

Determinación del efecto de los factores de transcripción tipo Krüppel (KLFs) en la regulación de la expresión de los genes que condicionan para los receptores de proliferación de peroxisomas (Ppars), en un modelo de esteatosis hepática no alcohólica in vitro

Escalona Nandez, Ivonne

2014

<http://hdl.handle.net/20.500.11777/1304>

<http://repositorio.iberopuebla.mx/licencia.pdf>

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA PUEBLA

Estudios con Reconocimiento de Validez Oficial por Decreto
Presidencial del 3 de Abril de 1981



Determinación del efecto de los factores de transcripción tipo Krüppel (KLFs) en la regulación de la expresión de los genes que codifican para los receptores de proliferación de peroxisomas (*Ppars*), en un modelo de esteatosis hepática no alcohólica *in vitro*.

DIRECTOR DEL TRABAJO

Dr. Juan Carlos Pérez Monter

Mtra. Claudia Rodríguez Hernández

ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO

Que para obtener el Grado de

MAESTRÍA EN NUTRICIÓN CLÍNICA

P R E S E N T A

IVONNE ESCALONA NANDEZ

Índice

Agradecimientos	1
Resumen	2
1. Planteamiento de la investigación	3
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Hipótesis.....	5
1.3 Objetivo general	5
1.4 Objetivos específicos.....	6
1.5 Justificación.....	6
2. Esteatosis hepática no alcohólica.....	8
2.1 Etiología.....	8
2.2 Fisiopatología.....	12
2.2.1 La influencia del estilo de vida y la dieta en el desarrollo de la NAFLD	15
2.2.2 Alteraciones en el metabolismo de los FA en la NAFLD	20
2.2.3 Resistencia a la insulina en la NAFLD	22
2.2.4 Lipotoxicidad en la NAFLD.....	25
2.3 Mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la NAFLD	26
2.3.1 Lipogénesis <i>de novo</i>	27
2.3.2 Transporte de lípidos alterado.....	30
2.3.3 Factores de transcripción	31
2.3.3.1 Proteína de unión al elemento de respuesta a esterol (SREBP)	32
2.3.3.2 Proteína de unión al elemento de respuesta a hidratos de carbono (ChREBP)	35
2.3.3.3 Los receptores activados por proliferación de peroxisomas (Ppars).....	36
2.3.3.4 Factores de transcripción tipo Krüppel	45
3. Marco metodológico.....	48
3.1 Cultivo celular y estímulos.....	48
3.2 Reacción de transcripción reversa y reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) 49	
3.2.1 Extracción de RNA total.....	49
3.2.2 Transcripción reversa (RT).....	51
3.2.3 Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	51
3.3 Tinción de rojo oleoso	52
3.4 Análisis de proteína por Western Blot	53
3.4.1 Extracción de proteína nuclear.....	53

3.4.2 Western-Blot.....	54
3.4.3 Análisis in silico	55
3.5 Ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIp)	56
3.5.1 Obtención y fragmentación de la cromatina soluble	56
3.5.2 Inmunoprecipitación	57
3.5.3 PCR-Punto final	59
4. Resultados.....	61
4.1 Desarrollo de un modelo de esteatosis in vitro	61
4.1.1 Análisis del perfil de expresión génica utilizando curvas tiempo-respuesta	62
4.1.2 Análisis de la acumulación de lípidos en un modelo de esteatosis in vitro.....	67
4.2 Características del modelo de esteatosis <i>in vitro</i> mediante el análisis de los niveles de expresión del RNAm y de la proteína de los factores de transcripción tipo Krüppel (KLFs) y los Ppars.....	69
4.3 Determinación del efecto a nivel transcripcional de los factores tipo Krüppel en las regiones promotoras de los genes que codifican para los Ppars en un modelo de esteatosis no alcohólica <i>in vitro</i>	75
5. Discusión	81
5.1 Análisis de la validación del modelo de esteatosis <i>in vitro</i>	81
5.2 Cambios en la expresión de los Ppars a nivel de RNA mensajero en el modelo de esteatosis <i>in vitro</i>	83
5.3 Interacción entre los Ppars y los KLFs en un modelo de esteatosis <i>in vitro</i>	85
6. Conclusiones.....	91
7. Recomendaciones.....	93
8. Glosario de términos.....	94
9. Abreviaturas	99
10. Anexos	103
11. Bibliografía	106

Agradecimientos

La presente tesis representa el esfuerzo de varias personas, ya que de forma directa o indirecta me han apoyado en el desarrollo de esta investigación, por lo que agradezco principalmente a mis padres y a Francisco Astudillo García por el apoyo incondicional que me han brindado.

Así mismo, agradezco a las personas que participaron en este trabajo, el Dr. Juan Carlos Pérez Monter, quien ha sido mi tutor y maestro en esta etapa, la Bióloga. Alma Estánes Hernández que me apoyó con la tinción de rojo oleoso, y la Q.F.B. Dafne Guerrero Escalera que me apoyó con los *Western Blots*.

Gracias a todos.

Resumen

La esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) se caracteriza por la acumulación anormal de lípidos en el parénquima hepático. Existen mecanismos moleculares involucrados en la fisiopatología de NAFLD en donde participan diversos genes, como la familia de los receptores proliferación de peroxisomas (Ppars). Se sabe que los Ppars participan en el metabolismo de los ácidos grasos. Existe evidencia de que la expresión de los Ppars es regulada por factores de transcripción tipo Krüppel (KLFs). Los KLFs regulan diversos procesos celulares, como la diferenciación, la proliferación y la muerte celular entre otros. Específicamente se sabe que los KLFs participan de forma activa en la diferenciación adipocítica, y en la fisiopatología de la fibrosis hepática y el hepatocarcinoma humano. No obstante el papel de los KLFs en los estadios tempranos de la enfermedad hepática, no está completamente claro. **Objetivo:** Determinar el efecto de los factores de transcripción tipo Krüppel en la expresión de los receptores tipo Ppars en un modelo *in vitro* de esteatosis hepática.

Materiales y métodos: La línea celular HepG2 se mantuvo utilizando medio DMEM/10% de FBS/1% de penicilina /estreptomicina, a 37°C y 5% de CO₂. La esteatosis se indujo por 24hrs y 12 hrs utilizando fructosa 10mM o ácido palmítico 300µM, respectivamente. Los niveles de cambio en la expresión génica se cuantificaron por PCR tiempo real y el método Delta-Ct. Para determinar si los Ppars son potenciales blancos de los KLFs, utilizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIp). Para determinar el nivel de esteatosis se utilizó la tinción de Rojo Oleoso, cuantificada por espectrofotometría a 510nm de células estimuladas. **Resultados:** Observamos que el estímulo con fructosa o palmítico indujo un incremento en la absorbancia a 510nm (fruct 1.29 ± 0.12 veces vs control 1±0.08; palm 1.55 ± 0.2 veces vs control 1 ± .075 p< 0.001), indicando que efectivamente nuestro modelo de esteatosis funciona. A nivel de RNAm, el estímulo con palmítico incrementa la expresión de PPARY, KLF5, KLF6, KLF9 y Ppara (1.47 ± 0.07 p<0.01, 4.14 ± 0.81 p<0.01, 1.90 ± 0.19, 1.87 ± 0.16, 1.55 ± 0.11, 1.27 ± 0.16, respectivamente vs control 1± 0.09). En el mismo sentido, el estímulo con fructosa indujo un incremento de la expresión de los mismo genes (1.28 ± 0.16, 2.58 ± 0.40, 1.19 ± 0.07, 1.26± 0.10, 1.40 ± 0.16 vs control, respectivamente). De manera interesante observamos que la unión basal de los KLFs, específicamente KLF5, disminuye su interacción con las regiones promotoras de Pparβ; mientras que, KLF5 y KLF9 aumentan su interacción con las regiones promotoras con Pparγ, en respuesta al estímulo esteatósico, sugiriendo que los KLFs pueden regular directamente la expresión de los Ppars. **Conclusiones:** El estímulo con fructosa o palmítico en las células HepG2, induce incrementos en la expresión de genes lipogénicos como Pparγ, KLF5, KLF6 y KLF9; mientras que la expresión de Pparβ, un factor crucial para el proceso de la β-oxidación, disminuye. Identificamos una posible función de KLF5, KLF6 y KLF9 en el desarrollo de la esteatosis en respuesta de la fructosa o ácido palmítico. En conjunto, nuestros datos indican que los KLFs regulan la expresión de los Ppars en condiciones esteatósicas.

1. Planteamiento de la investigación

1.1 Planteamiento del problema

La obesidad es una enfermedad que se ha convertido en una epidemia a nivel mundial. En México, de acuerdo con la encuesta nacional de salud y nutrición (Ensanut) del 2006, el 71.4% de la población de nuestro país presenta problema de peso: el 37.2% tiene sobrepeso y 34.2% padece obesidad. Lo que se observó en la Ensanut del año 2012 es que 70.5% de la población mexicana ha incrementado sus problemas de peso, ya que 35.3% tienen sobrepeso y 35.2% padecen obesidad ¹.

La obesidad se considera una enfermedad crónica que conlleva al desarrollo de otras patologías como por ejemplo: enfermedades cardiovasculares, dislipidemias, enfermedades hepáticas, resistencia a la insulina (síndrome metabólico, diabetes tipo 2), por mencionar algunas. Hablando de forma más específica, las funciones hepáticas se ven alteradas por la obesidad, promoviendo el desarrollo de la esteatosis no alcohólica (NAFLD, por sus siglas en inglés), el cual se considera el primer estadio de la enfermedad hepática, sin embargo, el problema es que la NAFLD se considera una enfermedad progresiva ya que, en el caso de no ser tratada, puede progresar a esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), posteriormente puede progresar a la etapa de cirrosis, y un pequeño porcentaje de pacientes que desarrollaron cirrosis puede desarrollar cáncer hepático ^{2 3}.

De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en el año 2010 y el año 2012, las enfermedades hepáticas fueron la quinta causa de

muerte en México. Este problema afecta gravemente al segmento de la población económicamente activa de 25 a 65 años de edad, siendo la cuarta causa de muerte, lo que impacta fuertemente en la economía del país. En el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) el 25.9% de las defunciones se deben a enfermedad hepática, de las cuales el 4.1% provienen de pacientes hospitalizados, siendo la octava causa de muerte en este sector, el 9.1% fallecen en el área de terapia intensiva, siendo la segunda causa de muerte de esta área, y el 12.7% de los pacientes que ingresan a urgencias fallecen por enfermedades hepáticas. Por otra parte, en el INCMNSZ se ha reportado que en el periodo de 2000 al 2013 se han diagnosticado a 481 pacientes con NAFLD, de los cuales el 25.46% presentan obesidad, y el 18.99% tienen diabetes mellitus tipo dos.

Se sabe que la NAFLD es una enfermedad que deriva de la obesidad, la cual se caracteriza en el alto consumo de calorías y una baja actividad física. Definitivamente el alto consumo de bebidas endulzadas con jarabe de maíz con alta fructosa y el consumo de comida rápida, que frecuentemente tiene un alto contenido de grasas saturadas, se ha convertido en un problema para el desarrollo de la obesidad y por consecuencia de NAFLD.

Son varios los genes que participan en la fisiopatología de la NAFLD; entre los que destacan los receptores de proliferación activados por peroxisomas (Ppars). Sin embargo, no se sabe que genes son los que están regulando la expresión de estos receptores durante la enfermedad hepática temprana. Lo que se postula en esta investigación es que los factores de transcripción tipo Krüppel (KLFs) pueden ser los encargados de la regulación de los Ppars. Este postulado

se propone en base a la evidencia de que los KLFs regulan la expresión de los Ppars en el proceso de adipogénesis.

Los KLFs participan en la fisiopatología de las enfermedades hepáticas tardías, como la fibrosis y el hepatocarcinoma. Sin embargo, no se tiene claro que los KLFs participen en los estadios tempranos de la enfermedad hepática, como la NAFLD.

Con respecto a lo anterior, no se han realizado estudios que muestren una relación transcripcional entre los KLFs y los Ppars; además, tampoco existe información suficiente acerca de los posibles reguladores de la expresión de los Ppars en la NAFLD.

La pregunta que surge respecto a los mecanismos moleculares que regulan la progresión de la NAFLD es: ¿Cuál es el efecto que tiene los KLFs en la regulación de la expresión de los Ppars en la NAFLD?

1.2 Hipótesis

Los factores de transcripción tipo Krüppel regulan la expresión de los receptores activados de proliferadores de peroxisomas (Ppars), por lo tanto, participan en la fisiopatología de la NAFLD *in vitro*.

1.3 Objetivo general

Determinar el efecto de los factores de transcripción tipo Krüppel en la expresión de los receptores Ppars en un modelo de esteatosis no alcohólica *in vitro*.

1.4 Objetivos específicos

- 1.- Desarrollar un modelo de esteatosis hepática no alcohólica *in vitro*.
- 2.- Caracterizar el modelo de NAFLD *in vitro* mediante el análisis de los niveles de expresión del RNA y la proteína de los factores de transcripción tipo Krüppel (KLFs) y los Ppars.
- 3.- Caracterizar la funcionalidad de los elementos de respuesta tipo Kruppel en las regiones promotoras de los genes Ppars.

1.5 Justificación

El estudio de la obesidad y de sus enfermedades secundarias es importante para entender mejor los mecanismos que facilitan su aparición y progresión; así como para establecer una mejor estrategia en el tratamiento de dichas patologías y desarrollar programas efectivos para la prevención de estas.

Los genes que modulan el metabolismo de los lípidos en el hígado son diversos, y algunos de estos son los Ppars, los cuales se ve modificada su expresión por los procesos metabólicos alterados en la NAFLD. Así mismo, los genes que se encuentran río arriba de los Ppars también se ven modificados en su expresión, contribuyendo a la patogénesis de esta enfermedad.

Lo anterior destaca la relevancia del estudio de estos receptores nucleares en la NAFLD, ya que tienen implicaciones en el desarrollo de esta enfermedad; sin embargo, no está del todo claro cuáles son los genes que se encuentran río arriba

de los Ppars en la fisiopatogénia de la NAFLD, y cuáles son los genes que regulan la expresión de los Ppars en el primer estadio de la enfermedad hepática.

Se considera que es importante el estudio de la NAFLD ya que contribuirá a entender los mecanismos por los cuales se almacenan los lípidos en el parénquima hepático, e identificar los genes y las vías de señalización que participan en este proceso, de tal forma que se puedan identificar potenciales blancos terapéuticos. Actualmente, no existe un tratamiento estándar para la NAFLD, no obstante, las modificaciones en el estilo de vida, la dieta y el ejercicio físico moderado, así como algunos medicamentos, pueden contribuir a disminuir los síntomas de las personas con obesidad; sin embargo, el tratamiento para la NAFLD se enfoca a tratar las afecciones asociadas como la obesidad o la resistencia a la insulina, pero no a la NAFLD como tal.

El presente estudio no sólo tendrá beneficios en el área fisiológica, con la identificación de los genes que participan, sino también se benefician los individuos que padecen NAFLD, ya que al encontrar potenciales blancos terapéuticos, se podrían desarrollar medicamentos eficaces para el tratamiento de esta enfermedad y evitar la progresión a esteatohepatitis o cirrosis.

2. Esteatosis hepática no alcohólica

2.1 Etiología

La esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD, por sus siglas en inglés) fue descrita por primera vez en 1958 por Westwater y Fainer, ⁴; sin embargo, no fue hasta 1979 que Adler y Schaffner describieron el hígado graso, la hepatitis y la cirrosis imitando las enfermedades hepáticas alcohólicas pero en un grupo de pacientes con sobrepeso, comúnmente con diabetes y anormalidades lipídicas ⁵. Al siguiente año, en 1980, fue Ludwig quien acuñó el término esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés) para describir la patología encontrada en un grupo de pacientes obesos que con frecuencia presentaban diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (Revisado en:²).

La NAFLD se define como la acumulación anormal de triglicéridos (TG) en el citoplasma de más del 5% de los hepatocitos del parénquima hepático. Es una patología que se desarrolla en personas cuyo consumo de alcohol es de <20g/día en mujeres y <30g/día en hombres ^{3, 6, 7}.

Se considera que una de las principales causas de la NAFLD es la obesidad, por lo que su prevalencia se ha incrementado en paralelo con la prevalencia de obesidad; además, ambas patologías están estrechamente ligadas a la resistencia a la insulina. La NAFLD se presenta en el 50 a 60% de los pacientes con DMT2 y en más del 45% de personas que padecen diabetes mellitus tipo 1 (DMT1). La resistencia a la insulina promueve la acumulación de lípidos en el hígado lo cual provoca daño hepático; dicha acumulación de lípidos

hepáticos estimula la liberación de citocinas que promueven la resistencia a la insulina en el hígado ⁶. Además de la obesidad, existen también otros factores que inducen al desarrollo de la enfermedad hepática, de los cuales, se destacan algunos en la tabla 1.

Tabla 1. Factores asociados al desarrollo de la NAFLD

Factores Asociados	Causas
Resistencia a la insulina	Obesidad, estilo de vida sedentario, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial, dislipidemias, obesidad mórbida.
Fármacos	Tamoxifeno, corticosteroides, Amiodarona, metotrexato, estrógenos sintéticos, ácido valproico, medicamentos retrovirales, bloqueadores de los canales de calcio, maleato perhexilina, cloroquina.
Alteraciones metabólicas y procedimientos quirúrgicos	Pérdida de peso rápida, nutrición parenteral total, derivación yeyunoileal, inanición aguda, intestino corto, derivación biliopancreática, resección extensa del intestino delgado, gastroplexy.
Enfermedades congénitas	Abeta/Hipobetalipoproteinemia, enfermedad de Wilson, Lipodistrofia, enfermedad de Andersen, síndrome de Weber-Christian.
Infecciones	Infección crónica por el virus de la hepatitis C (principalmente el genotipo 3), VIH.
Otras condiciones asociadas	Síndrome de ovario poliquístico, hipotiroidismo, hipopituitarismo, hipogonadismo.

Modificado de: ^{7,8}.

La NAFLD es la enfermedad hepática más frecuente en el mundo, y está estrechamente relacionada con la acumulación de tejido adiposo en el área

visceral (obesidad abdominal), la resistencia a la insulina, así como la intolerancia a la glucosa o DMT2 ⁹. Como la mayoría de las enfermedades metabólicas, la principal base del desarrollo de la NAFLD, la constituyen los cambios en el estilo de vida como el sedentarismo y los malos hábitos de alimentación ¹⁰. En países desarrollados y emergentes el alto consumo de alimentos con un contenido elevado de calorías, así como bebidas endulzadas con jarabe de maíz de alta fructosa, se asocian con este padecimiento.

La NAFLD se considera una condición crónica y progresiva ya que en caso de no ser tratada puede derivar hacia NASH, el estadio donde se observa inflamación, balonamiento de los hepatocitos con cuerpos de Mallory y depósitos de colágeno (fibrosis). Posteriormente, puede progresar a cirrosis, en donde el tejido hepático es remplazado por tejido cicatrizante y finalmente culmina en cáncer hepático (**Figura 1**) ^{2,3,11}.

La teoría de la patogénesis de la NAFLD se basa en la hipótesis de los “2 hits” la cual establece que la esteatosis es el primer “hit”, y que consiste en la acumulación de TG en el hígado, sensibilizando este órgano para el desarrollo de la lesión mediada por el segundo “hit”, que consiste en la presencia de citocinas inflamatorias, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, lo que a su vez conduce a la esteatohepatitis y/o fibrosis (**Figura 1**) ¹².

Los pacientes con NAFLD normalmente son asintomáticos, pero los síntomas que se podrían manifestar son: dolor en el cuadrante superior derecho, malestar general, náuseas y hepatomegalia. ⁸. La NAFLD se puede diagnosticar por medio de una biopsia de hígado y es la única forma para poder diferenciar la esteatosis de la esteatohepatitis, con o sin fibrosis. Sin embargo, este examen

invasivo no siempre es requerido debido a las complicaciones inherentes al procedimiento. Por lo que en una prueba de imagen como la ecografía, la tomografía, o la resonancia magnética son útiles para identificar si existe infiltración de grasa en el hígado ².

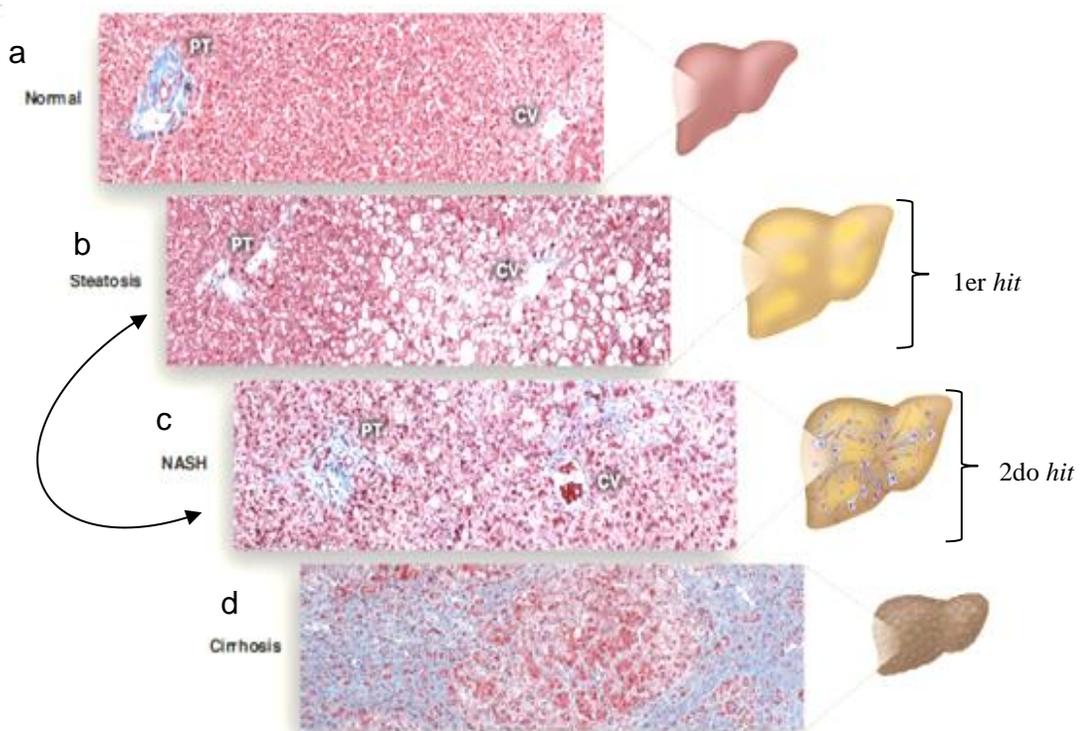


Figura 1. Historia natural de la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) basada en la hipótesis de los dos "hits". Las características histológicas de un hígado normal (a) se pueden modificar en el proceso de la NAFLD. El primer "hit" consiste en la acumulación de triglicéridos como gotas de lípidos dentro del hepatocito es la causa de la esteatosis (b). Mientras que el segundo "hit" es la esteatosis asociada con la inflamación, muerte celular y fibrosis se refiere a la esteatohepatitis (NASH) (c) un proceso que puede ser reversible. El estadio de NASH puede progresar a cirrosis. La cirrosis es donde el daño hepático no es reversible, y la función hepática está totalmente alterada (d); así mismo, la cirrosis tiene un riesgo alto de derivar en cáncer hepático. Las fibras de colágeno son las manchas azules que se han teñido con tricrómico de Masson. Se muestra la triada portal (PT), que consiste en la arteria hepática, la vena porta y el conducto biliar, y la vena central (CV). Modificada de: ³.

2.2 Fisiopatología

La NAFLD surge por un desequilibrio entre la importación, la síntesis, la utilización y la exportación de TG en el hígado, la acumulación intracelular de TG ocurre como consecuencia del aumento en la absorción de lípidos por la alta tasa del proceso de lipólisis que ocurre en el tejido adiposo, así como del incremento en la síntesis *de novo* de los ácidos grasos (FA, por sus siglas en inglés), dentro del propio hepatocito o bien por la síntesis o el proceso de secreción de las lipoproteínas y la reducción en la oxidación de FA (**Figura 2**)^{3,13}. Los FA acumulados en el citoplasma del hepatocito en el curso de la NAFLD, pueden tomar tres formas principales: a) esteatosis macrovesicular, caracterizada por gotas grandes de grasa que llena el citoplasma, desplazando al resto del contenido de la célula y el núcleo; b) esteatosis microvesicular, caracterizada por gotas pequeñas de grasa; y c) la esteatosis macrovesicular y microvesicular, una mezcla de gotas de grandes y pequeñas de grasa¹¹.

Para entender el mecanismo de acumulación de lípidos en el hígado, se debe de tener claro cuál es la función del hígado en el metabolismo de los lípidos. El hígado no es un órgano que funciona como almacenador de TG en condiciones fisiológicas estables, la concentración de TG hepáticos son bajos; sin embargo, hay un considerable tráfico tanto de TG como de FA dentro y fuera del hígado en respuesta a la alimentación y al ayuno¹⁴. Estos FA que provienen de la dieta se absorben en el intestino delgado, se ensamblan en TG y se incorporan a los quilomicrones. Estos son secretados a los vasos linfáticos y entran al plasma como quilomicrones ricos en TG, donde del 70% de los FA se van principalmente

al tejido adiposo, y el restante es consumido por el hígado. Los FA normalmente son transportados a varios órganos, incluyendo el músculo esquelético, el tejido adiposo y el hígado. Los FA que se van al hígado se pueden convertir en otra clase de lípidos, tales como gliceroles, glicerofosfolípidos y esteroides, los cuales son empaquetados en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés). Además, en condiciones de ayuno, los FA son liberados del tejido adiposo y son enviados al músculo esquelético, cardíaco o al tejido adiposo pardo en donde son oxidados por las mitocondrias a través de la β -oxidación para generar energía o para generar calor ^{14 15}.

