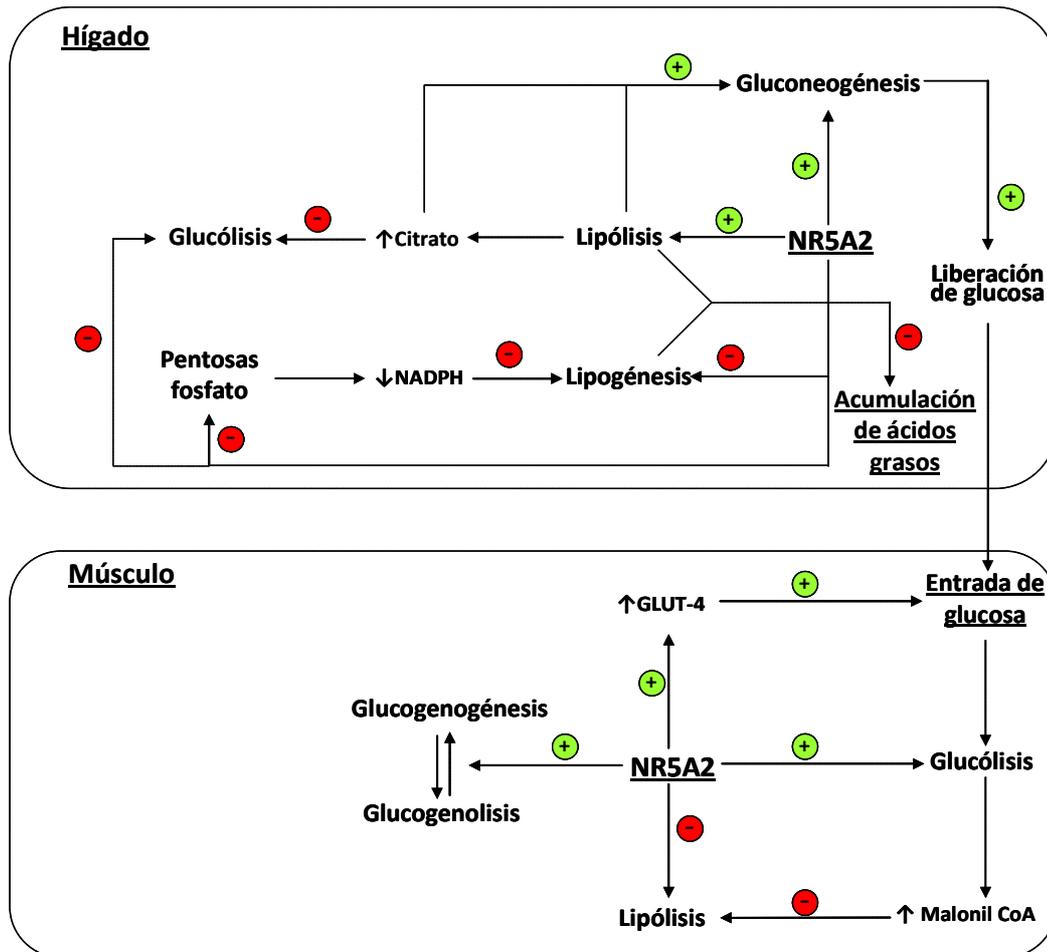


Fig.D2. Esquema de los efectos de la expresión de NR5A2 en el metabolismo de hígado y músculo. Los símbolos,+ o -, muestran el tipo de regulación.

glucosa muscular se compensaría por el incremento de la gluconeogénesis hepática. Además la expresión de NR5A2 en páncreas protege las células  $\beta$ -pancreáticas contra la disfunción y la apoptosis asociadas a la hiperinsulinemia prolongada (165) . En este modelo NR5A2 produciría la disrupción del ciclo de Mc Garry (117, 184) (Fig.D1 B). Así, los individuos con una mayor expresión de NR5A2 estarían protegidos contra las enfermedades derivadas de la resistencia a insulina, al prevenirse la hiperglucemia en sangre y la acumulación de ácidos grasos en el hígado.







## CONCLUSIONES

*“Aprender sin pensar es tiempo perdido;  
Pensar sin aprender es peligroso.”*

-Confucio.



### 6.1. CONCLUSIONES PARCIALES:

- 1) El SNP rs2816948 se encuentra localizado dentro de un sitio de regulación positiva y es funcional.
- 2) La sobreexpresión de NR5A2, en células HepG2, disminuye la retirada de glucosa del medio.
- 3) NR5A2, en HepG2, aumenta la expresión de enzimas asociadas a la gluconeogénesis.
- 4) En nuestro modelo de HepG2 NR5A2 inhibe la lipogénesis al reprimir la síntesis de TAG, así como de la ruta asociada de las pentosas fosfato y la expresión de genes implicados en la lipogénesis.
- 5) En células C2C12, NR5A2 es necesario para la diferenciación completa a miotubo.
- 6) En células C2C12 diferenciadas la activación de NR5A2 aumenta la expresión de GLUT4, aumentando la captación de glucosa.
- 7) La activación de NR5A2 podría aumentar el flujo glucolítico al inducir la expresión de enzimas de la glucólisis en células C2C12 diferenciadas.
- 8) En C2C12 diferenciadas NR5A2 induce la expresión de genes implicados en la glucogenogénesis y la glucogenolisis, lo que podría implicar un ciclo fútil de glucógeno.
- 9) La activación de NR5A2 en C2C12 diferenciadas inhibe la lipólisis, lo que podría estar producido por la mayor entrada de glucosa y la expresión del enzima que inhibe la lanzadera de carnitina, acc2.

### 6.2. CONCLUSION GENERAL

**NR5A2 actúa como un protector contra la resistencia a insulina al disminuir los niveles de glucosa en sangre y la acumulación de lípidos en el hígado. Esto es debido a que NR5A2 cambia el metabolismo, promoviendo un cambio de preferencia de sustrato, de ácidos grasos a glucosa.**







## BIBLIOGRAFÍA

*“Libros, las mejores armas del mundo...  
¡Ármense!”*

-Doctor Who.