En condiciones de obesidad, principalmente visceral, el metabolismo de los lípidos se altera, debido a que existe un estado de inflamación crónica caracterizado por el aumento en los niveles de citocinas circulantes en el plasma asociadas con la activación de las vías de señalización pro-inflamatorias. Existe evidencia que indica que la hipertrofia y la hiperplasia de los adipocitos genera resistencia a la insulina en el tejido adiposo, principalmente en el tejido adiposo visceral ¹⁶. Esta condición de hipertrofia e hiperplasia genera un estado de lipólisis incrementada, lo que contribuye a liberar un exceso de FA a la circulación, incrementando la entrada de ácidos grasos libres (FFA) hacia el hígado, lo que produce un desequilibrio en el metabolismo de las grasas, provocando la acumulación de TG en el hígado **(Figura 2)** ¹⁵.

El desarrollo de la NAFLD es multifactorial, destacando los hábitos de alimentación, las alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos, la resistencia a la insulina, lipotoxicidad, entre otros. A continuación se describen estos factores.

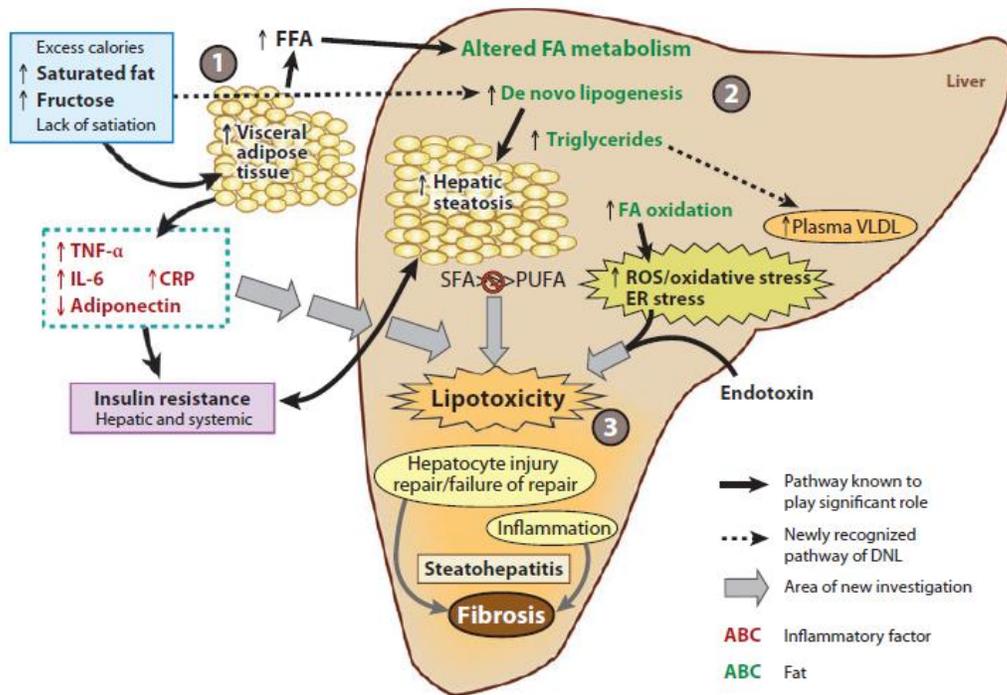


Figura 2. Modelo de las alteraciones metabólicas en la enfermedad hepática. Existen tres componentes mayormente involucrados en el desarrollo de la NAFLD **1)** el incremento del tejido adiposo visceral (VAT) y alteración sistémica y resistencia a la insulina; **2)** alteración en el transporte, oxidación y desaturación de los ácidos grasos (FA) dentro del hígado, y **3)** la iniciación y subsecuente efecto de la lipotoxicidad. Las flechas negras resaltan las vías que se sabe que juegan un papel importante en el desarrollo de la NAFLD. La flechas grises indican las áreas que están siendo investigadas y destacan el trabajo en desarrollo que muestran que la NAFLD y la esteatopatitis no son procesos necesariamente independientes. El incremento en el consumo de calorías, en combinación con el incremento en el consumo de ácidos grasos saturados y fructosa llevan al incremento de VAT; el consumo de fructosa también estimula la lipogénesis *de novo* (DNL) y no permite la señalización de saciedad que se produce con la glucosa. El VAT es un tejido metabólicamente activo y produce numerosas citocinas pro-inflamatorias [factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina-6 (IL-6) y proteína reactiva-C (CRP)] y está asociado con la disminución de adiponectina, la cual es una citocina anti-inflamatoria. El VAT también incrementa la liberación de ácidos grasos libres (FFA) en el hígado por la circulación portal, resultando en un incremento del metabolismo de FA en del hígado. La DNL aumenta la re-esterificación de los triglicéridos (TG), e incrementa la oxidación, la cual se ve afectada. La circulación de citoquinas pro-inflamatorias del VAT, la falta de desaturación apropiada de los ácidos grasos saturados (SFA) a poliinsaturados (PUFA), el incremento de la especies reactivas de oxígeno (ROS) del estrés oxidativo y el estrés del retículo endoplásmico, y el incremento de la endotoxinas portal, es un estímulo total que participan en el papel de la lipotoxicidad. Abreviaturas: VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. Tomada de: ¹¹.

2.2.1 La influencia del estilo de vida y la dieta en el desarrollo de la NAFLD

El aumento acelerado de la prevalencia de la obesidad y de NAFLD en las últimas décadas se ha propiciado por los cambios en el entorno que condicionan al aumento del aporte energético y la disminución de la actividad física, poniendo en riesgo a toda la población, incluso a las personas que no tengan una disposición genética ¹⁷.

En las sociedades actuales existe una amplia oferta de alimentos relativamente barato y de fácil disponibilidad. Más aún, presentamos una tendencia generalizada a aumentar el tamaño de las raciones, induciendo al consumo de alimentos en exceso ¹⁸. En la población mexicana se han presentado varias modificaciones en sus patrones de alimentación caracterizada por un aumento en el consumo de alimentos ricos en colesterol, grasas saturadas, azúcares, sodio y el incremento del consumo de refresco y bebidas que están endulzados con jarabe de maíz de alta fructosa. Asociado a estos cambios, se ha observado un aumento en las enfermedades crónicas relacionadas con la nutrición, como la obesidad, la DM2 y la NAFLD ¹⁹.

El sedentarismo es un factor crucial que contribuye al desarrollo de la obesidad y sus enfermedades asociadas. La falta de actividad física promovida por los avances tecnológicos y la mecanización creciente tanto de los medios de transporte como de las actividades del tiempo libre o del trabajo, serían los principales factores asociados a un menor gasto de energía. Aunado a lo anterior, tenemos que la televisión, los juegos electrónicos y los ordenadores, han contribuido a un aumento en el sedentarismo, tanto en niños, como en adultos; y a

esto se le adiciona que en estas actividades con frecuencia se acompañan del consumo de alimentos con un alto valor calórico ^{17,20}.

Hablando específicamente de los hábitos de alimentación, los cambios en la composición de la dieta promueven la ganancia de peso teniendo como consecuencia el incremento del riesgo al desarrollo de NAFLD. Los FA son una de las macromoléculas relacionadas con estos cambios en el estilo de vida, estas grasas son componentes esenciales en la dieta de los humanos, sin embargo, una dieta alta en grasa o un desbalance en el tipo de grasas tiene efectos adversos en la salud. Los ácidos grasos (FAs) son moléculas hidrofóbicas que en el cuerpo humano tiene dos principales funciones, la primera es que son fuente importante de energía metabólica y sirven para la construcción de la membrana celular; además son precursores de moléculas bioactivas, por ejemplo, prostaglandinas y otras hormonas ²¹. La ingesta de FA en la dieta es la mayor fuente de estas moléculas, pero también pueden ser generados a partir de la síntesis *de novo* por el metabolismo derivado del catabolismo de azúcares y proteínas ²².

Los FA más abundantes en la naturaleza tienen de 16 a 18 carbonos, estos FA se dividen principalmente en ácidos grasos saturados (SFA) como el ácido palmítico, láurico o ácido butírico, también están los ácidos monoinsaturados (MUFAs) como el ácido oleico, ácido erúcico y finalmente están los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como el ácido graso linoléico, omega 3, omega 6 ²³; estos FA se diferencian por sus enlaces entre carbonos, los SFA tienen enlaces simples entre sus carbonos, mientras que los MUFAs tienen un doble enlace y los PUFAs tienen más de un doble enlace ²². El aumento en la ingesta de lípidos resulta en exceso de energía favoreciendo la acumulación de grasa visceral, e

incrementando el flujo de FFA hacia hígado, lo que promueve la NAFLD. El aumento de la ingesta de SFA favorece el desarrollo de la resistencia a la insulina, la DMT2 y enfermedades cardíacas ²⁴. Se ha reportado además que el alto consumo de SFA es mayor en pacientes con NAFLD y NASH que en pacientes sanos, esto se explica porque los SFA tienen efectos adversos en la homeostasis de la glucosa y de los lípidos, lo cual favorece el desarrollo de NAFLD y a su vez promueve la progresión a NASH ²⁵.

Los SFA se consideran grasas perjudiciales para la función hepática en comparación con los PUFAs, ya que incrementan el flujo de lípidos hacia hígado, y modifican los niveles de insulina en el plasma, induciendo la resistencia a la insulina y afectando la función mitocondrial; además, sus productos metabólicos promueven la hepatotoxicidad, debido a la incapacidad de ser esterificados y formar TG ²⁶.

Por otra parte, en pacientes con NAFLD el consumo de los PUFAs es muy bajo en comparación con la población sana, sugiriendo que la deficiencia de este tipo de grasas está involucrada en el desarrollo y la progresión de la NAFLD. Estas grasas tienen efectos benéficos a la salud, como promover la sensibilidad a la insulina en el hígado, disminuir las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos no esterificados, la lipogénesis *de novo*, el tamaño y el contenido de los adipocitos del área visceral, la activación de las células de Kupffer, así como la expresión de genes involucrados con la inflamación y producción de citocinas inflamatorias ^{24,27}. Tomando en cuenta lo anterior se puede concluir que los PUFAs tienen un efecto protector en el desarrollo y progresión de la NAFLD.

Por otro lado, el consumo excesivo de fructosa, es otro factor detonante para el desarrollo de la NAFLD, ya que promueve el almacenamiento de grasa visceral y la hipertrigliceridemia; siendo las fuentes principales de fructosa las bebidas carbonatadas, los jugos procesados y los procesos industriales de la comida rápida ²⁸. Interesantemente, se ha observado una creciente prevalencia de obesidad y síndrome metabólico en paralelo con el incremento en el consumo de jarabe de maíz de alta fructosa; se sabe que antes de 1970 el consumo *per capita* del jarabe de maíz de alta fructosa a nivel mundial era esencialmente nulo, sin embargo, el consumo aumentó de manera espectacular en 1980s y para el 2000. Actualmente el consumo *per capita* de alta fructosa por día es de 91.6gr, representando el 42% de todas la calorías endulzadas ².

La fructosa se metaboliza de una forma distinta a la glucosa; de forma específica, la glucosa es transportada a través del borde del cepillo intestinal por un sistema específico de transportadores como GLUT4 el cual es dependiente de Na⁺ ²⁹; sin embargo, la fructosa se absorbe en el duodeno y el yeyuno por medio del transportador GLUT2 o GLUT5, los cuales no son dependientes de Na⁺ ²⁹. A diferencia de la glucosa que depende de la insulina para poder ingresar a las células, la fructosa se mueve a través de las membranas plasmáticas de los hepatocitos por medio de GLUT2 o GLUT5, de forma independiente de insulina. Una vez que entra a la célula, la fructosa es transformada a fructosa-1-fosfato (F1P) por acción de la fructocinasa (FK) y es convertida en acetil-coenzima A (Ac-CoA), que a su vez es un precursor del diacil-glicerol (DAG) **(Figura 3)** ³⁰. De esta forma la fructosa puede entrar continuamente a la vía glucolítica, incrementando las concentraciones de G3P y Acetil-CoA, proporcionando grupos glicerol y

precursores de triacilgliceroles. En contraste, el metabolismo hepático de la glucosa se limita por la capacidad de almacenar glucosa como glucógeno y más importante aún, por la inhibición de la glucólisis regulada por la fosfofructocinasa²⁹. Adicionalmente, cuando las mitocondrias de las células hepáticas no pueden metabolizar el exceso de acetil-CoA, este pasa al citosol en forma de citrato, promoviendo la lipogénesis *de novo*, lo que a su vez incrementa los niveles de TG, y la adiposidad en el área visceral^{30 28}.

La dieta tiene un papel crucial para el desarrollo de la NAFLD, ya que el aumento en el consumo de hidratos de carbono simples y grasas saturadas, alteran el metabolismo de los FA; así mismo, disminuyen la sensibilidad a la insulina e incrementan los niveles sérico de FFA, lo que promueve el desarrollo de NAFLD. Debido a lo anterior, la pérdida de peso se considera crucial para el tratamiento de la NAFLD y se recomienda una dieta saludable, actividad física y cambios en el estilo de vida³¹.

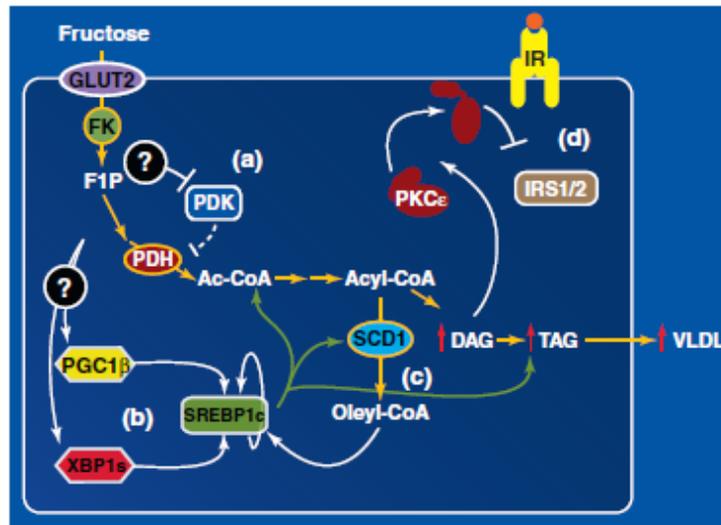


Figura 3. Modelo general del metabolismo de la fructosa. La fructosa promueve la lipogénesis por (A) el incremento en la actividad de piruvato dehidrogenasa (PDH), (B) por la inhibición de la piruvato dehidrogenasa cinasa (PDK) y el incremento en la estimulación del regulador de la proteína de unión al elemento de esteroides 1c (SREBP1c) mediado transcripcionalmente por el coactivador 1-beta del receptor activado por proliferación de peroxisomas gamma (PGC1 β) y la proteína de unión 1X (XBP1). SREBP1c regula la expresión de enzimas que participan en la lipogénesis y la síntesis y secreción de triglicéridos. (C) SCD1 desatura a acil-CoA para producir ácidos grasos monoinsaturados, tales como oleil-CoA, el cual también podría incrementar la expresión de SREBP1c. (D) La acumulación de diacilglicerol (DAG) activa a la proteína cinasa tipo C ϵ (PKC ϵ), la cual interfiere con la señalización de la insulina, promoviendo la resistencia a la insulina en el hígado. Tomada de: ⁴⁴

2.2.2 Alteraciones en el metabolismo de los FA en la NAFLD

Como ya se indicó la NAFLD se caracteriza por la acumulación de TG en el parénquima hepático; las fuentes de FA que contribuyen al desarrollo de esta enfermedad hepática son:

- 1) La liberación de FA en el plasma proveniente del tejido adiposo periférico hacia el hígado. Los FFA en el plasma se consideran la principal fuente de los FA que fluyen del tejido adiposo hacia el hígado en el estado de ayuno, y representan la mayor fuente de TG intrahepáticos ³².
- 2) Los FA provenientes de la lipogénesis *de novo* ³².

3) Los FA de la dieta, los cuales pueden entrar al hígado a través de quilomicrones derivadas del intestino delgado ³².

En este sentido, los FA provenientes de la dieta, principalmente TG y el exceso de hidratos de carbono que en el organismo de los mamíferos son convertidos en FFA, son transportados al hígado y almacenados en el tejidos adiposo como TG re-esterificados, o usados como una fuente de energía por el músculo. Durante periodos de ayuno, los TG almacenados en el tejido adiposo son hidrolizados a FFA y transportados al hígado en donde son usados para formar fosfolípidos, colesterol o convertidos en cuerpos cetónicos para ser usados como combustible en el tejido extra hepático ⁷. La acumulación excesiva de grasa en el hígado ocurre en respuesta a un incremento en la liberación de FFA derivados del tejido adiposo, incremento de la ingesta de FA en la dieta, incrementado de la lipogénesis *de novo*, reducción en la oxidación de los FA y disminución en la producción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y VLDL ^{7,33}. El incremento en los FFAs provoca resistencia a insulina, debido a que provocan que se generen fallas en la liberación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las cuales son el producto de la esterificación de los FFAs en condiciones normales, desde el hígado hacia el torrente sanguíneo; esto contribuye a la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos ³⁴

Por otra parte, la resistencia a la insulina promueve la lipólisis del tejido adiposo e hiperinsulinemia. La lipólisis periférica moviliza los FFA e incrementa el consumo de FA en el hígado promoviendo la acumulación de grasa, la glucógenolisis y el incremento en la síntesis de FFA, mientras que simultáneamente, inhibe la β -oxidación mitocondrial de los FA. Así mismo, la

hiperinsulinemia también favorece la acumulación de TG hepáticos por la disminución en la capacidad del hígado de re-esterificar los TG y su salida del hepatocito para su almacenamiento en el tejido adiposo; por esta razón, la resistencia a la insulina se considera el mecanismo central en el desarrollo de la NAFLD (**Figura 4**)⁷.

2.2.3 Resistencia a la insulina en la NAFLD

La resistencia a la insulina se define como un desajuste en la capacidad de la insulina para regular el metabolismo de la glucosa y los lípidos. Es un defecto temprano y crucial asociado con la obesidad y la DMT2, así como en otros desórdenes del metabolismo³⁵.

Se ha postulado que la alteración en el metabolismo de los lípidos tiene como mecanismo central el desarrollo de la resistencia a la insulina, debido a que la causa de esta anomalía es por defectos en la señalización de la insulina a nivel intracelular³⁶.

En individuos sanos, la unión de la insulina a su receptor induce la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS)-1, -2, -3 y -4, los cuales propagan la señalización de la insulina¹². La activación del IRS-1 e IRS-2 activa la vía intracelular de la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K) y AKT/PKB (proteína cinasa B), las cuales están íntimamente involucradas en la mediación del efecto metabólico de la insulina¹². En última instancia, los resultados de la activación de AKT/PKB inducen la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática, facilitando así la absorción de glucosa. La insulina tiene

una potente acción en la supresión de la lipólisis en el tejido adiposo; sin embargo, en condiciones de resistencia a la insulina, tal como la NAFLD, esta supresión se altera, resultando en el incremento del flujo de FFA provenientes del tejido adiposo hacia el hígado ¹²

Por otra parte, la obesidad incrementa la producción de la citosina con actividad pro-inflamatoria TNF α en los adipocitos, lo que facilita la resistencia a la insulina en estas células e incrementa la lipólisis; así que, FFA circulantes se incrementan en individuos con obesidad y se considera la mayor cantidad de lípidos hepáticos almacenados en la NAFLD ³⁷.

La resistencia a la insulina es un factor clave en la patogénesis de la NAFLD, ya que es el causante del desbalance entre los factores que favorecen la acumulación de lípidos en el hígado y los mecanismos de oxidación de los lípidos en este órgano ⁶. En modelos animales de NAFLD se ha identificado que la resistencia a la insulina es causa de la inflamación, la activación de estrés del retículo endoplasmático y la acumulación hepatocelular de lípidos ³⁴; así mismo, incrementa la lipólisis en el tejido adiposo periférico y el incremento en el consumo de FA de los hepatocitos, por lo que se establece un círculo vicioso en donde la inflamación provoca resistencia a la insulina, y esta misma provoca que incremente en el contenido de los FA hepáticos por la hiperinsulinemia, y la elevación en la producción de apolipoproteína B-100 y la glicólisis lleva a la exportación de FA como VLDL, por lo tanto, un incremento en el contenido de FA y TG en el hígado **(Figura 4)** ³⁶.

La hiperinsulinemia y la hiperglucemia favorecen la expresión de factores de transcripción que participan en la lipogénesis, incluyendo SREBP1c y ChREBP

(ver sección 2.3.4.1 y 2.3.4.2, respectivamente), los cuales promueven la lipogénesis *de novo* ⁶. La activación de SREBP1c mediada por la insulina incrementa los niveles de malonil-CoA e inhibe la oxidación de los FFA intrahepáticos ⁶.

Sin embargo, aún no se tiene claro si la resistencia a la insulina es la causante de la acumulación de lípidos en el hígado, o si el incremento de los lípidos y sus metabolitos intermedios podrías tener un papel causal en el desarrollo de la resistencia a la insulina sistémica y hepática ³⁸.

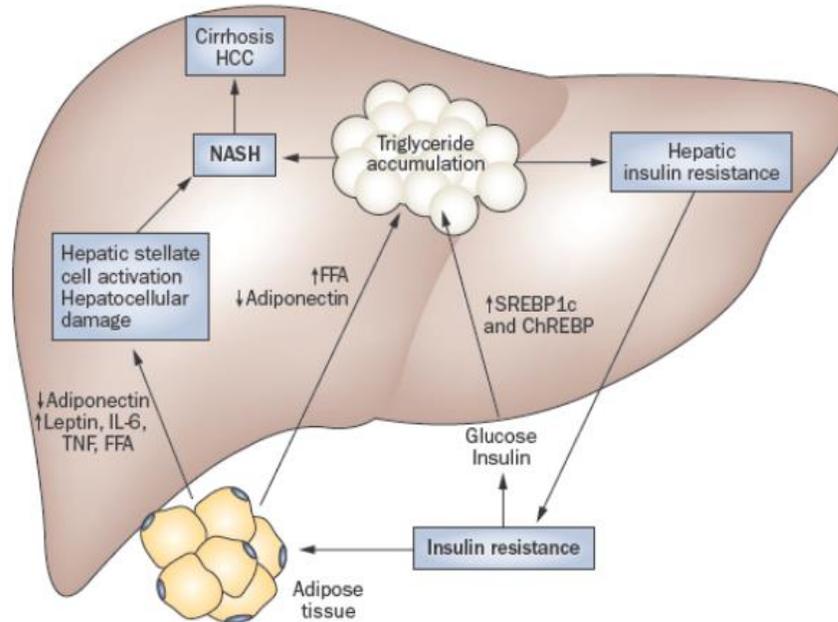


Figura 4. Modelo de resistencia a la insulina hepática. La resistencia a la insulina promueve la acumulación de los triglicéridos hepáticos por el incremento de lipólisis en el tejido adiposo y el flujo de ácidos grasos libres, así como incrementando los niveles de expresión de factores de transcripción lipogénicos en el hígado, como son, SREBP1c y ChREBP. Los ácidos grasos libres en el hígado exacerban la resistencia a la insulina hepática activando las vías de JNK1 y la vía del factor nuclear κ B. Esto provoca una retroalimentación positiva, lo que resulta en un círculo vicioso de aumento del contenido de triglicéridos hepáticos y resistencia a la insulina hepática. En algunos pacientes, la inflamación del tejido adiposo resulta en la liberación de múltiples citocinas pro-inflamatorias y fibróticas, lo cual, junto con la esteatosis induce estrés oxidativo y la activación de células esteladas en el hígado, causando NASH, fibrosis hepática y cirrosis. ChREBP, proteína de unión al elemento de respuesta a los hidratos de carbono (también conocida como MLXIPL); FFA, ácidos grasos libres; IL-6, interleucina 6; HCC, hepatocarcinoma; NASH, esteatohepatitis no alcohólica; SREBP1c, regulador de la proteína de unión al elemento de esteroides 1c; TNF, factor de necrosis tumoral. Imagen tomada de: ⁶.

2.2.4 Lipotoxicidad en la NAFLD

Como ya se indicó, la NAFLD se caracteriza por la acumulación de triglicéridos en el parénquima hepático; en paralelo a esta acumulación, el exceso de FFA causa lipotoxicidad por vía de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales promueven inflamación, apoptosis y la progresión a NASH y fibrogenesis ³⁷.

Se sabe que la lipotoxicidad es un factor que promueve la muerte celular, en el contexto de la NAFLD a este fenómeno se le llama lipoapoptosis; el fenómeno de muerte celular está asociado con el exceso de depósitos de lípidos en el hígado en los pacientes con NAFLD; así el grado de daño hepático se relaciona con la magnitud de lipoapoptosis ³⁹. La lipoapoptosis es el resultado fisiológico del incremento de los FFAs, de TGs, así como de diacilglicerol (DAG) en la circulación, lo que provoca estrés oxidativo y peroxidación de las membranas mitocondrial y plasmática, un evento que activa las células esteladas dentro del hígado, las cuales son mediadoras del proceso inflamatorio ⁴⁰

La exposición crónica de células y tejidos a concentraciones elevadas de FA, triglicéridos y colesterol genera efectos tóxicos que contribuyen a la patogénesis del síndrome metabólico (resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, etc.). Por lo tanto, la lipotoxicidad en el hígado puede ser vista como resultado del exceso de FFA ⁴¹. La lipotoxicidad hepática ocurre cuando la capacidad hepática de utilización, almacenamiento y exportación de los FA esta sobrecargada por el alto flujo de FA provenientes de la grasa visceral, o la lipogénesis *de novo* hepático. Más aún, alteraciones en la expresión del transportador de ácidos

grasos (FATP) y la proteína de unión ácidos grasos (FABP) determinan el flujo y la concentración de FA en el hígado, y de este modo, promueven la lipotoxicidad (Guzman C. et al., 2013. BBA) ⁴¹.

2.3 Mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la NAFLD

Los factores moleculares que están involucrados en la enfermedad hepática temprana involucran a varios genes (mTOR, SREBP1c, ChERBP, LXR, FATP, CD36, entre otros). En los siguientes apartados se describirá con más detalle el efecto que tienen estos genes en el desarrollo de la NAFLD.

La mayoría de los efectos adversos inducidos por la acumulación de FA son mediados por lípidos intermedios, en particular los diacilgliceroles (DAG) y las ceramidas ¹⁵. Este tipo de lípidos intermedios pueden inducir resistencia a la insulina por la activación de diferentes citosinas como el blanco de rapamicina en células de mamífero (mTOR), el inhibidor de la cinasa κB (IKK), la cinasa Jun N-terminal (JNK) y la proteína cinasa C (PKC), las cuales ejercen retroalimentación negativa sobre la señalización de la insulina ¹⁵. La PKC pertenecen a una familia de enzimas que se clasifican en tres grupos, las convencionales (α , βI , βII y γ), las nuevas (δ , ϵ , θ y η) y las atípicas (λ y ζ) (Newton, 2003). Los DAGs intracelulares inhiben la señalización de la insulina por la activación de PKC, esta bloquea la fosforilación de los receptores de insulina (IR) 1 y 2 ⁴².

En condiciones normales, la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 (PIRS1), activa a la proteína cinasa de fosfatidil-inositol 3 (PI3K); el

principal sustrato de la PI3K en la vía de señalización del receptor a insulina, es Akt2, una cinasa cuyo sustrato es la proteína AS160, un inhibidor de la translocación de GLUT4, encargado de tomar la glucosa del medio externo e introducirla al interior de la célula ⁴³. El incremento intracelular de DAG en el hepatocito, induce la activación de PKC ϵ , lo que provoca la fosforilación de IRS1 e IRS2 mediada por PI3K, que a su vez impide la activación de Akt2 y consecuentemente, la activación de GLUT4 provocando que la insulina no sea señalizada de forma adecuada ⁴⁴.

2.3.1 Lipogénesis *de novo*

La lipogénesis *de novo* es una vía metabólica que sintetiza FA a partir del exceso de hidratos de carbono. En condiciones normales la lipogénesis *de novo* tiene lugar principalmente en el hígado y el tejido adiposo, y colabora en el mantenimiento de la homeostasis de TG. Algunos estudios sugieren que la lipogénesis *de novo* en el hígado contribuye significativamente en el contenido de lípidos séricos en personas con una dieta alta en hidratos de carbono ⁴⁵.

En condiciones basales la contribución de grasa hepática por la vía de lipogénesis *de novo* es menor al 5%; sin embargo, en condiciones patológicas como la NAFLD, se ha reportado que la lipogénesis *de novo* hepática es una fuente significativa de depósitos de grasa en el hígado, de aproximadamente 30% ³³.

La actividad de las vías lipogénicas son dependientes de las condiciones nutricionales, y está claramente establecido que la transcripción de las enzimas

lipogénicas requieren tanto de la insulina como de la glucosa para ser inducidas. En esta vía de lipogénesis *de novo*, la glucosa dietaria es convertida en acetil CoA a través de la glicolisis y la oxidación del piruvato; acetil CoA después es convertida en malonil CoA por la acetil CoA carboxilasa (ACC), por otro lado, la sintetasa de ácidos grasos (FAS) cataliza la formación de ácido palmítico, de acetil CoA y malonil CoA. El ácido palmítico es después elongado y desaturado por elongasa de cadena larga 6 (ELOVL6) y esteroil CoA desaturasa1 (SCD1) para generar ácidos grasos monoinsaturados, los cuales son los principales FA que constituyen los TG. Glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) después cataliza la esterificación de glicerol-3- fosfato por la glicolisis con una nueva síntesis de FA para generar ácidos lisofosfatídicos; estos ácidos lisofosfatídicos son sustratos de 1 acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa (AGPAT) para catalizar la formación de ácidos fosfatídicos, así mismo, estos ácidos fosfatídicos son procesados a diacilgliceroles por lipina 1, seguido de la formación de TGs a través de acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) (**Figura 5**)¹⁴.

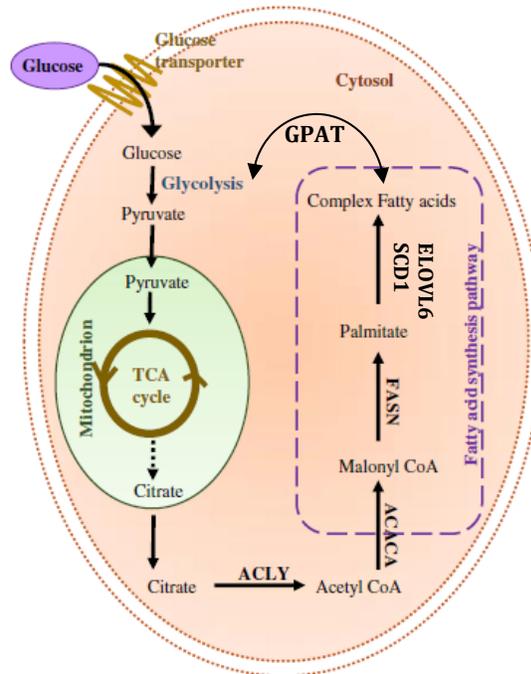


Figura 5. Esquema que ilustra la lipogénesis *de novo*: La glucosa es tomada por el transportador GLUT4, entra en la vía glicolítica y se genera piruvato. Este piruvato es convertido en citrato que sale de la mitocondria y es convertido en acetil-CoA por la enzima ATP-citrato liasa (ACLY). La acetil-CoA carboxilasa (ACACA) hidroliza la acetil-CoA para generar malonil-CoA, que después es utilizado como sustrato para la producción de palmitato saturado de 16 carbonos por la enzima biosintética el ácido graso sintasa (FASN), GPAT, glicerol-3fosfato-aciltransferasa; ELOVL6, enlongasa de cadena larga 16; SCD1, esterol-coenzima-A-desaturasa1. Modificado de: ⁴⁵.

La lipogénesis *de novo* mediada por la insulina y la glucosa actúan mediante la activación de dos factores de transcripción principales la proteína de unión al elemento de esteroides 1 (SREBP1c) y la proteína de unión al elemento de respuesta a hidratos de carbono (ChREBP). SREBP1c es un factor de transcripción que promueve la expresión de genes pro-lipogénicos, incluyendo a FAS, ACC, SCD1 entre otros ¹⁴. Así mismo, la expresión de SREBP1c es transcripcionalmente controlada por varios factores hormonales y nutricionales como la insulina que promueve su expresión, mientras que el glucagón tiene un efecto inhibitor ⁴⁶.

Por otro lado, ChREBP también juega un papel importante en la lipogénesis mediada por la glucosa en el hígado. La glucosa estimula la expresión de ChREBP, regulando su entrada desde el citosol al núcleo y mediante la unión a los elementos de respuesta de los hidratos de carbono (ChoRE), presentes en las regiones promotoras tanto de los genes lipogénicos, como de los glucolíticos. ChREBP se localiza en el citoplasma cuando las concentraciones de glucosa son bajas y entra al núcleo cuando las concentraciones de glucosa son altas. Así mismo, promueve la expresión de la piruvato cinasa (PK) en el hígado, proporcionando así más sustratos para la síntesis de triglicéridos ⁴⁶.

2.3.2 Transporte de lípidos alterado

El consumo de FA en el hígado contribuye a establecer el equilibrio constante de los triglicéridos hepáticos. La velocidad del consumo de FA del plasma a las células hepáticas depende de la concentración de FA plasmáticos y de la capacidad hepatocelular del consumo de éstos ¹⁴. La capacidad en la absorción de los FA depende del número y la actividad de proteínas de transporte en la membrana plasmática sinusoidal de los hepatocitos ⁴⁷.

Los principales transportadores de membrana plasmática de los FFA son las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP), como la translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36) y la proteína de unión a ácidos grasos (FABP) ⁴⁸. Hasta el momento se han identificado seis isoformas de FATP en células de mamíferos, de estas isoformas la FATP2 y la FATP5 se expresan en el hígado. Evidencia *in vivo* indica que la pérdida de la función de cualquiera de estas proteínas

transportadoras disminuye considerablemente la tasa del consumo de FA ^{49,50}. Por otro lado, la expresión de FAT/CD36 acelera la disociación de FA a la albumina, la cual es una proteína que acelera la absorción de FA, y su expresión se ve incrementada en la obesidad inducida por la dieta. Así mismo, la expresión hepática de CD36 se incrementa en pacientes con NAFLD, y es un mediador del aumento en la absorción de los FA no esterificados; así mismo, se ha observado que el aumento en la expresión de CD36 en modelos *in vivo* incrementa el contenido de triglicéridos hepáticos ⁵¹.

En contraste, los FABP son proteínas citosólicas de unión a lípidos que facilitan el transporte intracelular de FFAs, y se han identificado 9 isoformas, las cuales FABP4 y FABP5 son altamente expresadas en el hígado, y se han relacionado con la infiltración de grasa en el hígado de pacientes con NAFLD ⁵¹.

2.3.3 Factores de transcripción

Los factores de transcripción son proteínas que se unen al DNA reconociendo secuencias específicas en las regiones reguladoras de sus genes blanco, modulando la expresión de forma positiva o negativa, y por tanto, la subsecuente producción de la proteína codificada por el gen en cuestión ⁵². Del mismo modo, los factores de transcripción también pueden unirse a otros factores regulando el inicio de la transcripción.

Estos factores de transcripción se clasifican en familias con base en la estructura del dominio de unión al DNA, como los factores con dedos de zinc (*zinc*

finger), hélice-giro-hélice (HLH), cierre de leucinas (*leucine zipper*), homeodominio (*homeobox*), así como la familia de receptores nucleares, entre otros⁵³.

Los factores de transcripción regulan la expresión de los genes que participan en el control del flujo de FA proveniente del tejido adiposo periférico al hígado y regula varios pasos metabólicos cruciales en la patogénesis de la NAFLD, incluyendo almacenamiento de lípidos, la lipólisis, así como la exportación, y el consumo y oxidación de FA.

Debido a la importancia que tienen los factores de transcripción en la patogénesis de la NAFLD se describirá brevemente su relevancia en el metabolismo de los lípidos. En este apartado se discutirá el papel de los genes que se destacan en este estudio, con la finalidad de entender cuál es su relevancia en el contexto de la enfermedad hepática.

2.3.3.1 Proteína de unión al elemento de respuesta a esterol (SREBP)

Este factor de transcripción pertenece al grupo de factores tipo HLH-básico/*leucine-zipper*, en mamíferos se han identificado dos isoformas, SREBP-1 y SREBP-2, los cuales tienen una función en el metabolismo de los FA. La isoforma SREBP-1 se subdivide en SREBP-1a y -1c. SREBP-1a controla la expresión de genes involucrados con la síntesis de FA y TG; mientras que SREBP-1c es la isoforma que predomina en el hígado, y su expresión se promueve por la insulina, así mismo, SREBP-1c es responsable de la regulación en la expresión de genes lipogénicos, por lo que promueve la síntesis de FA. Por otra parte, SREBP-2

participa en el metabolismo de colesterol controlando la expresión de genes involucrados con la síntesis y consumo de colesterol ⁵⁴.

Esta familia de factores tiene una estructura compuesta por cuatro dominios. En el dominio N-terminal posee un dominio de transactivación seguido de un dominio rico en residuos ácidos (glutamina, serina, prolina y leucina); en el extremo C-terminal posee el dominio de unión al DNA y uno más denominado, regulatorio ⁵⁵. Existe evidencia que indica que SREBP-1c promueve la transcripción de genes como ACC y FAS, y se ha sugerido que alteraciones en la expresión de este factor de transcripción tiene un papel importante en el desarrollo de la NAFLD. Estudios *in vivo* en donde quitan la expresión de SREBP-1c específicamente en hígado, se observó la reducción en la expresión del RNA mensajero de múltiples enzimas que participan en la síntesis de TG y de FA, incluyendo acetil CoA carboxilasa (ACC) y de ácidos grasos sintetasa (FAS). Interesantemente, en este modelo se muestra que en el hígado de los ratones se induce un incremento compensatorio en la expresión de SREBP-2 a nivel de RNA mensajero, acompañado por un incremento en los nivel de RNA mensajero de enzimas involucradas con la biosíntesis de colesterol ⁵⁶. En el caso de la sobreexpresión de SREBP-1c se ha observado que se aumenta de forma considerable la síntesis de FA y los depósitos de grasa en el parénquima hepático, esto es consecuencia de que la sobreexpresión de este factor estimula la expresión de enzimas lipogénicas (ACC, FAS) y también la expresión de genes que sintetizan los TG ⁵⁷. Lo anterior indica que SREBP1 es un factor relevante en el metabolismo de los lípidos hepáticos, por lo que los cambios en su expresión se pueden vincular directamente con la fisiopatología de la NAFLD.

Por otro lado, se sabe que el efecto de la insulina sobre la lipogénesis, es mediado por SREBP-1c. En condiciones de resistencia a la insulina, la actividad de este factor de transcripción se incrementa, lo que resulta en el aumento en la tasa de la lipogénesis *de novo*, mediante la activación de AKT/PKB; sin embargo, el mecanismo por el cual Akt induce a la activación de SREBP1c en el hígado no está claro. Estudios *in vivo* indican que se requiere la activación de mTORC1 para que se exprese SREBP1c en el hígado en respuesta de la insulina ⁵⁸.

Estudios *in vivo* han reportado que el aumento en la expresión de SREBP-1c lleva al desarrollo de esteatosis hepática ⁵⁷. Del mismo modo, estudios en ratones nulos para la expresión del gen que codifica a la hormona leptina (*ob/ob*), los cuales presentan obesidad, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, tienen altos niveles de la expresión del gen SREBP-1c y desarrollan hígado graso de forma espontánea ⁵⁷. Así mismo, el incremento de los supresores de la señalización de citocinas-1 (SOCS-1) y SOCS-3, causa un aumento en la expresión de SREBP-1c, este a su vez activa acetil-CoA, que promueve la producción de malonil-CoA en la membrana de la mitocondria; el incremento de esta malonil-CoA causa una disminución en la oxidación de FA debido a que es un inhibidor de palmitoil carnitina transferasa-1 (CPT-1), la cual lleva a los FA a la mitocondria ⁵⁹.

2.3.3.2 Proteína de unión al elemento de respuesta a hidratos de carbono (ChREBP)

ChREBP es un factor de transcripción que contiene un dominio de unión al DNA tipo HLH-*leucine zipper* en el extremo N-Terminal ⁶⁰. Este factor se expresa principalmente en el hígado, el intestino delgado, el tejido adiposo blanco y pardo, así como en el riñón. Su expresión en el hígado tiene un papel en la regulación transcripcional de genes involucrados en la glicolisis, lo que resulta en la conversión de exceso de glucosa a FA ^{61 59}.

En condiciones basales ChREBP se localiza en el citosol, y su traslocación al núcleo depende de las concentraciones de glucosa; a baja concentración de glucosa, ChREBP se encuentra inactivo, mientras que alta concentración de glucosa ChREBP se transloca al núcleo promoviendo así su unión a los elementos sensibles a hidratos de carbono (ChoRE) presentes en las regiones promotoras de genes de las enzimas lipogénicas ⁶².

Modelos *in vivo*, indican que el silenciamiento en la expresión de ChREBP no sólo conduce a la falta de inducción de genes LPK, FAS y ACC en respuesta a la glucosa, sino que también causa una reducción significativa en la síntesis de lípidos ^{62 61}. En ratones *ob/ob* la expresión hepática de ChREBP incrementa notablemente, tanto en condiciones de ayuno como de alimentación. Bajo condiciones de alimentación, ChREBP y SREBP-1c se incrementan de forma considerable, apoyando el hecho de que estos dos factores de transcripción contribuyen a la alta tasa de lipogénesis, lo que conduce al desarrollo de esteatosis hepática en estos ratones. Sin embargo, en condiciones de ayuno, se

aumentó sólo la expresión de ChREBP en comparación con los controles, sugiriendo que ChREBP por sí mismo puede ser responsable del aumento en la tasa de lipogénesis después de 24 horas de ayuno en estos animales ³².

2.3.3.3 Los receptores activados por proliferación de peroxisomas (Ppars)

Los receptores nucleares son una super familia de factores de transcripción que responden a ligandos naturales o sintéticos incluyendo compuestos endógenos, como hormonas esteroides, ácidos grasos, ácidos biliares, vitaminas o colesterol; o ligandos exógenos, incluyendo varios fármacos y toxinas, entre otros ⁶³.

Los Ppars son una subfamilia de receptores nucleares que deben su nombre al hecho de que responden al estímulo con drogas que estimulan la proliferación de los peroxisomas. Hasta el momento se han identificado 3 isoformas en mamíferos, Ppara α , Ppara β/δ y Ppara γ ⁶⁴. Los Ppars son factores de transcripción que regulan la expresión de sus genes blanco a través de la unión a los elementos de respuesta específicos en las regiones promotoras para proliferación de peroxisomas (PPREs) en los sitios potenciadores de sus genes blanco ⁶⁵. Estos receptores nucleares se unen al DNA a través de dos dedos de zinc en sus dominios de unión al DNA (DBD), además poseen un dominio de unión a ligando (LBD) localizado en el extremo C-terminal del receptor. Así mismo, en el extremo C-terminal se encuentra un segundo activador funcional de la transcripción (AF2), cuya actividad es dependiente de la unión del ligando al

receptor; mientras que el extremo amino-terminal posee un sitio denominado activador funcional de la transcripción 1 (AF1), el cual es un sitio independiente del ligando, pero es necesario para activación de la expresión génica (**Figura 6**)⁶⁶.

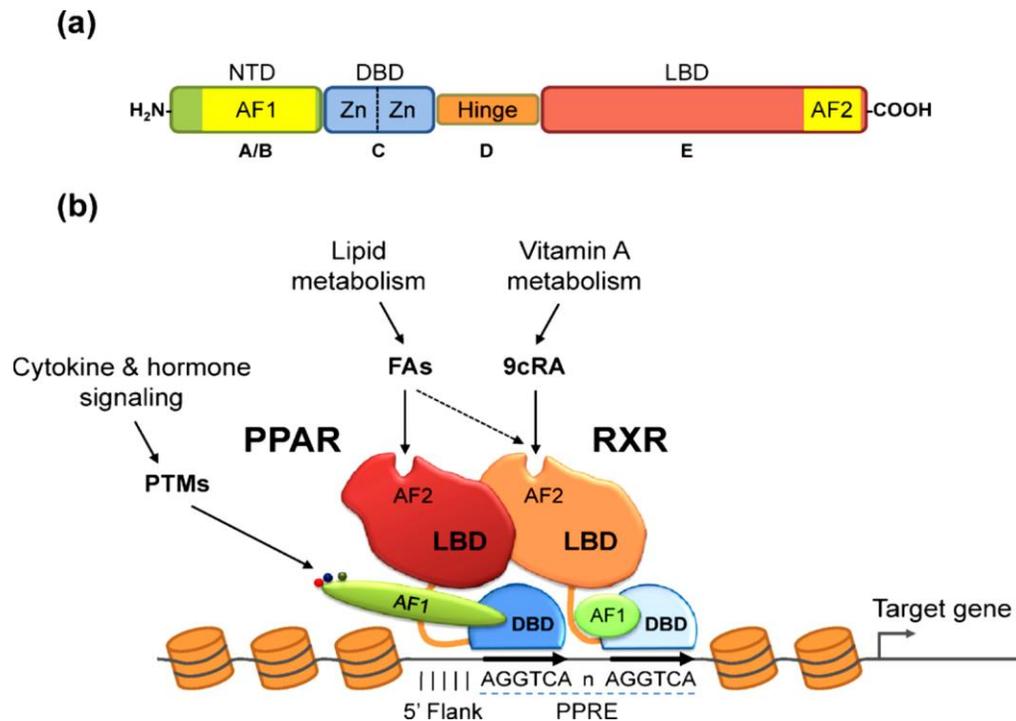


Figura 6. Modelo simplificado del modo de acción de los Ppars. **A)** El dominio N-terminal (NTD A/B), contiene la función activada ligando independiente (AF1). El dominio de unión al DNA (DBD, dominio C), contiene dos dedos de zinc que se unen al elemento de respuesta del DNA (PPRE). La región bisagra que es altamente flexible (dominio D). El dominio de unión a ligando (LBD, dominio E) contiene la función activada dependiente de ligando (AF2). **B)** Los Ppars forman un heterodímero con RXR, este complejo Ppar:RXR se une a los elementos de respuesta de proliferación de peroxisomas (PPRE) que contienen la secuencia AGGTCA_n (2X). La interacción entre la región bisagra de los Ppars y la 5' flanquea la expresión de la PPRE que favorece esta polaridad. Los Ppars activados por los ácidos grasos (FAs) y sus derivados, mientras que RXR es activado por el ácido retinoico cis-9 (9cRA) y ciertos FAs. La actividad de los Ppars es modulada mayormente por modificaciones post-traduccionales (PTMs), incluyendo fosforilación, ubiquitinación y sumoilación, lo cual ocurre principalmente en el dominio N-terminal, pero también puede ocurrir en otros dominios. Imagen tomada en ⁶⁶.

Filogenéticamente los Ppars son clasificados como una subfamilia de receptores nucleares de hormonas, de los cuales se incluyen los receptores de vitamina D, hormonas tiroideas, ácido retinoico y ecdisoma ⁶⁷. Todos los

receptores de esta subfamilia comparten la propiedad de formar un heterodimero con otros receptores nucleares del mismo subgrupo de receptores X retinoico (RXR). Casi todas las funciones bioquímicas que se han descrito de los Ppars requieren hacer este complejo de heterodimero con RXR. El complejo Ppar:RXR se une a los mismos PPRE y es independiente a los ligandos en las LBD y DBD de los dos receptores **(Figura 6)**^{66 67}.

La activación inducida por agonistas de muchos miembros de la subfamilia de receptores nucleares está acompañada por un cambio menor en la estructura del receptor contribuyendo a la disociación de los complejos co-represores como NCoR/SMRT y el intercambio de éstos por co-activadores como el co-activador de receptor de esteroides 1 (SRC1) y los elementos de respuesta de cAMP a la unión de la proteína CREB (CBP)/p300, algunos de los cuales tienen actividad de la histona-acetiltransferasa, lo que facilita el remodelamiento de la estructura de la cromatina⁶⁷. **(Figura 7)**.

El mecanismo de transrepresión de los Ppars se lleva a cabo a través de varios mecanismos. La primera consiste en el secuestro de co-activadores por la activación del complejo Ppar:RXR. La actividad de otros factores de transcripción que usan el mismo co-activador es suprimida en esta situación de competencia de co-activador. El segundo se realiza a través de un proceso llamado “acoplamiento cruzado” o “mutación del receptor antagonista”, este mecanismo es mediado por la capacidad de la activación del heterodimero Ppar:RXR para formar complejos con otros factores de transcripción activados, por ejemplo, AP1, NF-κB, NFAT o STATs⁶⁷. Finalmente, el tercer mecanismo de transrepresión involucra actividad del complejo Ppar:RXR para inhibir la activación de miembros de la cascada de la

proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), lo que contribuye a la incapacidad de activar a sus blancos ⁶⁷ (Figura 8).