1. A. V. Buchanan, K. M. Weiss, S. M. Fullerton, Dissecting complex disease: the quest for the Philosopher's Stone? *International Journal of Epidemiology* **35**, 562 (Jun, 2006).
2. T. A. Manolio, L. D. Brooks, F. S. Collins, A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *Journal of Clinical Investigation* **118**, 1590 (May, 2008).
3. D. Botstein, N. Risch, Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* **33 Suppl**, 228 (Mar, 2003).
4. P. G. Kopelman, Obesity as a medical problem. *Nature* **404**, 635 (Apr 6, 2000).
5. C. K. Roberts, C. Ng, S. Hama, A. J. Eliseo, R. J. Barnard, Effect of a short-term diet and exercise intervention on inflammatory/antiinflammatory properties of HDL in overweight/obese men with cardiovascular risk factors. *J Appl Physiol* **101**, 1727 (Dec, 2006).
6. C. L. Ogden *et al.*, Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *Jama-J Am Med Assoc* **295**, 1549 (Apr 5, 2006).
7. A. Hinney, C. I. G. Vogel, J. Hebebrand, From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adoles Psy* **19**, 297 (Mar, 2010).
8. I. S. Farooqi, S. O'Rahilly, Monogenic obesity in humans. *Annu Rev Med* **56**, 443 (2005).
9. D. L. Chen, A. Garg, Monogenic disorders of obesity and body fat distribution. *J Lipid Res* **40**, 1735 (Oct, 1999).
10. B. Dubern, K. Clement, Leptin and leptin receptor-related monogenic obesity. *Biochimie* **94**, 2111 (Oct, 2012).
11. C. Vaisse, K. Clement, B. Guy-Grand, P. Froguel, A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* **20**, 113 (Oct, 1998).
12. H. M. Lakka, A. Tremblay, J. P. Despres, C. Bouchard, Effects of long-term negative energy balance with exercise on plasma lipid and lipoprotein levels in identical twins. *Atherosclerosis* **172**, 127 (Jan, 2004).
13. I. S. Farooqi, S. O'Rahilly, Genetic factors in human obesity. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* **8 Suppl 1**, 37 (Mar, 2007).
14. J. R. Speakman, Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *The Journal of nutrition* **134**, 2090S (Aug, 2004).
15. T. Fall, E. Ingelsson, Genome-wide association studies of obesity and metabolic syndrome. *Molecular and cellular endocrinology*, (Sep 3, 2012).
16. F. R. Day, R. J. Loos, Developments in obesity genetics in the era of genome-wide association studies. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics* **4**, 222 (2011).
17. S. C. Hunt *et al.*, Association of the FTO gene with BMI. *Obesity (Silver Spring)* **16**, 902 (Apr, 2008).
18. J. B. Richards, D. Waterworth, S. O'Rahilly, A Genome-Wide Association Study Reveals Variants in ARL15 that Influence Adiponectin Levels. *Plos Genet* **5**, (Dec, 2009).
19. J. Yang *et al.*, FTO genotype is associated with phenotypic variability of body mass index. *Nature* **490**, 267 (Oct 11, 2012).
20. R. J. Loos *et al.*, Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet* **40**, 768 (Jun, 2008).

## Bibliografía

21. A. Kotronen, H. Yki-Jarvinen, Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**, 27 (Jan, 2008).
22. K. M. Utzschneider, S. E. Kahn, Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **91**, 4753 (Dec, 2006).
23. W. B. Salt, 2nd, Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a comprehensive review. *J Insur Med* **36**, 27 (2004).
24. B. Q. Starley, C. J. Calcagno, S. A. Harrison, Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* **51**, 1820 (May, 2010).
25. J. Ertle *et al.*, Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **128**, 2436 (May 15, 2011).
26. G. Schonfeld *et al.*, Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: triglyceride assembly into VLDL particles is affected by the extent of hepatic steatosis. *J Lipid Res* **44**, 470 (Mar, 2003).
27. M. Adiels *et al.*, Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* **49**, 755 (Apr, 2006).
28. F. G. S. Toledo, A. D. Sniderman, D. E. Kelley, Influence of hepatic steatosis (fatty liver) on severity and composition of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **29**, 1845 (Aug, 2006).
29. K. Kantartzis *et al.*, Fatty Liver Is Independently Associated With Alterations in Circulating HDL2 and HDL3 Subfractions. *Diabetes Care* **31**, 366 (Feb, 2008).
30. A. Seppala-Lindroos *et al.*, Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocr Metab* **87**, 3023 (Jul, 2002).
31. J. Araya *et al.*, Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* **106**, 635 (Jun, 2004).
32. L. A. Videla, R. Rodrigo, J. Araya, J. Poniachik, Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease. *Trends in molecular medicine* **12**, 555 (Dec, 2006).
33. J. W. Haukeland *et al.*, Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol* **44**, 1167 (Jun, 2006).
34. S. K. Das, V. Balakrishnan, Role of cytokines in the pathogenesis of non-alcoholic Fatty liver disease. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* **26**, 202 (Apr, 2011).
35. G. C. Farrell, C. Z. Larter, Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* **43**, S99 (Feb, 2006).
36. S. Narasimhan *et al.*, Oxidative stress is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in subjects with and without type 2 diabetes. *Clin Biochem* **43**, 815 (Jul, 2010).
37. Y. J. Zhou *et al.*, Influence of polygenetic polymorphisms on the susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease of Chinese people. *J Gastroen Hepatol* **25**, 772 (Apr, 2010).
38. R. Hernaez, Genetic factors associated with the presence and progression of nonalcoholic fatty liver disease: a narrative review. *Gastroenterologia y hepatologia* **35**, 32 (Jan, 2012).

39. A. Al-Serri *et al.*, The SOD2 C47T polymorphism influences NAFLD fibrosis severity: evidence from case-control and intra-familial allele association studies. *J Hepatol* **56**, 448 (Feb, 2012).
40. J. D. Browning *et al.*, Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* **40**, 1387 (Dec, 2004).
41. I. Shimizu, S. Ito, Protection of estrogens against the progression of chronic liver disease. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **37**, 239 (Apr, 2007).
42. J. E. Gerich, The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocrine reviews* **19**, 491 (Aug, 1998).
43. M. T. Malecki, Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pr* **68**, S10 (Jun, 2005).
44. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **35 Suppl 1**, S64 (Jan, 2012).
45. H. Bays, L. Mandarin, R. A. DeFronzo, Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **89**, 463 (Feb, 2004).
46. G. F. Lewis, A. Carpentier, K. Adeli, A. Giacca, Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine reviews* **23**, 201 (Apr, 2002).
47. S. E. Kahn, The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* **46**, 3 (Jan, 2003).
48. L. Rossetti, A. Giaccari, R. A. DeFronzo, Glucose Toxicity. *Diabetes Care* **13**, 610 (Jun, 1990).
49. C. L. Hanis *et al.*, A genome-wide search for human non-insulin dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nat Genet* **13**, 161 (Jun, 1996).
50. M. M. Mahtani *et al.*, Mapping of a gene for type 2 diabetes associated with an insulin secretion defect by a genome scan in Finnish families. *Nat Genet* **14**, 90 (Sep, 1996).
51. C. Herder, M. Roden, Genetics of type 2 diabetes: pathophysiologic and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* **41**, 679 (Jun, 2011).
52. R. Sladek *et al.*, A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* **445**, 881 (Feb 22, 2007).
53. S. Lillioja, A. Wilton, Agreement among type 2 diabetes linkage studies but a poor correlation with results from genome-wide association studies. *Diabetologia* **52**, 1061 (Jun, 2009).
54. V. Lyssenko *et al.*, Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *The New England journal of medicine* **359**, 2220 (Nov 20, 2008).
55. H. R. Han *et al.*, Genetic variations in the leptin and leptin receptor genes are associated with type 2 diabetes mellitus and metabolic traits in the Korean female population. *Clinical genetics* **74**, 105 (Aug, 2008).
56. J. P. Jeon *et al.*, Copy number variation at leptin receptor gene locus associated with metabolic traits and the risk of type 2 diabetes mellitus. *Bmc Genomics* **11**, (Jul 12, 2010).

## Bibliografía

57. T. Salopuro *et al.*, Genetic variation in leptin receptor gene is associated with type 2 diabetes and body weight: The Finnish Diabetes Prevention Study. *Int J Obesity* **29**, 1245 (Oct, 2005).
58. A. D. Pradhan, J. E. Manson, N. Rifai, J. E. Buring, P. M. Ridker, C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama-J Am Med Assoc* **286**, 327 (Jul 18, 2001).
59. S. S. Li, H. J. Shin, E. L. Ding, R. M. van Dam, Adiponectin Levels and Risk of Type 2 Diabetes A Systematic Review and Meta-analysis. *Jama-J Am Med Assoc* **302**, 179 (Jul 8, 2009).
60. K. Hara *et al.*, Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population (vol 52, pg 536, 2001). *Diabetes* **51**, 1294 (Apr, 2002).
61. J. Holmkvist *et al.*, Common variants in maturity-onset diabetes of the young genes and future risk of type 2 diabetes. *Diabetes* **57**, 1738 (Jun, 2008).
62. S. M. Haffner, S. Lehto, T. Ronnema, K. Pyorala, M. Laakso, Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *New Engl J Med* **339**, 229 (Jul 23, 1998).
63. A. Juutilainen, S. Lehto, T. Ronnema, K. Pyorala, M. Laakso, Type 2 diabetes as a "coronary heart disease equivalent" - An 18-year prospective population-based study in Finnish subjects. *Diabetes Care* **28**, 2901 (Dec, 2005).
64. M. Dean, Approaches to identify genes for complex human diseases: lessons from Mendelian disorders. *Human mutation* **22**, 261 (Oct, 2003).
65. P. R. Buckland, Allele-specific gene expression differences in humans. *Human molecular genetics* **13 Spec No 2**, R255 (Oct 1, 2004).
66. J. V. Neel, Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *American journal of human genetics* **14**, 353 (Dec, 1962).
67. M. V. Chakravarthy, F. W. Booth, Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *J Appl Physiol* **96**, 3 (Jan, 2004).
68. A. M. Prentice, P. Rayco-Solon, S. E. Moore, Insights from the developing world: thrifty genotypes and thrifty phenotypes. *P Nutr Soc* **64**, 153 (May, 2005).
69. R. Stoger, The thrifty epigenotype: an acquired and heritable predisposition for obesity and diabetes? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **30**, 156 (Feb, 2008).
70. J. R. Speakman, Thrifty genes for obesity and the metabolic syndrome--time to call off the search? *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease* **3**, 7 (May, 2006).
71. M. G. Watve, C. S. Yajnik, Evolutionary origins of insulin resistance: a behavioral switch hypothesis. *BMC evolutionary biology* **7**, 61 (2007).
72. P. Y. Liao, K. H. Lee, From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. *Biochem Eng J* **49**, 149 (Apr 15, 2010).
73. R.-R. Bolado-Carrancio A, JC, Identification and functional analysis of regulatory polymorphisms. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* **8**, 8 (JUNE 2010, 2010).
74. Y. Zhao *et al.*, Prediction of functional regulatory SNPs in monogenic and complex disease. *Human mutation* **32**, 1183 (Oct, 2011).

75. Y. Guo, D. C. Jamison, The distribution of SNPs in human gene regulatory regions. *Bmc Genomics* **6**, 140 (2005).
76. R. Sachidanandam *et al.*, A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* **409**, 928 (Feb 15, 2001).
77. N. B. Freimer, C. Sabatti, Human genetics: variants in common diseases. *Nature* **445**, 828 (Feb 22, 2007).
78. R. D. Miller, P. Taillon-Miller, P. Y. Kwok, Regions of low single-nucleotide polymorphism incidence in human and orangutan xq: deserts and recent coalescences. *Genomics* **71**, 78 (Jan 1, 2001).
79. D. C. Koboldt, R. D. Miller, P. Y. Kwok, Distribution of human SNPs and its effect on high-throughput genotyping. *Human mutation* **27**, 249 (Mar, 2006).
80. R. D. Miller, P. Y. Kwok, The birth and death of human single-nucleotide polymorphisms: new experimental evidence and implications for human history and medicine. *Human molecular genetics* **10**, 2195 (Oct 1, 2001).
81. P. R. Buckland, The importance and identification of regulatory polymorphisms and their mechanisms of action. *Bba-Mol Basis Dis* **1762**, 17 (Jan, 2006).
82. B. PR, The importance and identification of regulatory polymorphisms and their mechanisms of action. *Human mutation* **26**, 9 (2005 Sep, 2005).
83. Z. Wang, J. Moulton, SNPs, protein structure, and disease. *Human mutation* **17**, 263 (Apr, 2001).
84. F. Capon *et al.*, A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Human molecular genetics* **13**, 2361 (Oct 15, 2004).
85. G. L. Chen, G. M. Miller, Rhesus monkey tryptophan hydroxylase-2 coding region haplotypes affect mRNA stability. *Neuroscience* **155**, 485 (Aug 13, 2008).
86. K. Faber, K. H. Glatting, P. J. Mueller, A. Risch, A. Hotz-Wagenblatt, Genome-wide prediction of splice-modifying SNPs in human genes using a new analysis pipeline called AASites. *Bmc Bioinformatics* **12**, (Jul 5, 2011).
87. M. De Gobbi *et al.*, A regulatory SNP causes a human genetic disease by creating a new transcriptional promoter. *Science* **312**, 1215 (May 26, 2006).
88. T. B. Acton, H. L. Zhong, A. K. Vershon, DNA-binding specificity of Mcm1: Operator mutations that alter DNA-bending and transcriptional activities by a MADS box protein. *Mol Cell Biol* **17**, 1881 (Apr, 1997).
89. P. Germain, B. Staels, C. Dacquet, M. Spedding, V. Laudet, Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* **58**, 685 (Dec, 2006).
90. V. Giguere, Orphan nuclear receptors: From gene to function. *Endocrine reviews* **20**, 689 (Oct, 1999).
91. J. Sonoda, L. Pei, R. M. Evans, Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS letters* **582**, 2 (Jan 9, 2008).
92. G. V. Markov, V. Laudet, Origin and evolution of the ligand-binding ability of nuclear receptors. *Molecular and cellular endocrinology* **334**, 21 (Mar 1, 2011).
93. G. D. Hammer *et al.*, Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: Integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell* **3**, 521 (Apr, 1999).
94. Z. L. Wang *et al.*, Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* **423**, 555 (May 29, 2003).