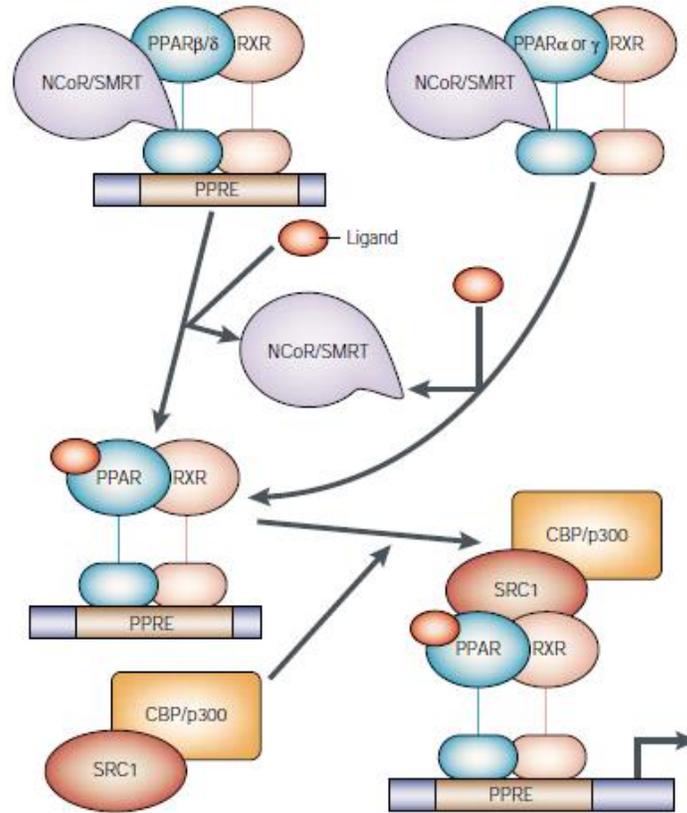


Figura 7. Modelo de activación de los Ppars dependiente de los ligandos. La activación del complejo PPAR:RXR ocurre después de la activación del dominio de unión al ligando (LBD). Una vez activado, el complejo co-represor (co-represor del receptor nuclear/ mediador del silenciamiento para los receptores de retinoides y de hormona tiroidea (NCoR/SMRT), el cual, a través de su asociación con histonas deacetilasas (HDACs), reprime la transcripción de genes. La isoforma Ppar β a diferencia de Ppar α y Ppar γ , no se puede unir al DNA mientras que está asociado con el complejo co-represor. Después de la disociación del complejo co-represor, Ppar α y Ppar γ se une al DNA a través de los elementos de respuesta de proliferación de peroxisomas (PPRE). Los Ppars se pueden unir a ciertos complejos de co-activadores, tales como, el co-activador de receptor de esteroides 1 (SRC1) y la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB) (CBP)/p300). Este complejo posee actividad de histona-acetiltransferasa, el cual re-organiza la estructura de la cromatina, lo que permite que la maquinaria transcripcional acceda a la región promotora. Los genes que están bajo el control transcripcional de los Ppars tienen un papel importante en una amplia gama de procesos fisiológicos. RXR, receptor del ácido retinoico cis-9 ⁶⁷

Los Ppars juegan un papel fundamental en el metabolismo de los lípidos, ya que se unen a ligandos naturales y sintéticos. Ppar γ por ejemplo, se une a ácidos

grasos poliinsaturados, incluyendo al ácido linoleico, el ácido linolenico, el ácido aracidonico y el ácido eicosapentaenoico; además se unen a ciertos ligandos sintéticos, como las tiazolidinedionas (TZDs), isoxazolidindiona (JTT-501), GW-7845, CDDO, BADGE, LG-100641; mientras que Ppar α tiene como ligandos naturales principalmente a los ácidos grasos saturados e insaturados como el ácido palmítico, el ácido esteárico, el ácido palmitoleico, el ácido oleico, el ácido linoleico, y el ácido aracidonico, así mismo, tiene como ligandos sintéticos a los fibratos como WY-14.643, clofibrato, gemfibrozil, nafenopin, bezafibrato y el fenofibrato. Finalmente, los ligandos naturales de Ppar β/δ son los ácidos grasos saturados e insaturados, como el ácido linolenico, el ácido aracidonico, el ácido palmítico y sus análogos, como el ácido bromopalmitico-2, también fueron identificados como agonistas de Ppar β/δ ; los ligandos sintéticos de Ppar β/δ son el L-165041 y las fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NASIDs) ^{64,65}.

Los Ppars tienen un papel clave en la regulación de numerosos procesos celulares relacionados con el metabolismo, la inflamación, la diferenciación, la proliferación y procesos patológicos como la aterosclerosis; los tres subtipos muestran patrones diferentes de distribución en los tejidos y activan diversos genes blanco. Así mismo, los Ppars son importantes reguladores del metabolismo de los FA, por lo que se expresan de forma importante en los tejidos que participan en el metabolismo de los lípidos. Las isoformas de Ppar α y Ppar β/δ regulan la expresión de genes involucrados con la oxidación de lípidos, por lo que se expresa en tejidos con una alta tasa metabólica, como el musculo, el hígado, el corazón y el tejido adiposo pardo ⁶⁸.

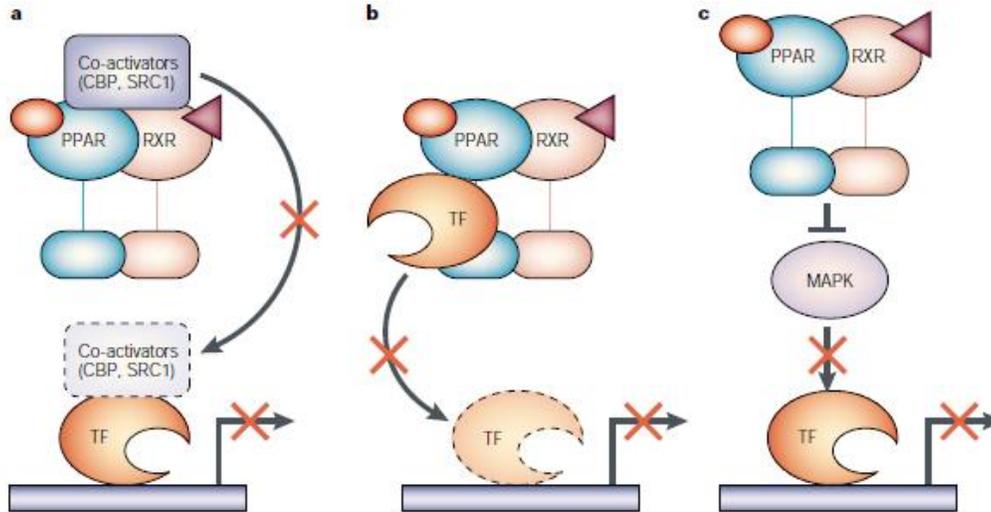


Figura 8. Modelo del mecanismo de regulación negativa de los receptores de transcripción Ppars. Las propiedades anti-inflamatorias y de inmunomodulación de los Ppars no surgen por sus habilidades de transactivación sino más bien a través de diferentes mecanismos de transrepresión. Se han descrito tres mecanismos que son mediados por los Ppars en células del sistema inmune. **A)** El primer mecanismo involucra la habilidad de los Ppars para competir por las proteínas co-activadoras SRC1 y CBP/p300. **B)** El segundo mecanismo de transrepresión es conocido como “acoplamiento cruzado” o “mutación del receptor antagonista”, y es facilitado por la capacidad de los Ppars para asociar físicamente con varios factores de transcripción. Esta asociación previene la unión de los factores de transcripción a los elementos de respuesta, y así inhibe su capacidad de inducir la transcripción de genes. **C)** Recientemente se ha descrito este mecanismo de transrepresión dependiente de la habilidad de Ppars de inhibir la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). Esto inhibe la fosforilación de MAPK y la activación de factores de transcripción río abajo. RXR, receptor de ácido retinoico cis-9⁶⁷.

En contraste, Ppar γ se destaca por su capacidad para activar genes lipogénicos y de la diferenciación de adipocitos. Ppar γ se expresa como dos isoformas, Ppar γ 1 y Ppar γ 2. Se sabe que la expresión de Ppar γ 2 es selectiva de tejido adiposo y Ppar γ 1 se expresa en bajo grado en varios tejidos como colon, hígado, músculo y bazo (**Figura 9**)⁶⁸.

Los Ppars cumplen diversas funciones en el hígado sano, por ejemplo; Ppara es el subtipo que mayormente se expresa en el hígado, y es el principal regulador de la respuesta hepática al ayuno, ya que incrementa el flujo de FA hacia el hígado, incrementa el consumo y la oxidación de los FAs, incrementa las

apolipoproteínas HDL, disminuye la producción de VLDL, así como la modulación del metabolismo de los aminoácidos y la gluconeogénesis ⁶⁹.

Ppar γ por su parte, incrementa la lipogénesis y la sensibilidad a la insulina ⁷⁰; mientras que Ppar β es un regulador del metabolismo de los FA, ya que su activación incrementa el transporte y el flujo de estos, y controla la homeostasis de la glucosa a través de promover la sensibilidad a la insulina ^{69,71}.

En condiciones patológicas como la NAFLD, la expresión de los Ppars y sus genes blancos se modifica; por ejemplo, estudios *in vivo* indican que ratones nulos para la expresión de Ppar α , desarrollan esteatosis hepática y muestran elevación en los niveles de triglicéridos y colesterol plasmáticos así como un incremento significativo en la grasa corporal; se demostró además, que Ppar α no regula la ganancia de peso, ya que los ratones nulos para este receptor nuclear no mostraron una pérdida de tejido adiposo en comparación a los ratones control ⁷².

En el mismo sentido, en ratones con una dieta deficiente de metionina y colina se observa una disminución en la expresión de Ppar α , resultando en el desarrollo de esteatosis hepática y NASH; interesantemente, el tratamiento con el agonista de Ppar α (Wy-14.643) revierte la esteatosis hepática, demostrando que la actividad de este receptor tiene un efecto benéfico en la disminución de triglicéridos hepáticos ⁶⁹. Finalmente, se ha demostrado *in vivo e in vitro*, que FABP1 es regulada positivamente por Ppar α y FOX-A1, mientras que C/EBP α reprime la expresión de este gen. FABP1 es una proteína que se une a los FA de cadena larga favoreciendo, el transporte y el catabolismo de éstos hacia la mitocondria o los peroxisomas, minimizando los efectos tóxicos y promoviendo la β -oxidación. El mecanismo propuesto es que tanto Ppar α como FOXA1, compiten

por los sitios de unión en el promotor del gen para FABP1, con C/EBP α ; sugiriendo que Ppar α participa como un factor que previene el desarrollo de la NAFLD y que incluso es un blanco terapéutico para el tratamiento de esta enfermedad⁷³.

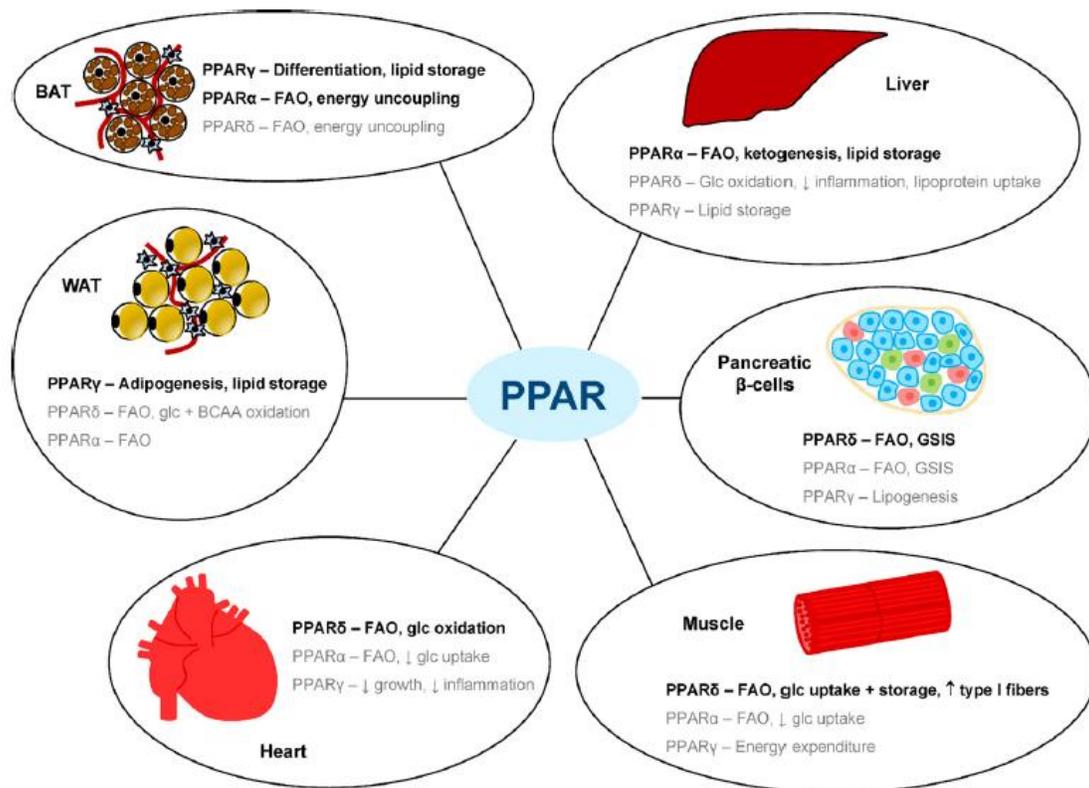


Figura 9. Distribución y función de los Ppars en algunos tejidos. En la figura se muestra en letras negras el subtipo de Ppar que se expresa mayormente en cada tejido (corazón, músculo, pancreas; mientras que los subtipos expresados en niveles más bajos se indican en letras grises. BAT: tejido adiposo marrón; BCAA: aminoácidos de cadena ramificada; FAO: oxidación de ácidos grasos; GLC: glucosa; GSIS: secreción de insulina estimulada por la glucosa; WAT: tejido adiposo blanco. Imagen tomada: ⁶⁶.

En el caso del receptor Ppar γ , se ha demostrado que su expresión se incrementa en modelos animales con esteatosis hepática, y en humanos con NAFLD⁶⁶. Diversos modelos murinos con obesidad y DMT2, desarrollan esteatosis hepática y expresan niveles aumentados de Ppar γ en el hígado⁷⁴. Por otro lado, un modelo de ratones ob/ob nulos para Ppar γ muestran menor ganancia

de peso en comparación con los ratones controles, así mismo, muestran disminución en los niveles de triglicéridos hepáticos y en la expresión de genes lipogénicos en el hígado, como la sintetasa de ácidos grasos (FAS), la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y estearoil CoA desaturasa-1 (SCD1) ⁷⁵. Estos datos indican que Ppar γ tiene un papel importante en la regulación del contenido de triglicéridos hepáticos. En el mismo sentido, se ha observado que la expresión de Ppar γ se incrementa en ratones alimentados con una dieta alta en grasa debido a la pérdida del regulador negativo llamado proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), sugiriendo que la sobreexpresión de Ppar γ en el hígado participa activamente en la acumulación de lípidos hepáticos, y en el desarrollo de NAFLD ⁷⁶. En conjunto, estos datos sugieren que la actividad de Ppar γ juega un papel crucial en la fisiopatología de la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos.

Finalmente, Ppar β se expresa en menor proporción en el hígado, sin embargo, se ha observado que en ratones con esteatosis hepática el tratamiento con agonistas de este receptor muestran una reversión en la esteatosis hepática y en la inflamación ya que promueve el metabolismo de los lípidos e inhibe procesos inflamatorios. En el caso contrario, la deficiencia en la expresión de Ppar β en este modelo muestra que los animales son más sensibles a agentes químicos hepatotóxicos, tales como azoximetano y CCL₄, los cuales promueven la fibrosis y la cirrosis hepática. Por lo tanto, no es difícil pensar que Ppar β es un factor protector contra la inflamación y la fibrosis. Es posible que debido a que Ppar β se expresa en las células hepáticas, su actividad contribuya a la disminución del contenido de lípidos, ya que promueve el proceso de β -oxidación de los ácidos grasos ⁶⁹.

2.3.3.4 Factores de transcripción tipo Krüppel

Los factores tipo Krüppel (KLFs) son una familia de factores de transcripción que regulan diversos procesos biológicos, tales como, proliferación, diferenciación y desarrollo celular, metabolismo, apoptosis, inflamación y remodelación del tejido en respuesta al estrés externo ⁷⁷. Se han identificado 17 miembros de la familia de los KLFs, los cuales se caracterizan en tener un dominio de unión al DNA, ubicado en el extremo carboxilo terminal, compuesto por tres dedos de zinc tipo Cys2-His2 los cuales coordinan 1 átomo de zinc. Los KLFs reconocen secuencias tipo CACCC en sus genes blanco, regulando la activación y/o represión de la transcripción. En contraste, la región N-terminal es altamente variable, ya que contiene distintos dominios que les permiten interactuar con distintos co-reguladores o ser susceptibles de modificaciones post-traduccionales, además contienen dominios de interacción para la proteína de unión al carboxilo-terminal (CtBP) o Sin3a **(Figura 10)** ⁷⁸.

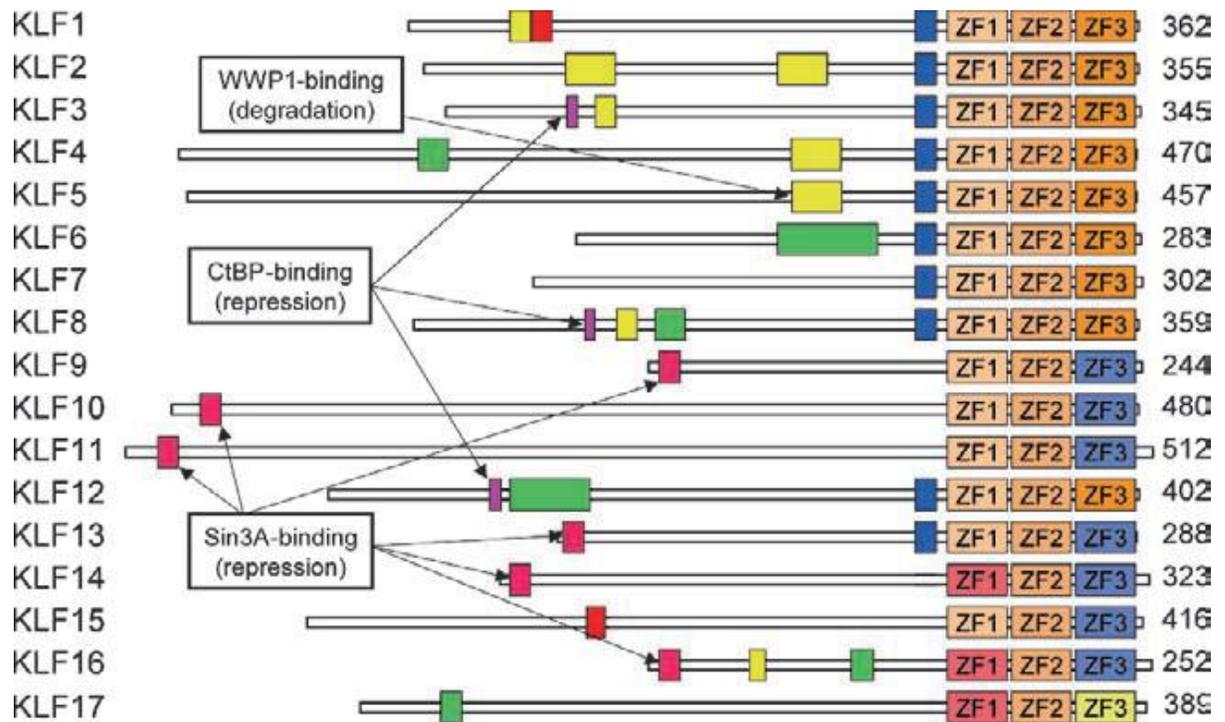


Figura 10. La familia de factores tipo Kruppel. En la figura se muestra la estructura secundaria de los KLFs. Se observa que el dominio de unión al DNA está compuesto por tres dedos de zinc en el extremo C-terminal (ZF1-3). La región N-terminal se caracteriza por poseer diversos dominios de interacción o de modificaciones postraduccionales (los rectángulos indican zonas ricas en prolina (amarillo), serinas/treoninas (verde), dominio ácido (rojos) o básico (azul). Las flechas indican los sitios de interacción para las proteínas de unión al extremo C-terminal (CtBP) o Sin3a. Se indica la longitud de aminoácidos de cada KLF a la derecha. Tomado de ⁷⁹

Las funciones que tienen los KLFs en los mamíferos son diversas, por ejemplo, participan en procesos de embriogénesis y desarrollo fetal, adipogénesis, diferenciación de células epiteliales, proliferación de fibroblastos cardiaco; en el hígado estos factores participan activamente en la regulación de la gluconeogénesis, la homeostasis energética, la diferenciación celular, el ciclo celular, la apoptosis, el estrés oxidativo, así como, la activación de las células esteladas ^{79, 78, 80, 81}.

Por otra parte, se sabe que existe una relación entre la actividad de los Ppars y los KLFs, en donde los factores tipo Krüppel regulan la expresión de los Ppars en diversos procesos biológicos. Por ejemplo, se ha reportado que varios

miembros de la familia (KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF6, KLF7, KLF9 y KLF15), participan en la diferenciación de los pre-adipocitos a adipocitos maduros, incrementando directamente la expresión entre otros genes, la del receptor Ppar γ ^{82 83}. Estos datos en conjunto, sugieren que los KLFs pueden regular la actividad de los PPARs y por tanto participar de forma activa en el metabolismo de lípidos.

La actividad de los KLFs en condiciones patológicas también se ha registrado. En modelos *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que ratones nulos para la expresión de KLF6 en hígado y en condiciones de NAFLD, tienen mayor sensibilidad y tolerancia a la insulina y glucosa, respectivamente; además, en biopsias hepáticas de 28 pacientes con NAFLD, se observó que KLF6 regula negativamente la expresión del miRNA 10b, el cual en condiciones basales, reprime la expresión de PPAR α a nivel de la síntesis de proteína; lo que sugiere que se trata de un proceso de control a nivel post-transcripcional⁸⁴.

3. Marco metodológico

Este estudio se realizó en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), en el laboratorio del departamento de Gastroenterología, durante el periodo de Mayo del 2011 a Junio del 2013. El tutor es el Dr. Carlos Pérez Monter, y los colaboradores en esta investigación son la Bióloga. Alma Estánes Hernández y la Q.F.B. Dafne Guerrero Escalera. Así mismo, se contó con el apoyo del Dr. Víctor Ortiz Martínez, del departamento de Fisiología de la Nutrición del mismo instituto.

El objetivo de esta investigación es determinar el efecto de los factores de transcripción tipo Krüppel en la expresión de los receptores PPARs en un modelo de esteatosis no alcohólica *in vitro*. Para poder llegar a este objetivo se realizaron los siguientes experimentos:

3.1 Cultivo celular y estímulos

Se utilizó la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2, (donada por el Dr. Jaime Mass del Instituto de Fisiología Celular en la UNAM). Las células se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (GIBCO®) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina-estreptomicina y se mantuvieron a una temperatura de 37°C, 5% de CO₂ y 90% humedad relativa. El DMEM suplementado de las células fue cambiado cada 2 días. Una vez que se alcanzara una confluencia del 80-90%, se diluían y

resiembrando nuevamente con una relación de 1:3 usando la enzima tripsina/EDTA (0.05%).

Para realizar los experimentos, las células se cosecharon mediante el uso de la tripsina/EDTA, se recuperaron y cuantificaron con ayuda de la cámara de Neubauer, utilizando el colorante vital azul de tripano, con la finalidad de medir la viabilidad y el rendimiento celular. Para llevar a cabo los estímulos se sembró en cajas de cultivo de 35mm de diámetro con un total de 0.5×10^6 de células.

Los estímulos para inducir la esteatosis se realizaron con ácido palmítico 300 μ M, diluido en albúmina sérica bovina (BSA) al 3%, o con fructosa 10mM, diluida en (PBS).

3.2 Reacción de transcripción reversa y reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR)

3.2.1 Extracción de RNA total

El RNA total se extrajo utilizando el reactivo TriPure (Roche). Brevemente, una vez que pasó el tiempo requerido para cada estímulo, las células se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se congelaron a -70°C hasta su uso. Se agregaron 500 μ l de TriPure (Roche) a cada pozo y las células se recuperaron en tubos Eppendorf de 1.5ml, e incubaron 5 minutos a 25°C . Seguido, se agregó 100 μ l de cloroformo a cada tubo y se mezcló en vórtex hasta aspecto lechoso. Enseguida, las muestras se incubaron a 25°C durante 15 min. Transcurrido este tiempo las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C . La fase

acuosa conteniendo el RNA se recuperó en tubo Eppendorf al cual se le adicionaron 250µl de isopropanol y se agitó suavemente. Los tubos se incubaron para promover la precipitación del RNA, en hielo seco (~80°C) por espacio de 30 min. Transcurrido ese tiempo, las muestras se descongelaron a 4°C y fueron centrifugadas por 10 min a 13,000 rpm y 4°C. El sobrenadante fue retirado y a la pastilla de RNA se le agregaron 500 µl de etanol al 75%, se agita dando vortex para después centrifugar 5 min a 10,500 rpm. Se retiró el sobrenadante y la pastilla de RNA se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en agua ultrapura (MiliQ, Millipore) con dietil-pirocarbonato (DEPC 0.1%). El RNA total se almacenó a -70°C hasta su uso. Para determinar la concentración, las muestras fueron calentadas a 65°C por 5min y agitadas con vortex. 1µl de RNA se resuspendió y se utilizó para medir la absorbancia en espectrofotómetro (Biophotometer, Eppendorf) a 260 nm de longitud de onda; adicionalmente, se midió la absorbancia a 230nm y 280nm con el fin de evaluar la contaminación con sales o con proteínas, respectivamente. La relación 260/280nm igual o mayor a 1.5, así como la relación 260/230nm mayor que 2, se consideraron como indicadores de pureza.

Para verificar la integridad del RNA, 1µg de RNA se resolvió por electroforesis en geles de agarosa 1% en condiciones desnaturalizantes (Formaldehído al 2.2% final), utilizando el buffer MAE (MOPS 200mM, EDTA 10mM, acetato de sodio 50mM). Las subunidades 18S y 28S del RNA ribosomal se utilizaron como referencia de integridad física del ácido nucleico (**Figura 11**).

3.2.2 Transcripción reversa (RT)

La reacción de transcripción se llevó a cabo utilizando 3µg de RNA total y el protocolo sugerido por el fabricante del kit para tal efecto (*Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit*, Roche). El volumen de la muestra se ajustó con agua DEPC a 11 µl finales. Con la finalidad de relajar las estructuras secundarias del RNA total, las muestras se sometieron a calentamiento a 65°C durante 5 min previo a la adición de la mezcla de reacción. Posteriormente se les agregó 2µl de hexámeros random (60µM final) y se calentaron las muestras a 65°C por 5min. Seguido, las muestras se condensaron en hielo y se centrifugaron brevemente. A cada tubo se le agregaron 7µl de la mezcla de reacción (*buffer* de reacción: Tris-HCl, 250mM pH 8.3; KCl, 150 m; MgCl₂, 40 mM; inhibidor de RNasa 20U/µl; deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 1mM, transcriptasa reversa 10U Roche); los tubos de reacción se incubaron a 25°C durante 10min. Posteriormente, la reacción se incubó a 55°C por 30min y finalmente a 85°C por 5min. Las muestras conteniendo ahora el DNA complementario (cDNA), se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

3.2.3 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La PCR de tiempo real se realizó de acuerdo al Kit *LightCycler TaqMan Master* (Roche), en el equipo *LightCycler 480 II* (Roche). Para cada reacción se hace una mezcla de cDNA obtenido en la reacción de RT. 5µl de una dilución

(1:10) con 5µl de la mezcla de reacción (2.5µl agua ultra-pura y 2.5 µl de mezcla de reacción (*FastStart* Taq. DNA polimerasa, buffer de reacción, MgCl₂, dNTPs, 0.2 µl (2pmol/µl) de oligonucleótidos sentido (*left*) y antisentido (*right*), de los genes de interés, así como 0.1µl (0.1µM) de la sonda de hibridación (*TaqMan*) específica para cada gen; el volumen final de la reacción es de 10µl. Los genes que se analizaron fueron: Ppar α , Ppar γ , Ppar β/δ , KLF5, KLF6, KLF9, ELOV5, SREBP1c, ABC1A, CPT1A, HMGCR, DGAT2, FABP1, FASN, FOXO1, PCK1, SCD9, XBP1 y CYP1A; el gen constitutivo fue β -actina (Ver Anexo 1). Las condiciones de amplificación de las reacciones fueron: un ciclo de 10 min. a 95°C, 45 ciclos de 10 seg., 95°C, 30 seg. 60°C., 1 seg. 72°C, y un ciclo de 30 seg. a 40°C.

3.3 Tinción de rojo oleoso

El protocolo de tinción con rojo oleoso ha sido previamente descrito ^{85 86}. Para la tinción se sembraron 0.5x10⁶ células en total en pozos de 35mm de diámetro. Una vez concluidos los tratamientos las células se lavaron 2X con PBS; posteriormente, se agregaron 3ml de formaldehído al 10%, y se incubó una hora en agitación a temperatura ambiente. Seguido, las células se lavaron nuevamente 2X con PBS y se guardaron a 4°C hasta su uso). El colorante se preparó de la siguiente forma: 3mg de Rojo Oleoso (*Matheson Coleman & Bell*) se disolvieron en 1mL de Isopropanol. De este *stock* se hizo una dilución con agua en una relación 60:40. A cada pozo de células se le agregó 1ml de esta dilución e incubó por 60

min a temperatura ambiente en agitación. Pasado este tiempo, se lavaron para remover el exceso de colorante con PBS. Para recuperar el contenido de TGs teñidos con el colorante, las células se incubaron con isopropanol por 30 min en agitación a temperatura ambiente; se recuperó entonces el sobrenadante y se midió la absorbancia a 500nm o 510nm de longitud de onda por espectrofotómetro. El contenido de TG se reporta como veces de cambio respecto de las células control.

3.4 Análisis de proteína por Western Blot

3.4.1 Extracción de proteína nuclear

Para realizar estos experimentos se sembraron 3×10^6 células en cajas de 60mm de diámetro. Para realizar la extracción se agregó 1ml de Buffer A (HEPES pH7.6, 10mM; MgCl 1.5mM; KCl 10m; ditritioetol (DTT) 0.5mM; IGEPAL al 0.5%, e inhibidores de proteasas, ver anexo 2). Las células se recuperaron en tubo Eppendorf de 1.5ml e incubaron por 15 min a 4°C, agitando con vortex cada 5 min. Posteriormente, las células se centrifugaron a 7000 rpm durante 1 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y seguido se agregaron 100 μ l de Buffer Ripa (Tris-HCl pH8 50mM; NaCl 150mM; dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 0.1%; Deoxicolato de sodio al 0.5%; IGEPAL al 1%; EDTA 1mM; adicionado con inhibidores de proteasas, ver anexo 2) e incubaron por 30 min a 4°C, agitar con vortex cada 5 min, seguido se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. a 4°C. El sobrenadante se recuperó y almacenó a -70°C hasta su uso. Para determinar la concentración

de proteína nuclear se realizó la cuantificación con ayuda del reactivo de Bradford, utilizando una curva estándar de albumina sérica bovina (BSA) es espectrofotómetro a 595nm de longitud de onda; la concentración se expresa como $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.4.2 Western-Blot

Para el ensayo de *Western-Blot* 20 μg o 30 μg de proteína se resolvieron en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) al 10% (condiciones desnaturalizantes) (Ver anexo 3), por electroforesis a 120 volts. en buffer de corrida (Tris-base 0.25 M; glicina 1.92 M; SDS al 1%). Las proteínas se transfirieron a membrana de difloruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon 0.45 μm , Millipore) en sistema húmedo con buffer de transferencia (Glicina 200 mM; Tris-base 25 mM; SDS 1%; metanol 20%). Después de 2 hrs. de transferencia, la membrana se tiñó con solución de rojo de Ponceau (Ponceau-S al 0.5%; ácido acético glacial al 1%) para corroborar la eficiencia de la transferencia y posteriormente, se bloqueó con solución al 5% de leche descremada (Bio-Rad) en buffer TBS (Tris-base 20 mM; NaCl 137 mM) con Tween 20 al 0.5% (TBS-T), durante 1 hr. en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó con los anticuerpos correspondientes, anti-Ppara (dilución 1:500 en TBS-T y BSA al 3%), anti-Ppary (dilución 1:500 en TBS-T y BSA 3%), anti-Ppar β/δ (dilución 1:5000 en TBS-T, BSA 3%), anti-klf6 (dilución 1:5000 en TBS-T, BSA 3%), así como el anticuerpo contra la polimerasa II, que se utilizó como control de carga (anti-Pol II, dilución 1:5000 en TBS-T, BSA

3%) por espacio de 12 hr. a 4°C en agitación. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó tres veces con TBS-T seguido de una hora de incubación con los anticuerpo secundarios correspondientes anti-cabra o anti-conejo, ambos acoplados a la enzima peroxidasa (HRP), diluidos 1:3000 en TBS-T, leche descremada (NFT) al 5%). Enseguida, se lavó como antes para después revelar por método de quimioluminiscencia con un kit comercial (*Western Lighting Perkin Elmer*) y la señal se adquirió en sistema de imágenes *Chemi-Doc* (Bio-Rad).

3.4.3 Análisis in silico

Identificamos potenciales elementos de respuesta para los KLFs, en la región promotora del gen de Ppar γ , Ppar α y Ppar β , utilizando el algoritmo descrito en RSA Tools (Matrix-Scan), ⁸⁷con los siguientes parámetros de búsqueda: umbral, bajo, NA; alto, *p-value* 0.001; Bernoulli (orden=0); pseudo-frecuencia de fondo 0.01; probabilidad de residuos: a, 0.22442; c, 0.27066; g, 0.27421, t, 0.23071; y la región promotora reportada previamente de dichos genes (Humano: PPAR γ ENSG-132170; PPAR α ENSG-186951; PPAR β ENSG-112033; Rata: PPAR γ ENSRNOG-8839; PPAR α ENSRNOG-21463; PPAR β , ENSRNOG-503; Ratón: PPAR α ENSMUSG-22383; PPAR β ENSMUSG-2250; PPAR γ ENSMUSG-440). La matriz de la base de datos JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) correspondiente al elemento GCCc/aCa/gCCCa/t, se utilizó para mapear dichas regiones. Los datos se reportan como una tabla de probabilidad de ocurrencia de frecuencias en las regiones (1000pb) río arriba del sitio de inicio de la

transcripción.

3.5 Ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIp)

3.5.1 Obtención y fragmentación de la cromatina soluble

Para determinar la interacción de los factores de transcripción con el DNA *in vitro*, se utilizó el protocolo de inmunoprecipitación de cromatina de acuerdo a lo reportado ⁸⁸, con algunas modificaciones. En breve, para este experimento se sembraron 5×10^6 de células en cajas de 100mm. Una vez que las células se estimularon como se describió antes, estas se lavaron 2X con PBS, y enseguida se les agregó 900 μ l de solución de formaldehído al 11% (NaCl 1mM, EDTA pH 8 1mM, EGTA pH 8 0.5mM, Hepes 50mM pH 7.6) y se mantuvieron en agitación por 10 min. a temperatura ambiente. Para detener la acción del formaldehído, se agregaron 545 μ l de glicina (125 mM final) e incubó durante 5 min más en las mismas condiciones. Después se retiró el sobrenadante y se lava 2X con PBS. Enseguida, se agregó 1 ml de buffer de lisis (SDS 1%, EDTA 5mM, Tris-HCl pH 8.1 50mM e inhibidores de proteasas (*Complete*, Roche) y se cosecha posteriormente se recuperan en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se guardan a 4°C hasta su uso.

La cromatina se fragmentó en ultrasonicador (*Ultrasonic Homogenizer* 4710, Cole Parmer) con 10 pulsos de 30 seg. e intervalos de descanso de otros 30seg. a 4°C entre cada uno, a 35% de poder máximo.

Para corroborar la fragmentación de la cromatina, 10µl de las muestras se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE (Tris-Base 1M; ácido bórico 1M; EDTA 20mM).

La cromatina fragmentada se centrifugó a 4°C por 10 min. a 14,000 rpm. El sobrenadante se recuperó en tubo Eppendorf y una alícuota de 50 µl se retiró para usarlo como “*input*”. Posteriormente el resto de la cromatina se diluyó en 10 ml de buffer de dilución (Tritón X-100 1%; EDTA 2 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8.1; NaCl 150 mM; e inhibidores de proteasas (Complete, Roche)) y se agregaron 20 µl de suero fetal bovino y 20µl de perlas de agarosa acopladas a proteína A/G (perlas). Esta mezcla se incubó por espacio de 2hrs. a 4°C en agitación constante. Concluido ese tiempo, la solución se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. a 4°C. La cromatina soluble contenida en el sobrenadante se recuperó en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Esta cromatina soluble se almacenó a 4°C hasta su uso.

3.5.2 Inmunoprecipitación

Para enriquecer el DNA genómico asociado a las proteínas de interés, se utilizó la cromatina obtenida previamente. El primer día se agregaron 5µg de cualquiera de los anticuerpos (anti-Klf5, anti-Klf6, anti-Klf9, Pol II o IgG) en tubos independientes y las muestras se incubaron toda la noche a 4°C en agitación constante. Al día siguiente los tubos se retiraron en hielo y a cada tubo se le agregó 20µl de solución de perlas para inmunoprecipitar los complejos DNA/proteína. Posteriormente, se incubaron por 4hrs. en agitación constante a

4°C. Después del tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 3000rpm durante 1min. a 4°C. La pastilla que contiene los complejos perlas/DNA se lavaron entonces con buffer de paro I (SDS 0.1%; Tritón X-100 1%; EDTA 2 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8.1; NaCl 150 mM; PMSF 1 mM; Na₂VO₄ 1 mM; e inhibidores de proteasas (Complete, Roche); paro II (SDS 0.1%; Tritón X-100 1%; EDTA 2 mM pH 8.1; Tris-HCl 20 mM; NaCl 500 mM; PMSF 1 mM; Na₂VO₄ 1 mM; e inhibidores de proteasas (Complete, Roche) y paro III (EDTA 1 mM; Tris-HCl 10mM pH 8.1; LiCl 250mM; NP40 1%; NaCl 150 mM; PMSF 1 mM; Na₂VO₄ 1 mM; e inhibidores de proteasas (*Complete*, Roche), una vez cada uno e incubando 10 min. a 4°C y agitación constante. Entre cada lavado los tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 1 min. Finalmente los complejos perlas/DNA se lavaron y centrifugaron con buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8; PMSF 1 mM; Na₂VO₄ 1 mM; e inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Posteriormente, los complejos perlas/DNA se resuspendieron en buffer de lavado (NaHCO₃ 0.1 M; SDS 1%; proteinasa K 20µg; ribonucleasa A (RNAsa A) 10µg). En este punto el tubo con la muestra de DNA "input" se incluyó agregándole el mismo volumen de buffer de lavado, PK y RNAsa A. Inmediatamente después, los tubos fueron incubados toda la noche a 65°C con la finalidad de revertir el entrecruzamiento y liberar el DNA de los complejos. Al día siguiente, los tubos fueron retirados de la incubación y colocados en hielo para condensar las muestras. Seguido, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm a 1 min. para después purificar el DNA por columna, de acuerdo con un protocolo comercial (*miniElute* PCR kit purification, Qiagen). En breve, el sobrenadante se mezcló con 500µl del

Binding Buffer, para después pasarlo a las columnas de filtrado y centrifugar 1 min. a velocidad máxima. Posteriormente, se retira el sobrenadante y se le agrega a la columna 500µl de de buffer de lavado y centrifugar 1 min. a velocidad máxima, retirar nuevamente el sobrenadante y agregar 200µl de buffer de lavado y centrifugar 1 min a máxima velocidad. Al final el DNA se eluyó en un volumen de 50 µl de buffer de elución.

3.5.3 PCR-Punto final

Para amplificar el DNA enriquecido por inmunoprecipitación, se utilizó 1 µl de DNA eluído a partir de muestras inmunoprecipitadas con cualquiera de los anticuerpos y 1 µl de DNA input diluido 1:10 con agua. Los oligos utilizados fueron diseñados en el programa *Universal ProbeLibrary* para amplificar los fragmentos correspondientes a la región promotora de los genes *Ppars* (ver anexo 4). La reacción de amplificación se realizó con 1 µl de DNA y 9 µl de mezcla de reacción (Tris-SO₄ 0.6mM pH 8.9; NH₃SO₄ 2.2 mM; MgSO₄ 3.12 mM; MgCl 2.5mM; dNTPs 1mM; 0.5µl (1.25pmol/µl) de oligonucleótidos sentido (left) y antisentido (right); DNA polimerasa (Hi-Fi® Taq. Invitrogen) 1U). Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo a 95°C 10 min.; 35 ciclos de 95°C 30 seg., 60°C 30 seg., 72°C 1 min.; 1 ciclo de 72°C 5 min. Después de la amplificación los productos fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa 1.5% en buffer TBE. Posteriormente, las imágenes se capturaron con ayuda de un fotodocumentador (*Chemi-doc*, BioRad). La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría

con ayuda del software *ImageJ*. Los resultados se expresan como el porcentaje de enriquecimiento de la región de interés en relación con la señal obtenida del control “input” que es igual a 100%, mientras que el control de inmunoglobulinas (IgGs) que representa la especificidad de la inmunoprecipitación.

4. Resultados

4.1 Desarrollo de un modelo de esteatosis in vitro

El modelo de esteatosis se realizó utilizando la línea celular HepG2⁸⁹, la cual es una línea derivada de hepatocarcinoma humano; esta línea celular ha sido utilizada por otros grupos para el desarrollo de modelos similares⁹⁰⁻⁹². Con la finalidad de inducir la acumulación de triglicéridos, las células HepG2 se expusieron al estímulo con ácido palmítico o fructosa. En primer lugar nos interesaba saber cuánto tiempo debíamos mantener dicho estímulo, por lo que se realizó una curva tiempo-respuesta. La curva se realizó a diferentes tiempos (3, 6, 12 y 24 horas) con ambos tratamientos. Al término de cada ventana de tiempo, se extrajo el RNA total para cuantificar los cambios en la expresión génica, por medio de PCR de tiempo real (PCR-TR). Las concentraciones utilizadas para realizar los estímulos ya han sido reportadas en otros estudios como precursores en el desarrollo de esta patología, y corresponden a 10mM de fructosa y 300µM ácido palmítico⁹⁰⁻⁹².

En primer lugar se realizó la extracción de RNA total de las células, cuya integridad se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (**Figura 11**). Posteriormente, se realizó la síntesis de cDNA mediante transcripción reversa (RT).

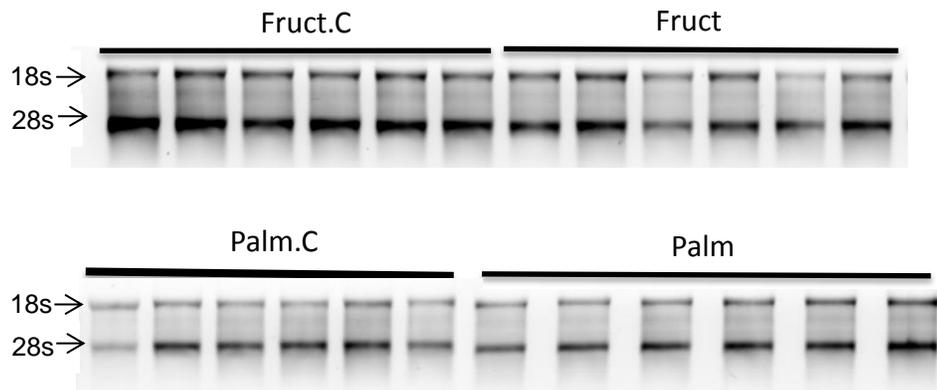


Figura 11. Electroforesis representativa de la integridad del RNA total. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes. Se marcan los coeficientes de sedimentación correspondientes a las subunidades 18s y 28s del RNA ribosomal. La imagen muestra la integridad del RNA total de células expuestas a fructosa (Fruct) o ácido palmítico (Palm) y sus controles respectivos (Fruct.C y Palm.C).

4.1.1 Análisis del perfil de expresión génica utilizando curvas tiempo-respuesta

Dado que los receptores nucleares Ppars así como los KLFs participan activamente en el proceso de adipogénesis y lipogénesis, nosotros razonamos que en células de origen hepático, ambos tipos de factores pudiesen estar regulando procesos similares, y por tanto, contribuir de forma significativa al proceso de esteatosis, por lo que decidimos analizar los cambios de su tasa transcripcional en respuesta a los estímulos mencionados por medio de PCR-TR. Se analizó la expresión del RNAm de Ppar α , Ppar γ y Ppar β (**Figura 12A-C**) en conjunto con Klf5 (**Figura 12D**), Klf6 y Klf9 (**Figura 13A y B**), adicionalmente, se cuantificó la expresión de dos genes lipogénicos (ELOV5 y SREBP1c) (**Figura 13C y D**). En estas figuras solo se muestran los datos obtenidos en los tiempos de 12 y 24 horas; ya que a 3 y 6 horas no observamos cambios significativos en la expresión de dichos genes.

Los niveles de cambio de los transcritos se normalizaron usando el método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{-Ct}$)⁹³. Posteriormente, el análisis estadístico de la curva tiempo-respuesta se realizó con ayuda del software *GraphPad Prism 5* usando la prueba T no pareada, evaluando la media de los controles vs el estímulo.

En primer lugar analizamos la respuesta al estímulo en las células sobre los niveles de expresión de los Ppars. Observamos que en el caso del transcrito para Ppara existe una respuesta opuesta cuando se incuban las células con fructosa o ácido palmítico. Es decir, en el primer caso, la expresión de Ppara disminuye en las primeras 12 horas de estímulo (0.74 ± 0.20 veces vs control 1.0 ± 0.10), mientras que 12 horas más tarde, la expresión se incrementa de forma significativa hasta 3 veces (3.01 ± 1.66 veces vs control 1.05 ± 0.21) (**Figura 12A**). Por el contrario, cuando las células se incuban con ácido palmítico, la expresión de Ppara aumenta en las primeras 12 horas (1.43 ± 0.47 veces vs control 1.09 ± 0.28) y disminuye de forma importante a las 24 horas (0.70 ± 0.09 veces vs control 1.01 ± 0.11 , $p < 0.05$) (**Figura 12A**)

Por otro lado, la respuesta a dicho estímulo sobre la expresión de Ppay y Ppar β indican que ambos se comportan de forma similar a Ppara; en presencia del estímulo con fructosa, tanto a las 12 horas como a las 24 horas (Ppay 12hrs 0.81 ± 0.02 veces vs control 1.02 ± 0.13 ; Ppay 24hrs 2.80 ± 1.62 veces vs control 1.00 ± 0.04) (Ppar β 12hrs 0.61 ± 0.27 veces vs control 1.08 ± 0.28 , Ppar β 24hrs 1.25 ± 0.32 veces vs control 1.02 ± 0.15) (**Figura 12B, C**). Mientras que el estímulo con ácido palmítico reduce los niveles del transcrito de Ppar β en las primeras 12 horas de tratamiento (0.78 ± 0.13 veces vs control 1.01 ± 0.12), para después incrementar de forma significativa a las 24 horas (1.45 ± 0.06 veces vs control 1.02

± 0.13 , $p < 0.05$) (**Figura 2C**); en tanto, el estímulo con ácido palmítico indujo la expresión de Ppay desde las primeras 12 horas (1.33 ± 0.07 veces vs control 1.03 ± 0.21) para alcanzar niveles basales 12 horas después (0.95 ± 0.14 veces vs control 1.01 ± 0.10) (**Figura 2B**).

Por otra parte, el análisis del efecto de los tratamientos sobre la expresión de los genes que codifican para KLF5, KLF6 y KLF9, analizados en la misma curva de tiempo mostraron respuestas variables. A diferencia de KLF5 y KLF6, que incrementan de forma significativa su expresión, tanto a las 12 horas (KLF5 93.26 ± 7.76 veces vs control 1.05 ± 0.22 , $p < 0.001$; KLF6, 1.42 ± 0.29 veces vs control 1.02 ± 0.16) como a las 24 horas (KLF5, 15.98 ± 12.10 veces vs control 1.06 ± 0.23 ; KLF6, 1.21 ± 0.54 veces vs control 1.03 ± 0.17) (**Figura 12D y 13A**), en respuesta al estímulo con ácido palmítico, el efecto de dicho estímulo sobre el transcrito de KLF9, solo incrementa a las primeras 12 horas (2.45 ± 0.26 veces vs control 1.00 ± 0.08 , $p < 0.05$) (**Figura 13B**). Mientras que, por otro lado, el estímulo con fructosa incrementa la expresión solo de KLF5 en la ventana desde las primeras 12 horas (3.43 ± 1.81 veces vs control 1.00 ± 0.04), y se mantiene hasta las 24 horas con dicho estímulo (3.40 ± 0.17 veces vs control 1.05 ± 0.21) (**Figura 12D**). En el mismo experimento observamos que el estímulo con fructosa no tuvo ningún efecto sobre la expresión de KLF6 a las 12 horas (1.03 ± 0.19 veces vs control 1.02 ± 0.15) (**Figura 13A**), pero si sobre KLF9, en donde produjo una disminución importante en su RNAm (0.51 ± 0.12 veces vs control 1.09 ± 0.32) (**Figura 13B**).