## Bibliografía

95. J. Auwerx *et al.*, A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* **97**, 161 (Apr 16, 1999).
96. M. Robinson-Rechavi, A. S. Carpentier, M. Duffraisse, V. Laudet, How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet* **17**, 554 (Oct, 2001).
97. V. Laudet, C. Hanni, J. Coll, F. Catzeflis, D. Stehelin, Evolution of the Nuclear Receptor Gene Superfamily. *Embo J* **11**, 1003 (Mar, 1992).
98. V. Laudet, Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* **19**, 207 (Dec, 1997).
99. D. L. Bain, A. F. Heneghan, K. D. Connaghan-Jones, M. T. Miura, Nuclear receptor structure: Implications for function. *Annu Rev Physiol* **69**, 201 (2007).
100. A. Warnmark, E. Treuter, A. P. H. Wright, J. A. Gustafsson, Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: Molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol* **17**, 1901 (Oct 1, 2003).
101. C. RochetteEgly, S. Adam, M. Rossignol, J. M. Egly, P. Chambon, Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* **90**, 97 (Jul 11, 1997).
102. G. Bunone, P. A. Briand, R. J. Miksicek, D. Picard, Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *Embo J* **15**, 2174 (May 1, 1996).
103. T. Ikonen, J. J. Palvimo, O. A. Janne, Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem* **272**, 29821 (Nov 21, 1997).
104. G. S. Takimoto *et al.*, Functional properties of the N-terminal region of progesterone receptors and their mechanistic relationship to structure. *J Steroid Biochem* **85**, 209 (Jun, 2003).
105. S. M. A. Holmbeck *et al.*, High-resolution solution structure of the retinoid X receptor DNA-binding domain. *J Mol Biol* **281**, 271 (Aug 14, 1998).
106. Y. Li, M. H. Lambert, H. E. Xu, Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure* **11**, 741 (Jul, 2003).
107. D. M. Heery, E. Kalkhoven, S. Hoare, M. G. Parker, A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**, 733 (Jun 12, 1997).
108. W. B. Pratt, D. O. Toft, Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine reviews* **18**, 306 (Jun, 1997).
109. G. Jiang, L. Nepomuceno, K. Hopkins, F. M. Sladek, Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol Cell Biol* **15**, 5131 (Sep, 1995).
110. G. D. Hammer *et al.*, Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell* **3**, 521 (Apr, 1999).
111. W. Y. Chen, W. C. Lee, N. C. Hsu, F. Huang, B. C. Chung, SUMO modification of repression domains modulates function of nuclear receptor 5A1 (steroidogenic factor-1). *J Biol Chem* **279**, 38730 (Sep 10, 2004).
112. D. S. Lala *et al.*, Activation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by oxysterols. *P Natl Acad Sci USA* **94**, 4895 (May 13, 1997).

113. M. V. Gonzalez *et al.*, Glucocorticoids antagonize AP-1 by inhibiting the activation/phosphorylation of JNK without affecting its subcellular distribution. *J Cell Biol* **150**, 1199 (Sep 4, 2000).
114. S. C. Biddie *et al.*, Transcription Factor AP1 Potentiates Chromatin Accessibility and Glucocorticoid Receptor Binding. *Mol Cell* **43**, 145 (Jul 8, 2011).
115. Y. K. Lee, D. D. Moore, Dual mechanisms for repression of the monomeric orphan receptor liver receptor homologous protein-1 by the orphan small heterodimer partner. *J Biol Chem* **277**, 2463 (Jan 25, 2002).
116. E. Fayard, J. Auwerx, K. Schoonjans, LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol* **14**, 250 (May, 2004).
117. J. M. Lee *et al.*, A nuclear-receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects. *Nature* **474**, 506 (Jun 23, 2011).
118. I. N. Krylova *et al.*, Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* **120**, 343 (Feb 11, 2005).
119. Y. K. Lee, Y. H. Choi, S. Chua, Y. J. Park, D. M. Moore, Phosphorylation of the hinge domain of the nuclear hormone receptor LRH-1 stimulates transactivation. *J Biol Chem* **281**, 7850 (Mar 24, 2006).
120. A. Chalkiadaki, I. Talianidis, SUMO-dependent compartmentalization in promyelocytic leukemia protein nuclear bodies prevents the access of LRH-1 to chromatin. *Mol Cell Biol* **25**, 5095 (Jun, 2005).
121. D. Chanda, Y. B. Xie, H. S. Choi, Transcriptional corepressor SHP recruits SIRT1 histone deacetylase to inhibit LRH-1 transactivation. *Nucleic acids research* **38**, 4607 (Aug, 2010).
122. C. K. Zhang *et al.*, Characterization of the genomic structure and tissue-specific promoter of the human nuclear receptor NR5A2 (hB1F) gene. *Gene* **273**, 239 (Aug 8, 2001).
123. V. Kruys, O. Marinx, G. Shaw, J. Deschamps, G. Huez, Translational blockade imposed by cytokine-derived UA-rich sequences. *Science* **245**, 852 (Aug 25, 1989).
124. P. J. Fernandez-Marcos, J. Auwerx, K. Schoonjans, Emerging actions of the nuclear receptor LRH-1 in the gut. *Biochimica et biophysica acta* **1812**, 947 (Aug, 2011).
125. S. G. Sheela, W. C. Lee, W. W. Lin, B. C. Chung, Zebrafish ftz-f1a (nuclear receptor 5a2) functions in skeletal muscle organization. *Developmental biology* **286**, 377 (Oct 15, 2005).
126. H. Ueda, G. C. Sun, T. Murata, S. Hirose, A novel DNA-binding motif abuts the zinc finger domain of insect nuclear hormone receptor FTZ-F1 and mouse embryonal long terminal repeat-binding protein. *Mol Cell Biol* **12**, 5667 (Dec, 1992).
127. E. P. Sablin, I. N. Krylova, R. J. Fletterick, H. A. Ingraham, Structural basis for ligand-independent activation of the orphan nuclear receptor LRH-1. *Mol Cell* **11**, 1575 (Jun, 2003).
128. E. P. Sablin *et al.*, The structure of corepressor Dax-1 bound to its target nuclear receptor LRH-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18390 (Nov 25, 2008).
129. B. Goodwin *et al.*, A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* **6**, 517 (Sep, 2000).
130. A. Kamiya, S. Kakinuma, M. Onodera, A. Miyajima, H. Nakauchi, Prospero-related homeobox 1 and liver receptor homolog 1 coordinately regulate long-term proliferation of murine fetal hepatoblasts. *Hepatology* **48**, 252 (Jul, 2008).