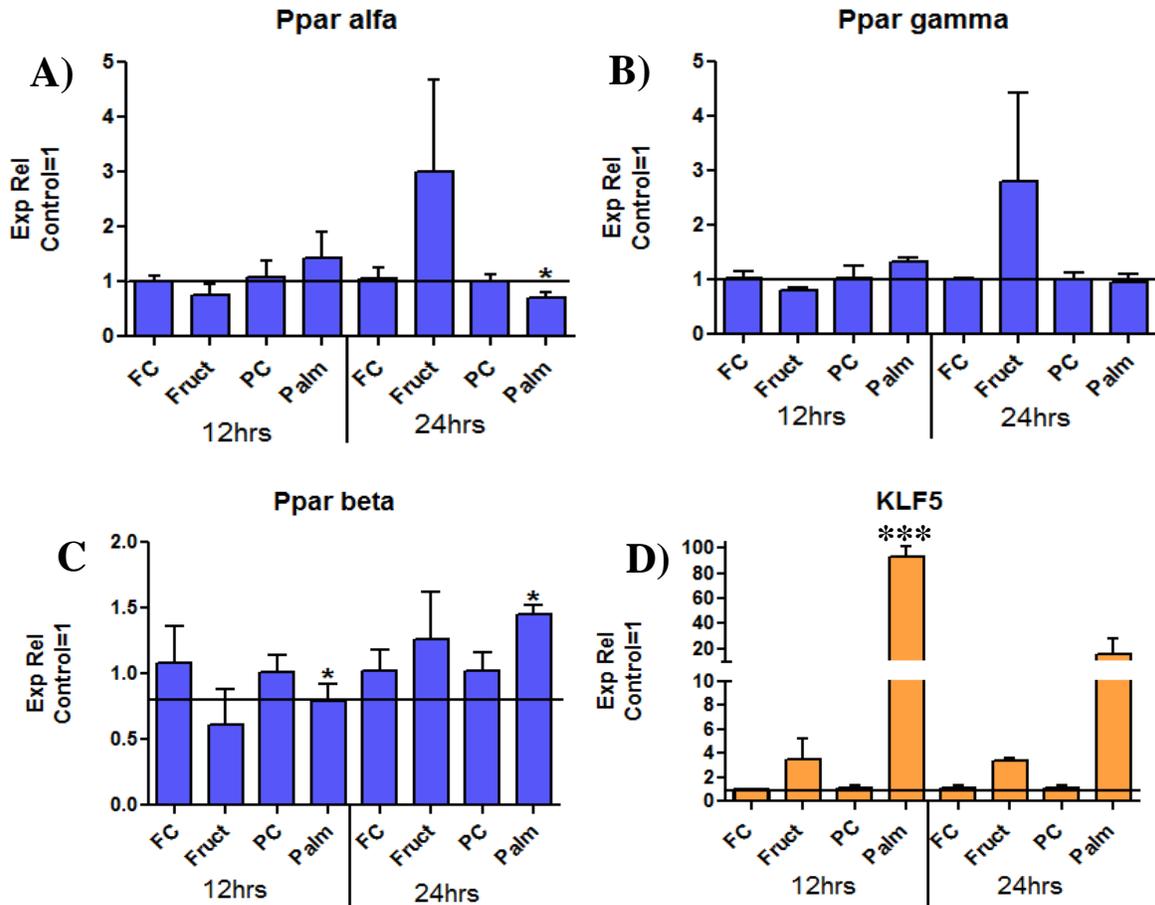


Figura 12. Curva tiempo respuesta de los cambios en la expresión génica. Las células HepG2 se trataron con fructosa (10mM) y ácido palmítico (300µM) por 12 o 24 horas para promover la acumulación de lípidos. En estas gráficas se muestra la expresión del RNAm de los Ppars (A, B, C) y KLF5 (D) medido por PCRs-TR. Se muestra el promedio ± el error estándar de la media. FC: fructosa control, Fruct: Fructosa, PC: palmítico control, Palm: Ácido palmítico. * p<0.05, ***p<0.001; PC vs P.

Finalmente, para corroborar que efectivamente las células responden a los estímulos incrementando el proceso de lipogénesis, decidimos evaluar la respuesta de esta vía a través del análisis de al menos dos genes relacionados con ella. Observamos que el RNAm del gen ELOV5 disminuye a las 12 horas con ambos estímulos (fructosa 0.69 ± 0.04 veces vs control 1.01 ± 0.11 ; ác palmítico 0.76 ± 0.26 veces vs control 1.03 ± 0.17); mientras que a las 24 horas del estímulo con fructosa, la expresión de este gen se mantiene disminuido (0.70 ± 0.16 veces

vs control 1.01 ± 0.12). Con el ácido palmítico se observa un discreto aumento en la expresión comparado con las células control en la misma ventana de tiempo (1.10 ± 0.12 veces vs control 1.01 ± 0.13) (**Figura 13C**).

Por último, la expresión que codifica para SREBP1c aumento su expresión en las primeras 12 horas de estímulo con ácido palmítico (1.76 ± 0.35 veces vs control 1.02 ± 0.13), mientras que con fructosa no se presenta cambios en ninguna de las dos ventanas de tiempo (**Figura 13D**).

En conjunto, los datos de la curva tiempo-respuesta indican que la expresión de los genes de interés se ven modificados con los estímulos; sin embargo, dichos cambios en la expresión ocurren en diferentes tiempos para cada estímulo. Por ejemplo, los cambios más notables en respuesta al tratamiento con fructosa, son a las 24 horas, tanto para los Ppars como para los KLFs. Por otro lado, el estímulo con ácido palmítico indujo los cambios de expresión más evidentes de Ppara, Ppar γ , KLF5, KLF6, KLF9 y SREBP1c a las 12 horas.

Estos datos nos dieron la pauta para establecer que el estímulo con fructosa se hiciera en las primeras 24 horas, y los estímulos con el ácido palmítico se mantuvieran solo las primeras 12 horas.

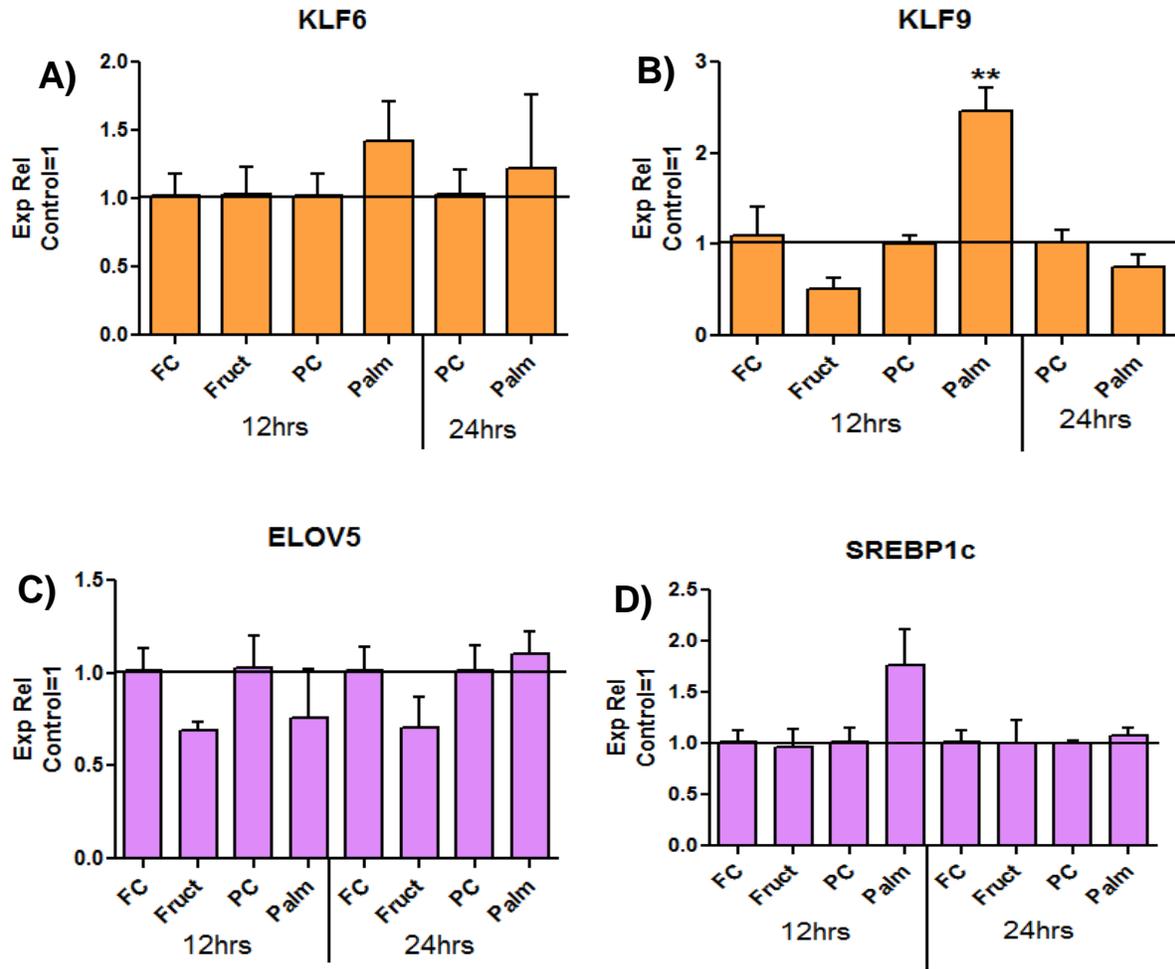


Figura 13. Continuación de expresión de RNAm, medida a partir de PCR-tiempo real en las células HepG2 con el estímulo de fructosa (10mM) y ácido palmítico (300µM). **A)** La expresión de KLF6 a las 12 horas con fructosa y a 24 horas ácido palmítico. **B)** La expresión de RNAm de KLF9 **C)** La expresión de ELOV5. **D)** La expresión de SREBP1c. FC: fructosa control, Fruct: Fructosa, PC: palmítico control, Palm: Palmítico. ** p<0.01; PC vs P.

4.1.2 Análisis de la acumulación de lípidos en un modelo de esteatosis in vitro

A continuación, evaluamos la acumulación de lípidos en nuestro modelo de esteatosis. Para ello realizamos la tinción de rojo oleoso, esta tinción es útil para evaluar cualitativa como cuantitativamente la acumulación de triglicéridos en las células, ya que este colorante tiene afinidad por los lípidos. En la figura 14 se puede observar que la concentración de lípidos tiene una tendencia a aumentar en

las células estimuladas con fructosa, en comparación con las células control. Sin embargo, este aumento es más evidente y estadísticamente significativo con el tratamiento de ácido palmítico, en comparación con las células control. Lo que indica que la fructosa y el ácido palmítico promueven la acumulación de triglicéridos *in vitro* (fruct 1.29 ± 0.12 veces vs control 1 ± 0.08 ; palm 1.55 ± 0.2 veces vs control $1 \pm .075$ $p < 0.001$). Los resultados obtenidos de los experimentos descritos fueron analizados con ayuda del software *GraphPad Prisma 5*, utilizando la prueba T no pareada.

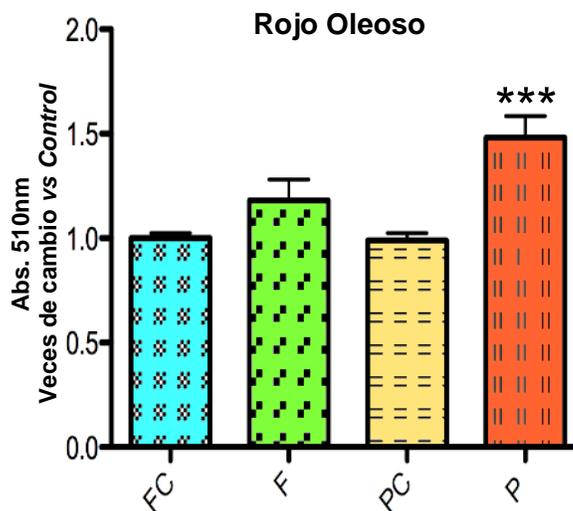


Figura 14. Efecto del tratamiento con ácido palmítico y fructosa en las células HepG2. En la gráfica se observa la acumulación de TG, inducida por los tratamientos descritos previamente. El eje de las abscisas representa la absorbancia (510nm) del colorante rojo oleoso en cada condición. Se muestra el promedio \pm el error estándar de la media. FC y PC: son los controles estimulados con vehículo. F y P son las células tratadas con fructosa o ácido palmítico, respectivamente. *** $p < 0.0001$; PC vs P.

4.2 Características del modelo de esteatosis *in vitro* mediante el análisis de los niveles de expresión del RNAm y de la proteína de los factores de transcripción tipo Krüppel (KLFs) y los Ppars

Una vez que validamos nuestro modelo en función de la acumulación de triglicéridos, decidimos evaluar el efecto de los estímulos esteatósicos sobre el perfil de expresión génica, tanto a nivel de RNA mensajero como de proteína, mediante PCR-TR y Western-Blot, respectivamente. Enfocamos nuestro interés en los genes que codifican para los factores de transcripción tipo Krüppel, así como de los receptores Ppars.

El análisis del nivel de cambio de los transcritos que codifican para los Ppars indican que en respuesta al estímulo con fructosa Ppara α y Ppara γ incrementan su expresión (1.40 ± 0.16 veces vs control 1.08 ± 0.06 , ** p <0.01; 1.28 ± 0.08 veces vs control 1.04 ± 0.09 , respectivamente), mientras que la expresión con Ppara β permanece sin cambios en respuesta a dicho estímulo, comparada con las células control (0.96 ± 0.12 veces vs control 1.00 ± 0.11). En el mismo sentido, los datos del cambio de expresión de los RNAm para los KLFs indican que en respuesta al estímulo con fructosa, tanto KLF5, KLF6 y KLF9 incrementan su expresión, aunque dicho efecto es más claro en KLF5 (2.58 ± 0.40 veces vs control 1.00 ± 0.17) **(Figura 15)**.

Por otra parte, debido a que el tratamiento con fructosa debería inducir cambios en el metabolismo de lípidos o hidratos de carbono, decidimos analizar la expresión de algunos genes involucrados en dichas vías metabólicas. En la figura 15 se muestra el resultado de dicho análisis. Se puede observar que los genes

CPT1A y CYP1A incrementan de forma significativa su expresión (2.10 ± 0.29 , $p < 0.01$; 1.27 ± 0.23 ; 1.52 ± 0.13 , $p < 0.05$ veces vs control 1.02 ± 0.06 , respectivamente), y cinco genes más tienen tendencia a incrementar, aunque no de forma significativa. Por el contrario, el gen que codifica para SCD9 y FABP1, mostraron una tendencia a disminuir con el mismo tratamiento (0.87 ± 0.04 ; 0.80 ± 0.06 veces vs control 1.5 ± 0.09) **(Figura 15C)**.

En conclusión, los datos anteriores indican que el estímulo con fructosa promueve cambios discretos en la expresión de los Ppars, los KLFs, así como de los genes lipogénicos, lo cual puede ser un factor contribuyente en el desarrollo de la esteatosis hepática.

En cuanto al tratamiento con el ácido palmítico, los cambios de la expresión de los genes se observan en la figura 6. Se puede observar que tanto Ppara como Ppar γ incrementan su expresión de manera significativa (1.55 ± 0.24 ; 1.69 ± 0.17 veces vs control 1.02 ± 0.12 $p < 0.05$), siendo Ppar γ más evidente, mientras que Ppar β permanece sin cambios en su expresión en comparación a su control **(Figura 16A)**.

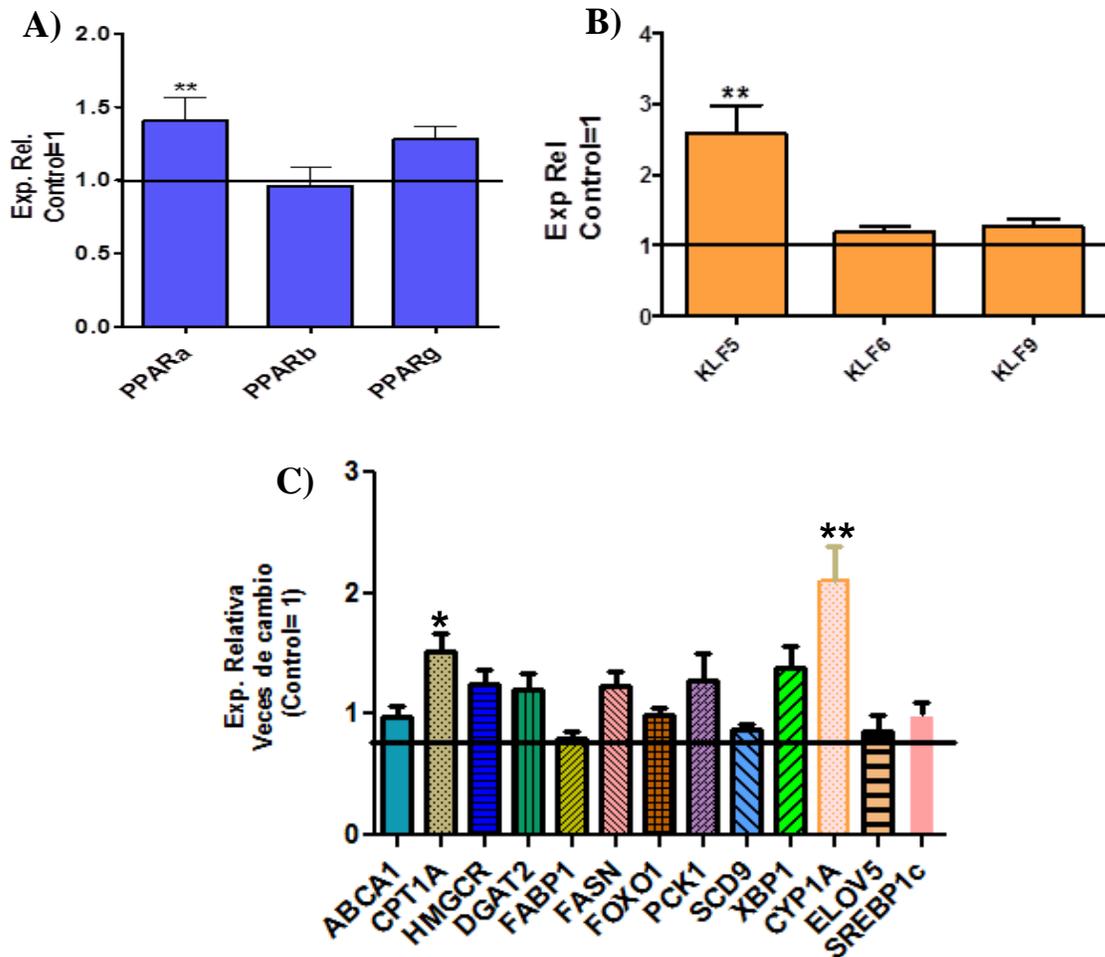


Figura 15. Efecto del tratamiento con fructosa sobre la expresión génica de HepG2. Las células HepG2 se trataron con fructosa (10mM) 24 horas. En estas gráficas se muestra la expresión del RNAm de PPARα, PPARβ y PPARγ (A,) de los KLFs (B) y de varios genes relacionados con el metabolismo de lípidos (C). Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes ± el error estándar de la media. *p < 0.05, ** p < 0.01 F vs F Control.

En cuanto a los cambios asociados con los KLFs, observamos que KLF5 y KLF9 aumentan su expresión (3.12 ± 1.24 ; 2.25 ± 0.17 , $p < 0.01$ veces vs control 1.07 ± 0.19) (**Figura 16B**). De manera interesante, el análisis de la expresión de los genes lipogénicos mostró que la mayoría incrementa su expresión en respuesta a este tratamiento, siendo los incrementos más notables para los genes CPT1A, FABP1 y PCK1 (2.37 ± 0.22 , $p < 0.01$; 1.37 ± 0.17 , $p < 0.05$; 1.64 ± 0.21 , $p < 0.05$ veces vs control 1.09 ± 0.03) (**Figura 16C**); también encontramos que otros

de estos genes no muestran cambios en respuesta al tratamiento por ejemplo, ABCA1, SCD9, ELOV5, entre otros. Por otro lado, los genes que codifican para DGAT2 y XBP1, disminuyeron su expresión (0.89 ± 0.06 ; 0.90 ± 0.07 veces vs control 1.03 ± 0.10) (Figura 16C).

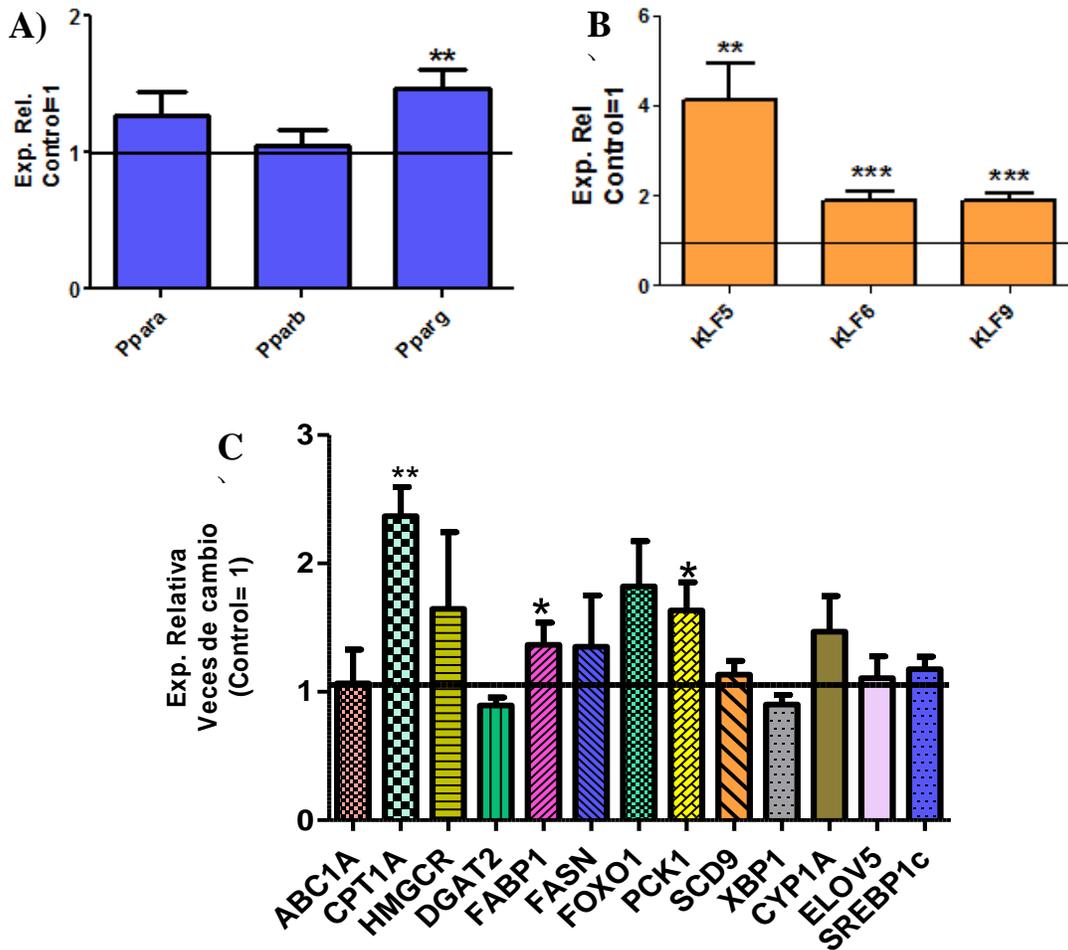


Figura 16. Efecto del tratamiento con ácido palmítico sobre la expresión génica de HepG2. Las células HepG2 se trataron con ácido palmítico (300 μ M) por 12 horas. En estas gráficas se muestra la expresión del RNAm de PPAR α , PPAR β y PPAR γ (A), de los KLFs (B) y de varios genes relacionados con el metabolismo de lípidos (C). Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes \pm el error estándar de la media. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, palmítico vs palmítico control.

Estos datos nos sugieren que el ácido palmítico es un factor que contribuye al desarrollo de la esteatosis, y el cambio en la expresión de los Ppars, KLFs y genes que participan en la fisiopatología de la enfermedad hepática temprana es más evidente con el ácido palmítico en comparación con la fructosa.

Los hallazgos que observamos respecto a la respuesta de los RNA mensajeros de los genes de interés a los estímulos pro-adipogénicos se corroboraron a nivel de proteína. Decidimos hacer los análisis a nivel de proteína solo con el estímulo de ácido palmítico, debido a que se observó que es más eficiente para el desarrollo de la esteatosis. Para realizar el análisis estadístico de estos experimentos se hizo una densitometría en el software *ImageJ*, con la finalidad de conocer la densidad de las bandas correspondientes y de esta forma poder ser cuantificado. Posteriormente, se metieron los datos de la densitometría al software *GraphPad Prisma 5*, y se realizó una prueba T no pareada.

Observamos que a diferencia del transcrito, la proteína de Ppara permaneció sin cambios en condiciones de esteatosis (1.01 ± 0.06 veces vs control 1.01 ± 0.20), mientras que, por el contrario, la expresión de Ppar β disminuyó de forma importante en respuesta al mismo estímulo (0.77 ± 0.08 veces vs control 0.98 ± 0.12) (**Figura 17**).