## Bibliografía

131. M. B. Lee *et al.*, The DEAD-Box protein DP103 (Ddx20 or gemin-3) represses orphan nuclear receptor activity via SUMO modification. *Mol Cell Biol* **25**, 1879 (Mar, 2005).
132. H. T. Hsieh *et al.*, PIASy inhibits LRH-1-dependent CYP11A1 expression by competing for SRC-1 binding. *Biochem J* **419**, 201 (Apr 1, 2009).
133. R. Safi *et al.*, Coactivation of liver receptor homologue-1 by peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha on aromatase promoter II and its inhibition by activated retinoid X receptor suggest a novel target for breast-specific antiestrogen therapy. *Cancer research* **65**, 11762 (Dec 15, 2005).
134. T. Yazawa *et al.*, PPAR-gamma Coactivator-1 alpha Regulates Progesterone Production in Ovarian Granulosa Cells with SF-1 and LRH-1. *Mol Endocrinol* **24**, 485 (Mar, 2010).
135. M. Ohno *et al.*, Interleukin enhancer-binding factor 3 functions as a liver receptor homologue-1 co-activator in synergy with the nuclear receptor co-activators PRMT1 and PGC-1 alpha. *Biochem J* **437**, 531 (Aug 1, 2011).
136. T. T. Lu *et al.*, Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* **6**, 507 (Sep, 2000).
137. Y. K. Lee *et al.*, Liver receptor homolog-1 regulates bile acid homeostasis but is not essential for feedback regulation of bile acid synthesis. *Mol Endocrinol* **22**, 1345 (Jun, 2008).
138. C. Matakis *et al.*, Compromised intestinal lipid absorption in mice with a liver-specific deficiency of liver receptor homolog 1. *Mol Cell Biol* **27**, 8330 (Dec, 2007).
139. A. del Castillo-Olivares, J. A. Campos, W. M. Pandak, G. Gil, The role of alpha1-fetoprotein transcription factor/LRH-1 in bile acid biosynthesis: a known nuclear receptor activator that can act as a suppressor of bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* **279**, 16813 (Apr 16, 2004).
140. P. Delerive, C. M. Galardi, J. E. Bisi, E. Nicodeme, B. Goodwin, Identification of liver receptor homolog-1 as a novel regulator of apolipoprotein AI gene transcription. *Mol Endocrinol* **18**, 2378 (Oct, 2004).
141. N. Venter, A. Haroniti, J. J. Tousaint, I. Talianidis, P. Delerive, Regulation of anti-atherogenic apolipoprotein m gene expression by the orphan nuclear receptor LRH-1. *J Biol Chem* **283**, 3694 (Feb 15, 2008).
142. W. Le Goff, M. Guerin, M. J. Chapman, J. Thillet, A CYP7A promoter binding factor site and Alu repeat in the distal promoter region are implicated in regulation of human CETP gene expression. *J Lipid Res* **44**, 902 (May, 2003).
143. K. Schoonjans *et al.*, Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I. *EMBO reports* **3**, 1181 (Dec, 2002).
144. R. Duggavathi *et al.*, Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. *Gene Dev* **22**, 1871 (Jul 15, 2008).
145. C. D. Clyne, C. J. Speed, J. Zhou, E. R. Simpson, Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes. *J Biol Chem* **277**, 20591 (Jun 7, 2002).
146. J. Zhou *et al.*, Interactions between prostaglandin E-2, liver receptor homologue-1, and aromatase in breast cancer. *Cancer research* **65**, 657 (Jan 15, 2005).
147. M. F. Bouchard, H. Taniguchi, R. S. Viger, Protein kinase A-dependent synergism between GATA factors and the nuclear receptor, liver receptor homolog-1, regulates human aromatase (CYP19) PII promoter activity in breast cancer cells. *Endocrinology* **146**, 4905 (Nov, 2005).

148. A. L. Chand *et al.*, The Orphan Nuclear Receptor LRH-1 and ER alpha Activate GREB1 Expression to Induce Breast Cancer Cell Proliferation. *Plos One* **7**, (Feb 16, 2012).
149. A. L. Chand, K. A. Herridge, E. W. Thompson, C. D. Clyne, The orphan nuclear receptor LRH-1 promotes breast cancer motility and invasion. *Endocr-Relat Cancer* **17**, 965 (Dec, 2010).
150. Y. X. Zhang, Z. H. Yang, R. Whitby, L. Wang, Regulation of miR-200c by nuclear receptors PPAR alpha, LRH-1 and SHP. *Biochem Bioph Res Co* **416**, 135 (Dec 9, 2011).
151. O. A. Botrugno *et al.*, Synergy between LRH-1 and beta-catenin induces G(1) cyclin-mediated cell proliferation. *Mol Cell* **15**, 499 (Aug 27, 2004).
152. S. L. Wang *et al.*, Increased expression of hLRH-1 in human gastric cancer and its implication in tumorigenesis. *Mol Cell Biochem* **308**, 93 (Jan, 2008).
153. C. Benod *et al.*, Nuclear receptor liver receptor homologue 1 (LRH-1) regulates pancreatic cancer cell growth and proliferation. *P Natl Acad Sci USA* **108**, 16927 (Oct 11, 2011).
154. H. W. Tang, X. Q. Dong, M. Hassan, J. L. Abbruzzese, D. H. Li, Body Mass Index and Obesity- and Diabetes-Associated Genotypes and Risk for Pancreatic Cancer. *Cancer Epidem Biomar* **20**, 779 (May, 2011).
155. G. M. Petersen *et al.*, A genome-wide association study identifies pancreatic cancer susceptibility loci on chromosomes 13q22.1, 1q32.1 and 5p15.33. *Nat Genet* **42**, 224 (Mar, 2010).
156. P. L. Gu *et al.*, Orphan nuclear receptor LRH-1 is required to maintain Oct4 expression at the epiblast stage of embryonic development. *Mol Cell Biol* **25**, 3492 (May, 2005).
157. R. T. Wagner, X. Xu, F. Yi, B. J. Merrill, A. J. Cooney, Canonical Wnt/beta-catenin regulation of liver receptor homolog-1 mediates pluripotency gene expression. *Stem Cells* **28**, 1794 (Oct, 2010).
158. J. C. D. Heng *et al.*, The Nuclear Receptor Nr5a2 Can Replace Oct4 in the Reprogramming of Murine Somatic Cells to Pluripotent Cells. *Cell Stem Cell* **6**, 167 (Feb 5, 2010).
159. J. F. Pare, S. Roy, L. Galarneau, L. Belanger, The mouse fetoprotein transcription factor (FTF) gene promoter is regulated by three GATA elements with tandem E box and Nkx motifs, and FTF in turn activates the Hnf3 beta, Hnf4 alpha, and Hnf1 alpha gene promoters. *J Biol Chem* **276**, 13136 (Apr 20, 2001).
160. F. M. Rausa, L. Galarneau, L. Belanger, R. H. Costa, The nuclear receptor fetoprotein transcription factor is coexpressed with its target gene HNF-3 beta in the developing murine liver intestine and pancreas. *Mech Develop* **89**, 185 (Dec, 1999).
161. H. Nishizawa *et al.*, Small heterodimer partner, an orphan nuclear receptor, augments peroxisome proliferator-activated receptor gamma transactivation. *J Biol Chem* **277**, 1586 (Jan 11, 2002).
162. A. Coste *et al.*, LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13098 (Aug 7, 2007).
163. N. Venteclef, T. Jakobsson, K. R. Steffensen, E. Treuter, Metabolic nuclear receptor signaling and the inflammatory acute phase response. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **22**, 333 (Aug, 2011).