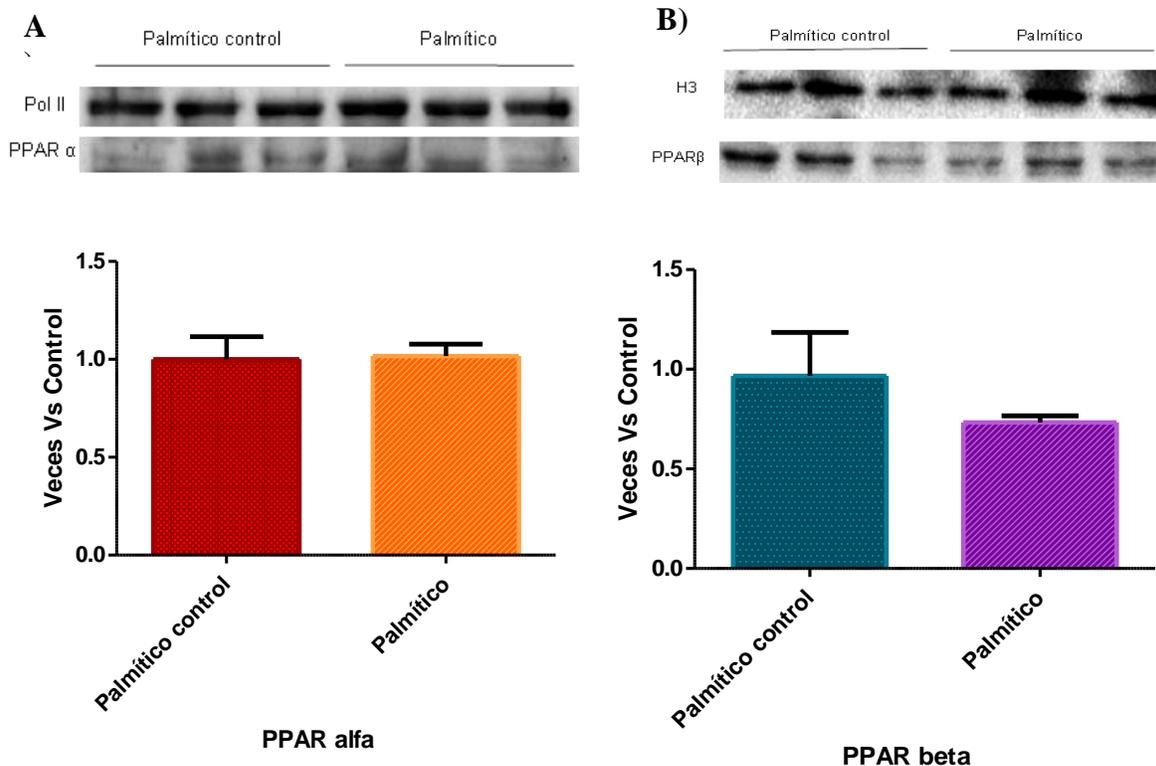


Figura 17. Efecto del ácido palmítico sobre la expresión de proteína en las células HepG2. Las células se incubaron con ácido palmítico por 12 horas. Posteriormente, la proteína nuclear se resolvió en gel de poliácridamida y las proteínas correspondientes se detectaron con anticuerpos específicos. Se muestran las bandas de Ppara α (**A**) y Ppar β (**B**), así como la cuantificación de la densidad de las mismas. Las gráficas representan el promedio \pm el error estándar de las condiciones indicadas.

De manera interesante, la expresión de Ppar γ a nivel de proteína incrementa al igual que el RNAm, comparado con su control (1.57 ± 0.14 veces vs control 1.00 ± 0.20) (**Figura 18A**). Adicionalmente, la expresión de KLF6 no se observan cambio en la expresión a nivel de proteína (1.06 ± 0.08 veces vs control 0.99 ± 0.066) (**Figura 18B**).

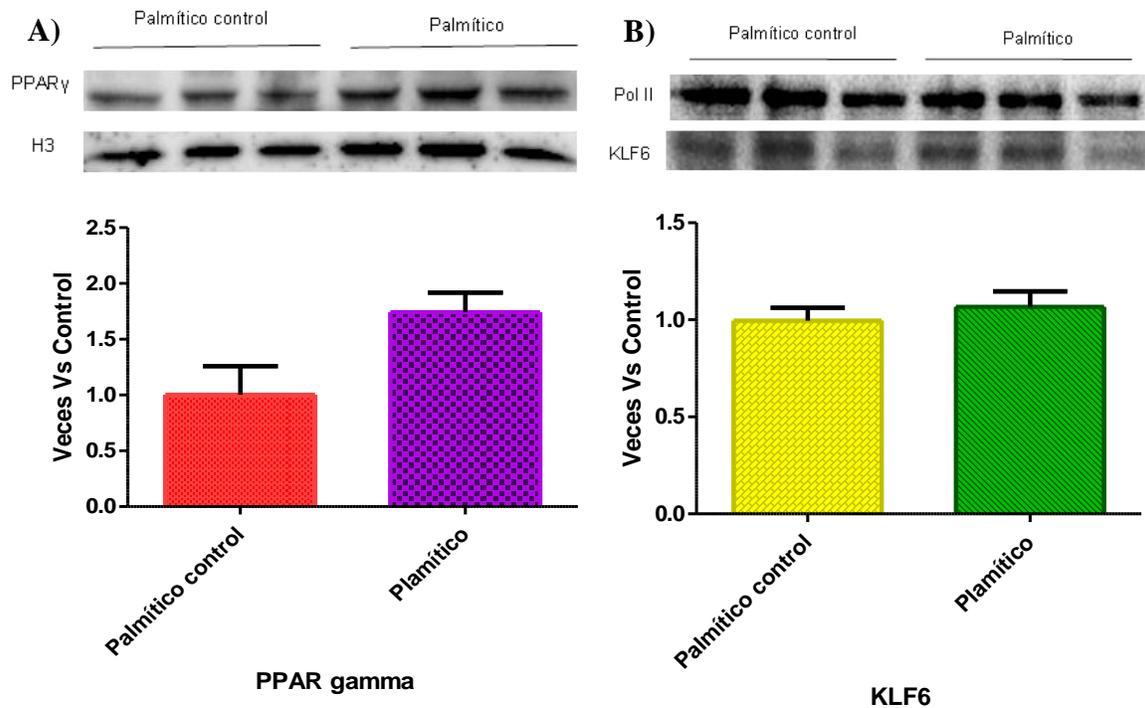


Figura 18. Efecto del ácido palmítico sobre la expresión de proteína en las células HepG2. Las células se incubaron con ácido palmítico por 12 horas. Posteriormente, la proteína nuclear se resolvió en gel de poliacrilamida y las proteínas correspondientes se detectaron con anticuerpos específicos. Se muestran las bandas de Ppary (A) y KLF6 (B), así como la cuantificación de la densidad de las mismas. Las gráficas representan el promedio \pm el error estándar de las condiciones indicadas.

4.3 Determinación del efecto a nivel transcripcional de los factores tipo Krüppel en las regiones promotoras de los genes que codifican para los Ppars en un modelo de esteatosis no alcohólica *in vitro*.

Para identificar si los Ppars pueden ser potenciales blancos de regulación de los KLFs, se hizo un análisis *in silico* de las secuencias promotoras de PPAR γ , PPAR α , PPAR β/δ , utilizando el algoritmo descrito previamente *Regulatory Sequence Analysis Tools(RSAT)* (PATSER, (Hertz and Stormo, 1999). Mediante este análisis, logramos identificar potenciales elementos de respuesta para los factores KLFs del tipo GCCCCACCC ⁷⁹. Dicho análisis evidenció la presencia de

varios sitios potenciales de respuesta para factores KLFs dentro de las primeras 1000 a 1500 pares de bases (pb) de la región 5 prima y río arriba del sitio de inicio transcripcional; dicho elemento además, están conservado en la escala filogenética, sugiriendo que, efectivamente los receptores nucleares Ppars, pueden ser blanco regulación por miembros de la familia de factores tipo KLF (Figura 19).

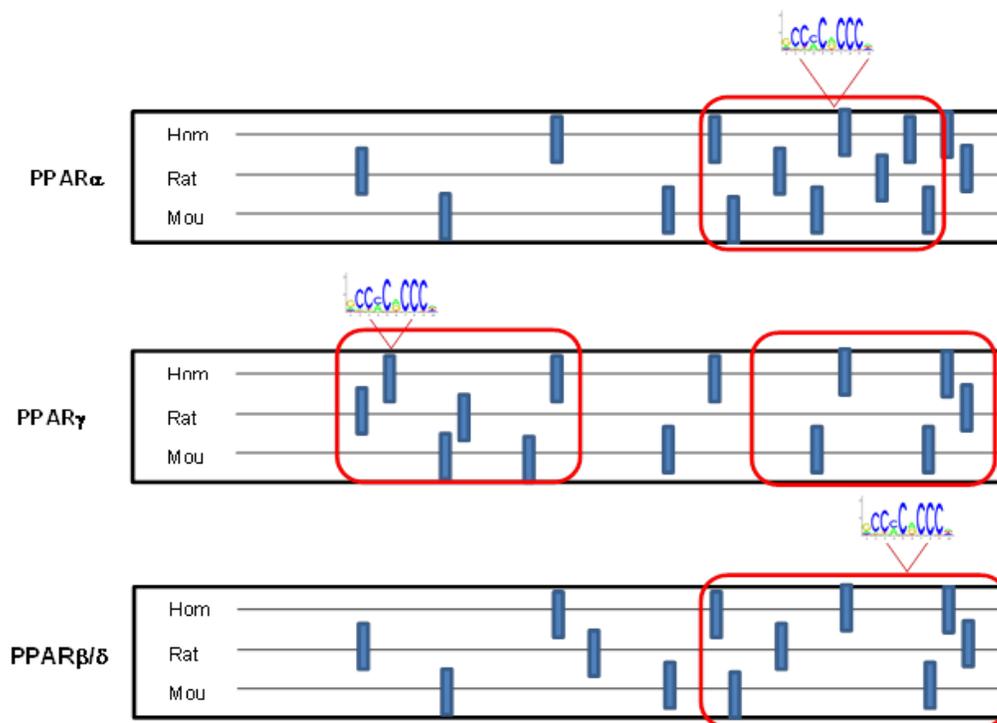


Figura 9. Identificación de elementos de respuesta tipo krüppel en las regiones promotoras de los genes PPARs. Se muestra un mapa del análisis de las secuencias de los genes de humano, rata y ratón. Los rectángulos verticales indican las posiciones relativas de los elementos tipo GCCCACCC DNA.

Lo anterior nos permitió identificar los segmentos dentro de las secuencias promotoras que contienen los sitios potenciales de unión para los factores KLFs. Por lo tanto, el siguiente experimento consistió en la determinación de la capacidad de unión de dichos elementos, mediante ensayos de

inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, por sus siglas en inglés). Para ello, se diseñaron 3 pares de oligonucleótidos que mapean los elementos tipo GCCCCACCC, denominados KEM, río arriba del sitio de inicio de la transcripción, denominados KEM.

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación, primero se hizo la fragmentación de cromatina, la cual se realizó por medio de la sonicación; para verificar que la cromatina fuera fragmentada de forma adecuada se hizo un gel de agarosa al 1% (Figura 20).

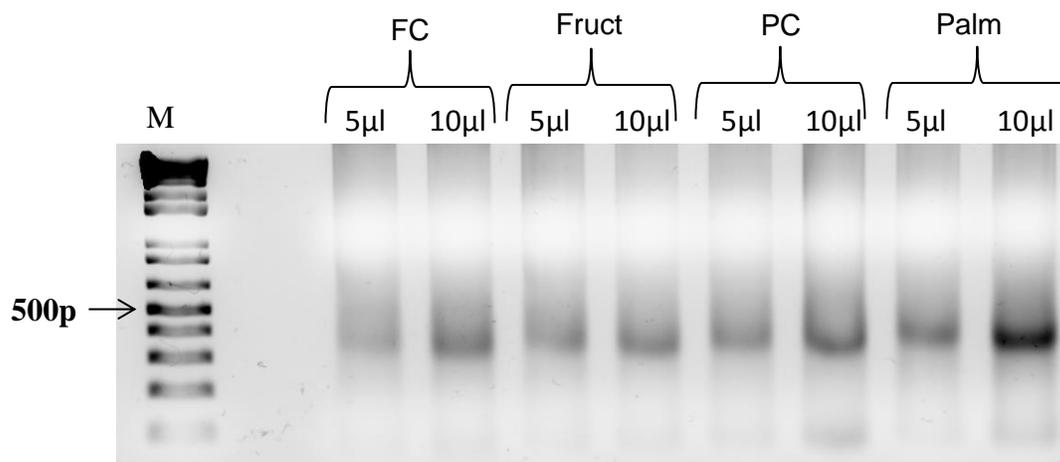


Figura 20. Gel de agarosa 1% para verificar la fragmentación de la cromatina. Imagen representativa por electroforesis en un gel de agarosa, el gel fue con dos diferentes volúmenes. Se muestra la cromatina fragmentada por medio de la sonicación. Esta cromatina se encuentra por debajo de las 500pb indicada por el marcador de peso molecular (MW) Fruc.C, fructosa control; Fruct, fructosa; Palm.C, palmítico control; Palm, palmítico.

El análisis del ChIP se muestra en la figura 21 y 22. En la figura 21 se observan los tres segmentos de la región promotora de Ppara y se pueden observar cambios; en KEM1 se observa que en el control no hay ninguna unión de los KLFs, pero con el estímulo de ácido palmítico se observa una ligera unión de KLF6; en el KEM2 se puede ver que en el control hay una unión de KLF5, 6 y

9, mientras que con el estímulo de ácido palmítico la unión de KLF5 se pierde y en KEM3 se ve en el control que se unen KLF5 y 9, mientras que KLF6 no se ve unido, pero con el estímulo, las uniones de KLF5 y 9 se debilitan pero se identifica la unión de KLF6 (**Figura 21A**). En el caso de Ppar β se ve un cambio de unión solo en una región promotora, en el KEM1 no se ve ninguna unión en el control ni estímulo, en KEM2 se identifica una unión de KLF5, 6 y 9 en el control, y no hay ningún cambio con el ácido palmítico y en KEM3 es donde se identifican cambios, ya que en el control se observa no hay unión, pero con el estímulo se une KLF9 (**Figura 21B**).

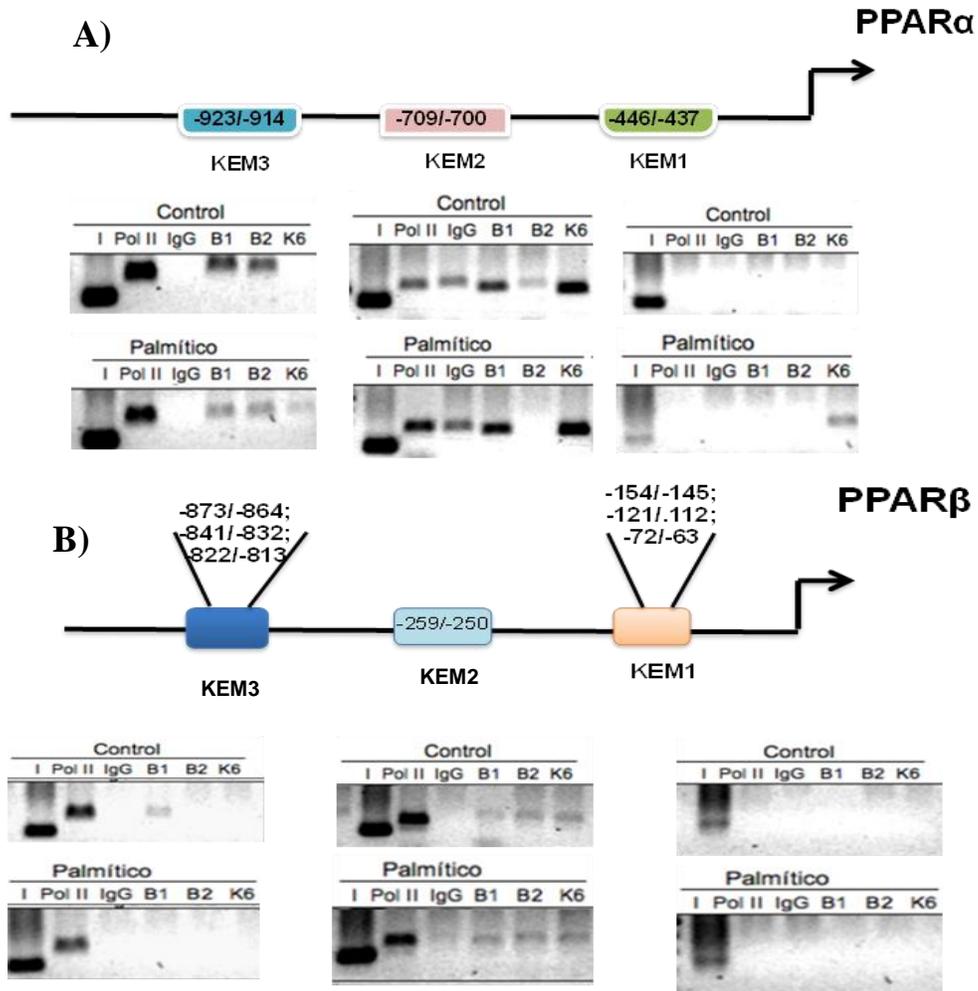


Figura 21. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de las regiones promotoras de los KLFs con una secuencia de GCCCCACCC a los cuales se les denomina KEM. **A)** ChIP de Ppar α **B)** ChIP de Ppar β . I, input; Pol II, control positivo; IgG, control negativo; B1, KLF9; B2, KLF5; K6, KLF6.

Finalmente en la figura 22 se observa el ChIP de Ppar γ , y se identifican cambios en dos de las regiones promotoras, en KEM1 se puede observar que en condiciones control hay unión con los 3 KLFs, estas uniones se ven más intensas con KLF6 y 9, y con KLF5 esta unión se ve más débil; mientras que en condiciones de esteatosis, se observa que estas uniones de KLF6 y 9 disminuyen, mientras que KLF5 desaparece. En el caso de KEM2 no se ven cambios con el

control y el estímulo, ya que se observa la unión de KLF5, 6 y 9 tanto en el control como en el estímulo; En el caso de KEM3 en condiciones control se ve una unión de KLF6 y 9, mientras que con el estímulo de esteatosis la unión de KLF6 se pierde y KLF5 que no estaba en condiciones control, se une a ese segmento en respuesta al estímulo. Finalmente, observamos que la unión de KLF9 no muestra cambios con el estímulo de esteatosis.

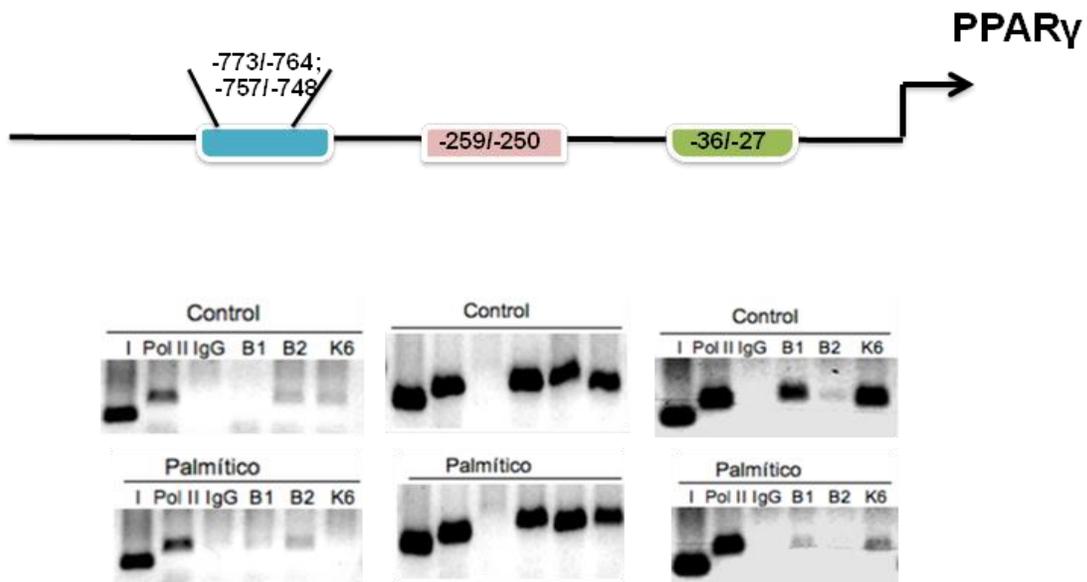


Figura 12. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de las regiones promotoras de los KLFs con una secuencia de GCCCCACCC a los cuales se les denomina KEM. Se observa el ChIP de Pparγ. I, input; Pol II, control positivo; IgG, control negativo; B1, KLF9; B2, KLF5; K6, KLF6.

En conclusión el conjunto de los datos anteriores indican que efectivamente los elementos de respuesta llamados KEM son capaces de reconocer y unir a los factores tipo Krüppel, esto en respuesta al estímulo de esteatosis en nuestro modelo *in vitro*. Esto sugiere fuertemente que los KLFs podrían participar activamente en la regulación de la expresión de los Ppars en la fisiopatología de la esteatosis.

5. Discusión

5.1 Análisis de la validación del modelo de esteatosis *in vitro*

Retomando el objetivo principal que se propuso en esta investigación, el cual consistió en determinar el efecto de los factores de transcripción tipo Krüppel (KLFs) en la expresión génica de los receptores Ppars en un modelo de esteatosis no alcohólica *in vitro*, observamos que nuestro modelo propuesto para el desarrollo de la esteatosis fue adecuado, ya que bajo las condiciones del estímulo con fructosa o ácido palmítico, se puede desarrollar la esteatosis de manera exitosa.

En este sentido, se realizó una curva tiempo-respuesta para identificar el tiempo en el que existiera el cambio más notable en la expresión de los genes de interés (Ppara α , Ppar γ , Ppar β , KLF5, KLF6, y KLF9), en la línea celular HepG2. Las ventanas de tiempo que nosotros utilizamos fueron 3, 6, 12 y 24 horas. Los tiempos que se utilizaron en nuestra curva concuerdan con periodos de tiempos que han ocupado en otros estudios relacionados con la esteatosis hepática. Uno de estos estudios publicado en el 2007, cuyo objetivo fue examinar el efecto de la esteatosis hepática en la producción de interleucina 8 (IL8), mediante la inducción de la esteatosis con ácido palmítico (300 μ M) en la línea celular HepG2; mostró que existe mayor incremento en la expresión de IL8 a las 3 horas de tratamiento, mientras que a las 6 y 24 horas se observó la disminución paulatina de dicha expresión⁹⁰.

Así mismo, otro estudio publicado en el 2014, en donde la esteatosis también fue inducida mediante ácido palmítico y ácido oleico (1:2) en las líneas

celulares IHH y HuH7, mostró que la expresión de las citocinas IL6 e IL8 fue mayor a las 24 horas con una concentración de 600 μ M de ácido palmítico y ácido oleico en células IHH, mientras que con las células HuH7 se observó el mismo efecto, pero a una concentración de 1200 μ M⁹⁴.

En contraste, lo que nosotros observamos, es que la ventana de 12 horas con el estímulo de ácido palmítico es donde se registra mayor expresión tanto de los Ppars, como de los KLFs, mientras que las 24 horas, es donde se observan mayores cambios en la expresión de estos genes, con el estímulo de fructosa (ver figura 12 y 13).

Por otro lado, para validar nuestro modelo de esteatosis *in vitro*, realizamos tinción con rojo oleoso con la finalidad de evaluar el almacenamiento de triglicéridos en la línea celular HepG2. La tinción con rojo oleoso, es una técnica reportada previamente en otros modelos de esteatosis tanto *in vitro* como *in vivo*⁹⁵⁸⁵. Los cambios que se observan en nuestro modelo con el estímulo de ácido palmítico o fructosa es que se incrementa de forma significativa la acumulación de triglicéridos en las células HepG2. Otros modelos que usan la línea celular HepG2 observan resultados consistentes con nuestro modelo. Por ejemplo, en el 2011 se publicó un estudio en el que incubaron células HepG2 con ácido palmítico y ácido oleico (2:1) por 24 horas, y lo que observaron en la tinción de rojo oleoso es que se incrementó el almacenamiento de lípidos en comparación a su control⁸⁶; así mismo, otro estudio en donde inducen la esteatosis con el estímulo con fructosa tuvo un efecto similar, ya que también se aumentó la acumulación de lípidos en las células tratadas con fructosa 25mM por 24 horas⁹². Por otro lado, datos derivados en ratas alimentadas con una dieta alta en fructosa (58%), muestran que existe

acumulación significativa de lípidos en el hígado, lo cual es consistente con nuestros datos *in vitro*.

Sin embargo, y no obstante que ambos estímulos son eficientes en la promoción de la acumulación de lípidos en los hepatocitos, este efecto fue más evidente en las células tratadas con el ácido palmítico, cuando se compara con aquellas tratadas con fructosa. Lo anterior sugiere que el primero promueve el desarrollo de esteatosis en un intervalo de tiempo menor de exposición.

5.2 Cambios en la expresión de los Ppars a nivel de RNA mensajero en el modelo de esteatosis *in vitro*

Ya que validamos nuestro modelo e identificamos los tiempos de estímulo con cada tratamiento, realizamos los experimentos para evaluar la expresión del RNA mensajero de los Ppars, KLFs y genes que participan en el metabolismo de los lípidos, por medio de PCR-TR. Los resultados de dicha evaluación nos mostraron que tanto los Ppars como los KLFs, modifican su expresión en respuesta a los estímulos ya descritos (Ver figura 14 y 15). Específicamente, la expresión de los genes Ppars con estímulo de fructosa o ácido palmítico muestran modificaciones interesantes. En el caso de Ppara α , en nuestro modelo se observa un aumento en su expresión la cual es estadísticamente significativo; mientras que, en otros estudios reportan una disminución en la expresión de Ppara α en respuesta al estímulo con fructosa (25mM) por 24 horas en células HepG2 ⁹². Lo observado en nuestro modelo, se podría explicar esta inconsistencia por la

concentración del estímulo que nosotros adicionamos, ya que nuestro tratamiento con fructosa fue de 10mM. Otra explicación es que Ppar α es la isoforma que más se expresa en el hígado, donde promueve la β -oxidación de los ácidos grasos, por lo que se esperaría que en la esteatosis hepática su expresión disminuyera; sin embargo, en nuestro modelo observamos un aumento, lo que sugiere que es un efecto compensatorio por el aumento del flujo de ácidos grasos hacia los hepatocitos.