## Bibliografía

164. M. Mueller *et al.*, The nuclear receptor LRH-1 critically regulates extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestine. *The Journal of experimental medicine* **203**, 2057 (Sep 4, 2006).
165. M. Baquie *et al.*, The liver receptor homolog-1 (LRH-1) is expressed in human islets and protects  $\beta$ -cells against stress-induced apoptosis. *Human molecular genetics* **20**, 2823 (Jul 15, 2011).
166. S. R. Holmstrom *et al.*, LRH-1 and PTF1-L coregulate an exocrine pancreas-specific transcriptional network for digestive function. *Genes Dev* **25**, 1674 (Aug 15, 2011).
167. E. Fayard, K. Schoonjans, J. S. Annicotte, J. Auwerx, Liver receptor homolog 1 controls the expression of carboxyl ester lipase. *J Biol Chem* **278**, 35725 (Sep 12, 2003).
168. N. Venteclef, J. C. Smith, B. Goodwin, P. Delerive, Liver receptor homolog 1 is a negative regulator of the hepatic acute-phase response. *Mol Cell Biol* **26**, 6799 (Sep, 2006).
169. N. Venteclef, P. Delerive, Interleukin-1 receptor antagonist induction as an additional mechanism for liver receptor homolog-1 to negatively regulate the hepatic acute phase response. *J Biol Chem* **282**, 4393 (Feb 16, 2007).
170. M. S. Kim, J. Shigenaga, A. Moser, K. Feingold, C. Grunfeld, Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response. *J Biol Chem* **278**, 8988 (Mar 14, 2003).
171. N. Venteclef *et al.*, GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXR beta in the hepatic acute phase response. *Gene Dev* **24**, 381 (Feb 15, 2010).
172. K. E. Matsukuma, L. Wang, M. K. Bennett, T. F. Osborne, A key role for orphan nuclear receptor liver receptor homologue-1 in activation of fatty acid synthase promoter by liver X receptor. *J Biol Chem* **282**, 20164 (Jul 13, 2007).
173. M. H. Oosterveer *et al.*, LRH-1-dependent glucose sensing determines intermediary metabolism in liver. *The Journal of clinical investigation* **122**, 2817 (Aug 1, 2012).
174. M. Iwaki *et al.*, Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* **52**, 1655 (Jul, 2003).
175. T. L. Clemens, G. Karsenty, The Osteoblast: An Insulin Target Cell Controlling Glucose Homeostasis. *J Bone Miner Res* **26**, 677 (Apr, 2011).
176. J. A. Riancho *et al.*, Nuclear receptor NR5A2 and bone: gene expression and association with bone mineral density. *Eur J Endocrinol* **166**, 69 (Jan, 2012).
177. S. Buratowski, L. A. Chodosh, Mobility shift DNA-binding assay using gel electrophoresis. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.] Chapter 12*, Unit 12.2 (May, 2001).
178. M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248 (May 7, 1976).
179. R. K. Saiki *et al.*, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487 (Jan 29, 1988).
180. J. Folch, M. Lees, G. H. S. Stanley, A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J Biol Chem* **226**, 497 (1957).
181. A. Hennebry *et al.*, Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. *American journal of physiology. Cell physiology* **296**, C525 (Mar, 2009).

182. J. Park *et al.*, Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. *Mol Cell Biol* **25**, 5146 (Jun, 2005).
183. J. D. Horton, J. L. Goldstein, M. S. Brown, SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal of Clinical Investigation* **109**, 1125 (May, 2002).
184. D. D. Moore, Nuclear Receptors Reverse McGarry's Vicious Cycle to Insulin Resistance (vol 15, pg 615, 2012). *Cell Metab* **15**, 925 (Jun 6, 2012).
185. T. Kanayama *et al.*, Interaction between sterol regulatory element-binding proteins and liver receptor homolog-1 reciprocally suppresses their transcriptional activities. *J Biol Chem* **282**, 10290 (Apr 6, 2007).
186. C. Le May *et al.*, Reduced hepatic fatty acid oxidation in fasting PPAR alpha null mice is due to impaired mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA synthase gene expression. *FEBS letters* **475**, 163 (Jun 23, 2000).
187. T. Kabashima, T. Kawaguchi, B. E. Wadzinski, K. Uyeda, Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *P Natl Acad Sci USA* **100**, 5107 (Apr 29, 2003).
188. V. T. Samuel, K. F. Petersen, G. I. Shulman, Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* **375**, 2267 (Jun-Jul, 2010).
189. W. Cui, S. L. Chen, K. Q. Hu, Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *American journal of translational research* **2**, 95 (2010).
190. T. Tanaka, H. Masuzaki, K. Nakao, [Role of PPARs in the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease]. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine* **63**, 700 (Apr, 2005).
191. E. M. Morris *et al.*, PGC-1alpha overexpression results in increased hepatic fatty acid oxidation with reduced triacylglycerol accumulation and secretion. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **303**, G979 (Oct 15, 2012).
192. P. J. Randle, P. B. Garland, C. N. Hales, E. A. Newsholme, The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* **1**, 785 (Apr 13, 1963).
193. J. D. McGarry, What If Minkowski Had Been Ageusic - an Alternative Angle on Diabetes. *Science* **258**, 766 (Oct 30, 1992).
194. B. P. Atshaves *et al.*, Liver fatty acid-binding protein and obesity. *J Nutr Biochem* **21**, 1015 (Nov, 2010).
195. T. C. Leone, C. J. Weinheimer, D. P. Kelly, A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in the cellular fasting response: The PPAR alpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *P Natl Acad Sci USA* **96**, 7473 (Jun 22, 1999).
196. E. Barroso *et al.*, The PPAR beta/delta Activator GW501516 Prevents the Down-Regulation of AMPK Caused by a High-Fat Diet in Liver and Amplifies the PGC-1 alpha-Lipin 1-PPAR alpha Pathway Leading to Increased Fatty Acid Oxidation. *Endocrinology* **152**, 1848 (May, 2011).
197. J. Lin *et al.*, Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**, 797 (Aug 15, 2002).
198. V. T. Samuel *et al.*, Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* **279**, 32345 (Jul 30, 2004).

## Bibliografía

199. F. Amati *et al.*, Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes? *Diabetes* **60**, 2588 (Oct, 2011).
200. A. E. Stenbit *et al.*, GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nature medicine* **3**, 1096 (Oct, 1997).
201. M. J. Charron, N. Gorovits, J. S. Laidlaw, M. Ranalletta, E. B. Katz, Use of GLUT-4 null mice to study skeletal muscle glucose uptake. *Clin Exp Pharmacol P* **32**, 308 (Apr, 2005).
202. E. Karnieli, M. Armoni, Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. *Am J Physiol-Endoc M* **295**, E38 (Jul, 2008).
203. T. S. Tsao, R. Burcelin, M. J. Charron, Regulation of hexokinase II gene expression by glucose flux in skeletal muscle. *J Biol Chem* **271**, 14959 (Jun 21, 1996).





## **ANEXOS**



## 8.1. TABLAS SUPLEMENTARIAS.

TABLA S1.

SUBFAMILIA	GRUPO	LIGANDO	NOMBRE	NOMBRE SISTEMÁTICO
1: Receptores semejantes a los receptores de hormonas tiroideas	A: Receptores de hormona tiroidea	Hormona tiroidea	Receptor de hormona tiroidea- $\alpha$	NR1A1
			Receptor de hormona tiroidea- $\beta$	NR1A2
	B: Receptores de ácido retinoico	Acido retinoico	Receptor de ácido retinoico- $\alpha$	NR1B1
			Receptor de ácido retinoico- $\beta$	NR1B2
			Receptor de ácido retinoico- $\gamma$	NR1B3
	C: Activadores de la proliferación de peroxisomas	ácidos grasos, prostaglandinas, fibratos, leukotrieno B	Receptor activador de la proliferación de peroxisomas- $\alpha$	NR1C1
			Receptor activador de la proliferación de peroxisomas- $\beta/\delta$	NR1C2
			Receptor activador de la proliferación de peroxisomas- $\gamma$	NR1C3
	D: Grupo de rev-Erb- $\alpha$	Huérfano	Rev-ErbA $\alpha$	NR1D1
			Rev-ErbA $\alpha$	NR1D2
	F: Receptores huérfanos similares a RAR	Huérfano	Receptores huérfanos similares a RAR- $\alpha$	NR1F1
			Receptores huérfanos similares a RAR- $\beta$	NR1F2
			Receptores huérfanos similares a RAR- $\gamma$	NR1F3
	H: Receptores similares a LXR	Oxisteroles, GW3965, T0901317	Liver X receptor- $\alpha$	NR1H3
			Liver X receptor- $\beta$	NR1H2
			Farnesoid X receptor	NR1H4
	I: NRs semejantes al receptor de vitamina D	Vitamina D, (1,25) Vit. D Xenobióticos Xenobióticos, androstano	Vitamin D receptor	NR1I1
			Pregnane X receptor	NR1I2
			Receptor constitutivo de androstano	NR1I3
X: NRs con dos dominios de unión a DNA	Huérfano	2DBD-NR $\alpha$	NR1X1	
		2DBD-NR $\beta$	NR1X2	
		2DBD-NR $\gamma$	NR1X3	

<p><b>2: Receptores semejantes a los receptores X retinoides</b></p>	<b>A: HNF-4</b>	Huérfano	Factor nuclear de hepatocito 4- $\alpha$	NR2A1
	<p><b>B: Receptores de retinoico X</b></p>	Retinoico	Factor nuclear de hepatocito 4- $\gamma$	NR2A2
			Receptor X retinoide- $\alpha$	NR2B1
			Receptor X retinoide- $\beta$	NR2B2
	<p><b>C: Receptor testicular</b></p>	Huérfano	Receptor X retinoide- $\gamma$	NR2B3
			Receptor testicular 2	NR2C1
			Receptor testicular 4	NR2C2
	<p><b>E: TLX/PNR</b></p>	Huérfano	Homólogo humano del gen <i>tailless</i> de <i>Drosophila</i>	NR2F1
			Receptor nuclear específico de fotorreceptor	NR2E3
	<p><b>3: Receptores semejantes a los receptores de estrógenos</b></p>	<p><b>F: Factor de transcripción del promotor de la ovoalbúmina de pollo I</b></p>	Huérfano	Factor de transcripción del promotor de la ovoalbúmina de pollo I
Factor de transcripción del promotor de la ovoalbúmina de pollo II				NR2F2
<p><b>A. Receptor de estrógenos</b></p>		Estrógenos, tamoxifeno	Gen asociado a V-erbA	NR2F6
			Receptor de estrógeno- $\alpha$	NR3A1
			Receptor de estrógeno- $\beta$	NR3A2
			Receptor asociado a estrógeno- $\alpha$	NR3B1
<p><b>B: Receptor asociado a estrógenos</b></p>	Huérfano	Receptor asociado a estrógeno- $\beta$	NR3B2	
		Receptor asociado a estrógeno- $\gamma$	NR3B3	
<p><b>C: Receptor de glucocorticoides</b></p>	<p>Cortisol, dexametasona, RU486</p> <p>Aldosterona, espirolactona</p> <p>Progesterona, RU486</p> <p>Testosterona, flutamida</p>	Receptor de glucocorticoides	NR3C1	
		Receptor de mineralocorticoides	NR3C2	
		Receptor de progesterona	NR3C3	
		Receptor androgénico	NR3C4	

SUBFAMILIA	GRUPO	LIGANDO	NOMBRE	NOMBRE SISTEMÁTICO
4: Receptores semejantes a los factores de crecimiento nervioso IB	A: NGFIB/NURR1 /NOR1	Huérfano	Factor de crecimiento nervioso IB	NR4A1
			Receptor nuclear asociado 1	NR4A2
			Receptor nuclear huérfano derivado de neuronas 1	NR4A3
5: Receptores semejantes a los factores esteroidogénicos	A: SF1/LRH1	Fosfatidilinsitol	Factor esteroidogénico 1	NR5A1
		DLPC	Receptor homólogo hepático 1	NR5A2
6: Receptores semejantes a los factores nucleares de células germinativas	A:GCNF	Huérfano	Factor nuclear de células germinativas	NR6A1
			Hipogonadismo sensible a dosis, región crítica de la hipoplasia adrenal, en cromosoma X, gen 1	NR0B1
0: Receptores nucleares no clásicos	B: DAX/SHP	Huérfano	Proteína heterodimérica pequeña	NR0B2

Tabla S1. Clasificación de los receptores nucleares humanos. Junto con el nombre sistemático se da una descripción del significado del mismo, así como el nombre alternativo y los ligandos descritos.

## Anexos

TABLA S2.

Gen	Cebador Fw (5'→3')	Cebador Re (5'→3')	Concentración (Fw/Re) (nM)	T <sub>m</sub> (°C)
<i>NR5A2</i> endógeno	TACCGACAAGTGGTACATGGA	CGGTTGTGATGCTATTATGGA	200/200	55
<i>NR5A2</i> exógeno	CAGAACTGCCAGATCGACAA	CTGCCGCCTCTCATTCTATC	200/200	55
<i>G6Pc</i>	TACGTCCTCTTCCCATCTG	CCTGGTCCAGTCTCACAGGT	200/200	55
<i>FBP1</i>	TCAACTGCTTCATGCTGGAC	CGTAGACCAGAGTGCGATGA	100/200	55
<i>PFKFBP1</i>	GTTTACCAGCTCGAGGCAAG	AAAACCGCAACATGACCTTC	200/200	55
<i>HK1</i>	AGACGCACCCACAGTATTCC	CGCATCTCTTCTTACCTC	200/200	55
<i>G6PD</i>	CCAAGCCCATCCCTATATT	GAATGTGCAGCTGAGGTCAA	100/200	57
<i>PPARGC1A</i>	CCTGCATGAGTGTGTGCTCT	GCAAAGAGGCTGGTCTTCAC	200/200	55
<i>PPARA</i>	AGTCTCCAGTGGAGCATTG	GTTGTGTGACATCCCGACAG	200/200	55
<i>PEPCK-1</i>	AAGAGACACAGTGCCATCC	ACGTAGGGTGAATCCGTCAG	200/200	55
<i>FABP1</i>	GCAGAGCCAGGAAAATTG	TCTCCCTGTCAATTGTCTCC	200/200	55
<i>ACC1</i>	ACCACCAATGCCAAAGTAGC	CTGCAGGTTCTCAATGCAAA	200/200	57
<i>FASN</i>	GATGACCGTCGCTGGAAGGC	CGCAGCTGAGGGTCCATCGT	200/200	57
<i>CYP7A1</i>	CCGATGGATGGAATACCAC	GGCAGCGGTCTTTGAGTTAG	200/200	55
<i>CYP8B1</i>	TGGACCTGACACACCACTA	GGCCAAGCTCACTCTGTAGG	100/100	55
<i>RPS14</i>	CCGGGATAGCTGCTCTGTTA	TCCCTGCAAGCTCAATAGGT	200/200	55/57

TABLA S3.

Gen	Cebador Fw (5'→3')	Cebador Re (5'→3')	Concentración (Fw/Re) (nM)	T <sub>m</sub> (°C)
<i>Nr5a2</i>	AAAACGGGCAGTAACCTCT	TCAGCAACAGCAGCAGAAGT	200/200	57
<i>MyoG</i>	ACTCCCTTACGTCCATCGTG	CAGGACAGCCCCACTTAAAA	200/200	57
<i>MyoD</i>	TAGTAGGCGGTGTCGTAG	GGCTGTCTGTGGAGATGC	200/200	57
<i>Glut4</i>	ACTCATTCTTGACGGTTCCTC	CACCCGAAGATGAGTGGG	200/200	55
<i>Hk2</i>	TCAACCAAAACCAAGTGACAG	TAGCTCTAGCCCCCTTCTCC	200/200	57
<i>PfkFb1</i>	GCACTACGGGACCAGGATAA	TCTTGCCGTTCTAGTCCAT	100/100	57
<i>pGYM</i>	CAACGTGGAGATGGCAGAG	GGTCGTAGTACTCTGGGCA	200/200	57
<i>Gys1</i>	CCCCTCTACTATGAGCCCT	TGCGATGTGTTCTCCATAA	200/200	57
<i>Acc2</i>	ACCGACTGAAGGACATACGG	ACGCTGAAGTAACCCACAC	200/100	57
<i>Cpt1b</i>	GTCGCTTCTCAAGGTCTGG	AAGAAAGCAGCACGTTTCGAT	200/200	57
<i>Cpt2</i>	TCCTCGATCAAGATGGGAAC	GATCCTTCATCGGGAAGTCA	200/200	57
<i>Lpl</i>	CAGAGTTTGACCGCTTCC	AATTTGCTTTCGATGTCTGAGAA	200/200	57
<i>Vldlr</i>	GAGCCCTGAAGGAATGCC	CCTATAACTAGGCTTTGAGATATGG	200/200	57
<i>Fabp3</i>	GACGAGGTGACAGCAGATGA	TGCCATGAGTGAGATCAGG	200/200	57
<i>Ppara</i>	GAGGGTTGAGCTCAGTCAGG	GGTCACCTACGAGTGGCATT	200/200	57
<i>Pgc1a</i>	CCGAGAATTCATGGAGCAAT	TTTCTGTGGTTTGGGTGTA	200/200	55-57
<i>β-actina</i>	AGCCATGTACGTGCCATCC	CTCTCAGCTGTGGTGAA	200/200	55-57

Tablas S2 y S3. Secuencias de los cebadores empleados para los estudios de expresión en HepG2, tabla S2, y C2C12, tabla S3. Junto con la secuencia se muestra la temperatura de fusión y concentración específica de cada pareja de cebadores.