Por otra parte la expresión de Ppar β no muestra cambios con los estímulos de ácido palmítico, ni con fructosa en comparación con el control. Otros estudios han reportado que la expresión de este receptor tiene un efecto protector contra la esteatosis y su progresión a esteatohepatitis, ya que la deficiencia en la expresión de Ppar β hace más sensible al hígado a los efectos hepatotóxicos de algunos medicamentos como el azoximetano y el tetracloruro de carbono (CCL₄) que promueven la fibrosis⁹⁶. Ppar β se expresa en el músculo esquelético, participando en el catabolismo de los ácidos grasos en este tejido, sin embargo su actividad es menor en el hígado, en donde su expresión está relacionada con la β -oxidación; es posible que en nuestro modelo de esteatosis *in vitro*, donde el nivel de cambio es nulo, es debido a que la expresión basal de este factor es escasa; o que en condiciones de esteatosis tampoco se expresa para producir algún efecto protector o compensatorio.

Así mismo, Ppar γ incrementa su expresión en respuesta a los estímulos con ácido palmítico o fructosa; sin embargo, este cambio es más evidente con el estímulo de ácido palmítico. Estudios en modelos de esteatosis *in vitro* e *in vivo*, han reportado que la expresión de Ppar γ se incrementa. Por ejemplo, un modelo

de ratones ob/ob los cuales desarrollan obesidad y diabetes tipo 2 de forma espontánea, muestran un incremento significativo en la expresión de Ppar γ ⁹⁷. Consistentemente, ratones ob/ob deficientes para la expresión de gen Ppar γ en el hígado, muestran una disminución en los triglicéridos totales, así como una disminución en la expresión de genes que participan en la lipogénesis y en la síntesis de ácidos grasos, indicando que el receptor Ppar γ tiene un papel relevante en el desarrollo de la esteatosis hepática. Lo anterior es consistente con nuestros resultados ya que nosotros observamos aumento en la expresión de Ppar γ en respuesta los estímulos; más aún, la expresión de este gen se ve incrementando a nivel de proteína, lo que refuerza la idea de que este receptor participa en la esteatosis.

5.3 Interacción entre los Ppars y los KLFs en un modelo de esteatosis *in vitro*

La expresión del RNAm de KLF5, KLF6 y KLF9 incrementó en respuesta a los dos estímulos ya mencionados, sin embargo, estos cambios son más evidentes con el estímulo de ácido palmítico. En las figuras 15 y 16 se observa que el aumento de KLF5 es más evidente que KLF6 y KLF9 con el estímulo con fructosa y ácido palmítico. En modelos *in vivo* han demostrado que los ratones heterocigotos de KLF5 (+/-) presentan defectos en el desarrollo del tejido adiposo blanco, debido a que tienen defectos en la diferenciación adipocítica, así mismo, la expresión de Ppar γ disminuye de forma importante ⁹⁸. Mientras que, la sobreexpresión de KLF5 en células 3T3-L1, induce la diferenciación hacia el

fenotipo de adipocito, e interesantemente, se observa un aumento en la expresión de Ppar γ ⁹⁸. Esto sugiere que KLF5 regula la expresión de Ppar γ durante el proceso de adipogenesis, evidenciando el efecto que tiene en el metabolismo de los lípidos dentro del tejido adiposo. Estos datos apoyan la idea de que este factor ejerce un efecto similar durante el desarrollo de la esteatosis hepática, ya que nuestros datos a nivel de RNAm indican un aumento en la expresión de estos dos factores. Más aún, los ensayos de ChIP muestran que KLF5 reconoce los tres elementos de respuesta de Ppar γ en condiciones basales, mientras que en respuesta al estímulo con ácido palmítico, dos de estos elementos (KEM2 y KEM3) incrementan la unión de KLF5, lo que nos indica que este factor de transcripción, está regulando de forma positiva la expresión de Ppar γ , por tanto, promueve la esteatosis en células HepG2.

En el mismo sentido, los ratones heterocigotos para KLF5 (+/-) son resistentes al desarrollar de la obesidad inducida por dieta alta en grasa, a la hipercolesterolemia y a la intolerancia a la glucosa. En lugar de eso, los ratones aumentan su gasto energético, debido al incremento en la expresión de genes que codifican proteínas que participan en la oxidación de lípidos en el músculo sóleo, tales como la carnitina-palmitoiltransferasa 1b (CPT1b) y la proteína desacoplante 2 y 3 (UCP2 y UCP3) ⁹⁹. Así mismo, se demostró que KLF5 debe ser modificado por sumoilación para reprimir la expresión de estos genes que participan en la oxidación de ácidos grasos en condiciones basales, lo cual le permite interactuar con los correpresores de receptor nuclear (NCoR) y SMRT, un efecto similar a lo observado cuando Ppar β no está asociado con su ligando. En contraste, los ligandos de Ppar β , estimulan la desumilación de KLF5, lo que induce su

asociación con los complejos de activación transcripcional que contienen tanto la proteína de unión a Ppar β y la proteína de unión a CREB (CBP); por consiguiente, se observa la activación de la expresión de este grupo de genes que regulan la oxidación de lípidos; por lo tanto, la sumoilación es un interruptor molecular que controla la función KLF5 y la maquinaria transcripcional que regula el metabolismo de los lípidos ⁹⁹. En este contexto, los datos publicados y lo que nosotros observamos en nuestro modelo, sugiere que la expresión de Ppar β está más relacionada con la oxidación de los lípidos a nivel muscular. Sin embargo, el incremento en la expresión de KLF5, y datos de ChIP muestran, que KLF5 se une al elemento de respuesta KEM2 presente en el promotor de Ppar β en condiciones basales y de esteatosis, indicando que KLF5 regula la expresión de Ppar β en el hepatocito, pero de forma más discreta, e indica que este factor regula la expresión de forma negativa, ya que impide que Ppar β se exprese y promueva la oxidación de ácidos grasos en el hepatocito.

Por otro lado, observamos que KLF9 aumenta su expresión a nivel de RNA mensajero, principalmente con el estímulo de ácido palmítico. Existe evidencia que indica que KLF9 también regula la expresión de Ppar γ durante la adipogénesis. En células 3T3-L1 se ha observado que KLF9 aumenta su expresión en el estadio medio de la diferenciación, así como también la expresión de Ppar γ 2; en contraste, la inhibición de KLF9 provoca alteración en la adipogénesis y la disminución de Ppar γ 2 ⁸³. Así mismo, se ha demostrado la existencia de dos sitios de unión a KLF9 dentro de las regiones del promotor proximal de Ppar γ 2, lo que indica que KLF9 podría regular directamente la expresión de Ppar γ 2; además, se muestra que la sobreexpresión de Ppar γ 2 restaura la diferenciación de adipocitos

inducida por la inhibición en la expresión de KLF9; indicando que KLF9 es un factor clave en la diferenciación adipocítica a través de la regulación de la expresión de Ppar γ 2 en el estadio medio de la adipogénesis ⁸³. En nuestro modelo de esteatosis observamos un aumento en la expresión de estos dos factores. De forma interesante, en los ensayos de CHIP, KLF9 reconoce dos sitios de unión (KEM1 y KEM2) dentro de la región promotora de Ppar γ en condiciones basales, mientras que en respuesta al estímulo, una de estas regiones muestra disminución en la unión de KLF9 (KEM1) (ver figura 22); por otro lado, otra de estas regiones muestra un pequeño aumento en la unión, sugiriendo que KLF9 está regulando la expresión de Ppar γ de forma directa, aunque el efecto no tan evidente como con KLF5, en condiciones de esteatosis.

Adicionalmente, observamos que la expresión de KLF6 incrementa a nivel de RNA mensajero, con el estímulo de ácido palmítico. En este sentido, recientemente se demostró que ratones nulos para la expresión de KLF6 en el hígado y en condiciones de NAFLD, reducen el contenido de grasa corporal. Este efecto parece ser debido a un proceso de regulación post-transcripcional, ya que KLF6 regula negativamente la expresión del miRNA 10b, el cual en condiciones basales, reprime la expresión de PPAR α a nivel traduccional ⁸⁴. Nuestros resultados muestran que a pesar del aumento en la expresión de Ppar α a nivel de RNA mensajero, esto no se refleja a nivel de proteína; sin embargo, los ensayos de CHIP muestran que en condiciones basales KLF6 incrementa su unión en el elemento de respuesta KEM2, presente en el promotor de Ppar α ; mientras que, en condiciones de esteatosis, se incrementa la unión en los tres elementos de respuesta, lo que sugiere fuertemente que KLF6 regula la expresión de Ppar α a

nivel transcripcional. Pero que al igual que lo reportado por Bechmann, exista un elemento adicional que este regulando la traducción del RNAm de Ppara.

Como ya se indicó previamente, la esteatosis hepática no alcohólica se considera una patología crónica y progresiva, ya que deriva a otras patologías más agresivas como NASH. Así que es importante entender los mecanismos moleculares que alteran el metabolismo energético y que a su vez, provoca el desarrollo de NAFLD.

Los datos que aporta este trabajo son interesantes, ya que en conjunto, los resultados demuestran que los estímulos con fructosa o ácido palmítico participan en el desarrollo de la esteatosis *in vitro*, dado que promueven la alteración en la expresión de diversos genes que participan principalmente en el metabolismo de ácidos grasos, como los Ppars. Lo más novedoso de nuestro estudio es que demostramos que KLF5, KLF6 y KLF9 están participando activamente en la fisiopatología de la esteatosis, lo cual, no había sido reportado anteriormente. Estos factores de transcripción aparentemente regulan la expresión de los Ppars a nivel transcripcional, promoviendo el desarrollo de la esteatosis hepática *in vitro*, y nos dan la oportunidad de realizar más estudios *in vitro* e *in vivo*, y seguir aclarando los mecanismos que alteran el metabolismo energético que promueve el desarrollo de esta enfermedad y de esta forma encontrar posibles blancos terapéuticos que permitan beneficiar a las personas que la padecen. La NAFLD es la alteración hepática más común y ha incrementado su prevalencia en paralelo con la obesidad, afectando cada vez a más personas en México y el mundo. Por lo que es de suma importancia encontrar blancos terapéuticos efectivos para el tratamiento de estos pacientes.

Como ya se indicó anteriormente, no hay un tratamiento estándar para la NAFLD, el único tratamiento que podría ayudar a prevenir la progresión de esta enfermedad es la modificación en el estilo de vida, así como dieta adecuada y actividad física moderada. Por lo que es importante que los nutriólogos tengan un conocimiento amplio sobre los efectos adversos que provoca el consumo de ciertos alimentos, en este caso la fructosa y el ácido palmítico, ya que promueven el desarrollo de obesidad y sus complicaciones, las cuales son cada vez más frecuentes en a nivel mundial. Por lo tanto, el papel de los nutriólogos en el manejo de los pacientes con NAFLD es crucial para la prevención en el desarrollo y la progresión de esta patología.

6. Conclusiones

Los objetivos propuestos en esta investigación se alcanzaron exitosamente, por lo que las conclusiones más relevantes que arrojan nuestros datos son:

1.- Los estímulos con fructosa y ácido palmítico promueven el desarrollo de esteatosis en las células HepG2. Ambos tratamientos son factores de riesgo para el desarrollo de la esteatosis; sin embargo, este efecto es más evidente con ácido palmítico.

2.- La expresión del mRNA de los KLFs, se incrementa de forma discreta con el estímulo de fructosa, mientras es más evidente con el estímulo de ácido palmítico. En esta investigación se ha demostrado que la expresión de KLF5, KLF6 y KLF9 se modifica en respuesta de los estímulos, sugiriendo que tienen un efecto en la fisiopatología de la enfermedad hepática temprana.

3.- A nivel de proteína, el estímulo con ácido palmítico no tuvo un efecto significativo sobre el receptor PPAR α ; mientras que dicho estímulo, disminuye la expresión de Ppar β de forma discreta. El efecto neto sobre Ppar γ es el incremento discreto de su expresión. Lo anterior sugiere que, los procesos de oxidación de los ácidos grasos están siendo reprimidos (disminución de Ppar β); mientras que, los procesos lipogénicos son promovidos (incremento de Ppar γ).

4.- Los experimentos de ChIP, indican que los KLFs se unen a las regiones promotoras de los Ppars y podrían regular la expresión de los mismos en condiciones basales y de esteatosis.

5.- Los KLFs participan activamente en el desarrollo de la esteatosis hepática in vitro, regulando la expresión a nivel transcripcional de los Ppars.

7. Recomendaciones

Los datos expuestos en este trabajo sugieren la existencia de mecanismos moleculares adicionales que pudiesen modificar la actividad de los Ppars en condiciones patológicas. Basado en nuestras evidencias, creemos que se pueden realizar experimentos adicionales para elucidar tales mecanismos. Por ejemplo, en el modelo *in vitro*, sería interesante silenciar o sobreexpresar a los distintos KLFs (KLF5, KLF6 y KLF9) para entonces evaluar la acumulación de triglicéridos, así como los niveles de cambio de aquellos genes involucrados en el metabolismo de los lípidos. Además, se podría evaluar el efecto del estímulo con una mezcla de distintos ácidos grasos, o bien, usar un agonista de la activación de los receptores tipo tirosin-cinasa, los cuales se sabe que activan a los KLFs (cita). En el mismo sentido, se puede identificar la vía de señalización por la cual los KLFs están promoviendo el desarrollo de la esteatosis hepática, ya sea *in vivo* o *in vitro*.

Adicionalmente, se podría generar un ratón nulo para la expresión de los genes que codifican a KLF5, KLF6 o KLF9, específicamente en el hígado, e identificar cual es el efecto que tiene una dieta alta en grasa sobre el peso la acumulación de triglicéridos en hígado y la expresión de genes que participan en el metabolismo de los lípidos de estos ratones, entre otros parámetros fenotípicos.

8. Glosario de términos

Absorbancia: De acuerdo con la Real academia Española, se define como la medida de la atenuación de una radiación electromagnética (luz visible), al atravesar una sustancia líquida, la cual se expresa como el logaritmo de la relación entre la intensidad saliente y la entrante.

Ácido palmítico: Ácido graso saturado compuesto por 16 carbonos, es un ácido graso abundante y presenta cadena larga y lineal. El ácido palmítico se encuentra principalmente en los alimentos de origen animal ¹⁰⁰.

Adipogénesis: Diferenciación de los adipocitos a partir de pre-adipocitos, que genera cambios en la morfología, la sensibilidad a hormonas y la expresión de genes de estas células ¹⁰⁰.

β -oxidación: Proceso por el cual los ácidos grasos se degradan en la mitocondria o los peroxisomas, en un proceso escalonado el cual consiste en la pérdida de dos carbonos en forma de acetil-CoA. El proceso involucra la formación de ésteres de CoA, desaturación, hidroxilación y la oxidación, antes de cada división ¹⁰¹.

Cirrosis: Es el resultado de la progresión de la enfermedad hepática alcohólica o no alcohólica, llevando a la fibrosis, remodelación vascular, el desarrollo de la hipertensión portal junto con sus complicaciones y en última instancia la insuficiencia hepática. Esta enfermedad no es reversible y puede progresar al cáncer hepático ¹⁰².

Cromatina: Complejo de DNA, histona y proteína, a partir de la cual se forman los cromosomas eucariontes. La cromatina es una estructura dinámica que adapta su estado de compactación y empaquetamiento para optimizar los procesos de replicación, transcripción y reparación del ADN ¹⁰³.

Citosina: Cualquier de la numerosas proteínas secretadas que se unen a receptores de la superficie celular sobre sobre ciertas células para inducir su diferenciación o proliferación ¹⁰³.

Delta-Delta Ct: Método usado para calcular los cambios relativos en la expresión génica determinada por el experimento de cuantificación de PCR tiempo real ⁹³.

Dedo de Zinc: Son estructuras de unión al DNA que requiere de zinc para su actividad de unión. Estas estructuras están compuestas por un átomo de zinc uniendo residuos de cisteínas e histidinas distantes con una secuencia intermedia descrita como un asa ¹⁰⁴.

Esteatosis hepática no alcohólica: Acumulación anormal de triglicéridos en el citoplasma de más del 5% de los hepatocitos del parénquima hepático ⁹.

Especies reactivas de oxígeno: Derivados reactivos del oxígeno molecular con niveles de oxidación entre el oxígeno y el agua. Algunas de estas moléculas con los radicales libres ¹⁰⁰.

Esteatohepatitis no alcohólica: Estadio de la enfermedad hepática donde se observa esteatosis, inflamación, balonamiento de los hepatocitos con cuerpos de Mallory y depósitos de colágeno (fibrosis) ¹⁰⁵.

Expresión génica: Proceso global mediante el cual se convierte la información codificada de un gen en un fenotipo observable (por lo general la producción de una proteína) ¹⁰³

Factores de transcripción: Son proteínas especializadas que reconocen secuencias específicas de DNA en las regiones reguladoras de todos los genes ⁵².

Factores de transcripción tipo Krüppel: Son una familia de factores de transcripción que regulan diversos procesos biológicos, tales como, proliferación,

diferenciación y desarrollo celular, metabolismo, apoptosis, inflamación y remodelación del tejido en respuesta al estrés externo ⁷⁷. Se han identificado 17 miembros de la familia de los KLFs, los cuales se caracterizan en tener un dominio de unión al DNA, ubicado en el extremo carboxilo terminal, compuesto por tres dedos de zinc tipo Cys2-His2 los cuales coordinan 1 átomo de zinc ⁷⁷

Fructosa: Es un monosacárido, por lo que se le considera un hidrato de carbono simple con fórmula química $C_6H_{12}O_6$. Sus principales fuentes naturales se encuentran las frutas y la miel, y los alimentos industrializados, como bebidas carbonatadas, cereales, comida rápida, mermeladas jugos, entre otros ²⁹.

Gen: Unidad física y funcional de la herencia que transporta información de una generación a la siguiente. En términos moleculares es la secuencia completa del DNA (incluyendo exones, intrones y regiones no codificantes de control de la transcripción) necesaria para la producción de una proteína funcional o RNA ¹⁰³.

Glucólisis: Vía metabólica de degradación de la glucosa hasta piruvato que conecta con el ciclo de Klebs a través de la formación de acetil-CoA ¹⁰⁰.

HepG2: Línea celular estable derivada de cáncer hepático.

Hiperinsulinemia: Aumento de la secreción de la insulina por parte de la célula β del páncreas, en respuesta a la resistencia de esta hormona ¹⁰⁶.

Hipertrigliceridemia: Desorden lipídico común, y se define como un incremento en la concentración de triglicéridos en el plasma, mayor de 150mg/dl ¹⁰⁷.

Inmunoprecipitación: La precipitación de un antígeno multivalente por un anticuerpo bivalente, lo que resulta en la formación de un gran complejo. El anticuerpo y el antígeno deben ser solubles. Precipitaciones generalmente ocurre

cuando hay cerca de equivalencia entre las concentraciones de anticuerpos y antígenos ¹⁰¹.

Lipogénesis de novo: Vía metabólica que sintetiza ácidos grasos a partir del exceso de hidratos de carbono. Estos ácidos grasos pueden entonces ser incorporados a triglicéridos para almacenar energía ⁴⁵.

Lipotoxicidad: Se refiere a la toxicidad celular en presencia del exceso de ácidos grasos libres ⁹¹.

Oligonucleótigo: Secuencia lineal de hasta 20 nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster. Por encima de esta longitud el término polinucleótido comienza a utilizarse ¹⁰¹.

Receptores activados por proliferación de peroxisomas (Ppars): Son receptores nucleares que pertenecen a la super familia de factores de transcripción que responden a ligandos naturales o sintéticos incluyendo compuestos endógenos, como hormonas esteroides, ácidos grasos, ácidos biliares, vitaminas o colesterol; o ligandos exógenos, incluyendo varios fármacos y toxinas, entre otros ⁶³. Hasta el momento se han identificado 3 isoformas en mamíferos, Ppara, Pparβ/δ y Pparγ ⁶⁴. Los Ppars son factores de transcripción que regulan la expresión de sus genes blanco a través de la unión a los elementos de respuesta específicos en las regiones promotoras para proliferación de peroxisomas (PPREs) en los sitios potenciadores de sus genes blanco ⁶⁵.

PCR-TR: La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa es un método utilizado para amplificar y cuantificar la expresión génica. La tecnología de PCR de tiempo real (TR) permite hacer millones de copias de una secuencia específica de DNA mediante una catálisis llevada a cabo por una enzima conocida

como DNA polimerasa, así que pequeñas cantidades de DNA pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines ¹⁰⁸.

Región promotora: Secuencias específicas de DNA que son reconocidas por otros genes, como los factores de transcripción. La unión de los genes a esta región promotora regula positiva o negativamente, la expresión y subsecuente producción de la proteína codificada por el gen en cuestión ⁵².

Rojo Oleoso: Colorante neutro de ácidos grasos ¹⁰⁹.

Sumoilación: Modificación post-transcripcional de una proteína por la conjugación de SUMO (pequeña modificación relacionada con ubiquitina de proteínas): estabiliza algunas proteínas y puede alterar la localización subcelular. Existen tres proteínas SUMO diferentes se conjugan con proteínas, SUMO-1, SUMO-2 y SUMO-3 ¹⁰¹.

Transcripción: Proceso en el cual se utiliza una hebra de una molécula de DNA como molde para la síntesis de RNA complementario mediante la RNA polimerasa

¹⁰³.

9. Abreviaturas

ACACA: Acetil-CoA carboxilasa.

ACC: CoA carboxilasa.

ACLY: ATP-citrato liasa.

Ac-CoA: Acetil-coenzima A.

AF1: Activador funcional de la transcripción-1.

AF2: Activador funcional de la transcripción-2.

AGPAT: Acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa.

AKT: Proteína cinasa B.

Apo-B100: Apolipoproteína B-100.

ChIp: Ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina.

ChoRE: Elementos de respuesta de los hidratos de carbono.

ChREBP: Proteína de unión al elemento de respuesta a hidratos de carbono.

CPT-1: Palmitoil carnitina transferasa-1.

CRP: Proteína reactiva-C.

CtBP: Proteína de unión al carboxilo-terminal.

DAG: Diacil-glicerol.

DBD: Dominios de unión al DNA.

DGAT: Diacilglicerol aciltransferasa.

DNL: Lipogénesis *de novo*.

DMT1: Diabetes mellitus tipo 1.

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2.

ELOVL6: Elongasa de cadena larga 6.

Ensanut: Encuesta nacional de salud y nutrición.

FA: Ácidos grasos.

FABP: Proteína de unión ácidos grasos.

FFA: Ácidos grasos libres.

FATP: Proteínas transportadoras de ácidos grasos.

FAT/CD36: Translocasa de ácidos grasos.

FAS: Sintetasa de ácidos grasos.

FK: Fructocinasa.

F1P: Fructosa-1-fosfato.

GLU-4, -2 y -5: Proteína transportadora de glucosa-4, -2 y -5.

GPAT: Glicerol-3-fosfato aciltransferasa.

HDACs: Histonas deacetilasas.

HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

IgGs: Inmunoglobulinas.

IKK: Inhibidor de la cinasa κ B.

IL-6: Interleucina-6.

INCMNSZ: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

IRS-1, -2, -3 y -4: Receptor de insulina-1, -2, -3 y -4.

JNK: Cinasa Jun N-terminal.

KLF: Factores de transcripción tipo Krüppel.

LBD: Dominio de unión a ligando.

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos.

mTOR: Rapamicina en células de mamífero.

MUFAs: Ácidos grasos monoinsaturados.

NAFLD: Esteatosis hepática no alcohólica.

NASH: Esteatohepatitis no alcohólica.

NASIDs: Anti-inflamatorios no esteroideos.

NCoR/SMRT: Co-represor del receptor nuclear/ mediador del silenciamiento para los receptores de retinoides y de hormona tiroidea.

PCR: Reacción en cadena de polimerasa.

PDH: Piruvato dehidrogenasa.

PDK: Piruvato dehidrogenasa cinasa.

PGC1 β : Coactivador 1-beta del receptor activado por proliferación de peroxisomas.

PIRS1: Fosforilación del sustrato del receptor de insulina-1.

PI3K: Fosfatidil-inositol 3-cinasa.

PK: Piruvato cinasa.

PKC: Proteína cinasa tipo C.

Ppars: Receptores activados por proliferación de peroxisomas.

PPREs: Regiones promotoras para proliferación de peroxisomas.

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

RXR: Receptores X retinoico.

SCD1: Esterol CoA desaturasa-1.

SFA: Ácidos grasos saturados.

SOCS-1: Supresores de la señalización de citocinas-1.

SRC1: Co-activador de receptor de esteroides-1.

SREBP1c: Proteína de unión al elemento de esteroides-1c.

TG: Triglicéridos.

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TZDs: Tiazolidinedionas.

VAT: Tejido adiposo visceral.

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

XBP1: Proteína de unión 1X.

10. Anexos

Anexo 1

Secuencias de los oligos que se ocuparon para la expresión de los genes de interés a nivel de RNA medido por PCR-TR.

Nombre del gen	Antisentido (Right)	Sentido (Left)
Ppara	TTTAGAAGGCCAGGACGATCT	GCACTGGAAGTGGATGACAG
Ppary	GGGGTGATGTGTTTGAAGCTTG	GACAGGAAAGACAACAGACAAATC
Pparβ/δ	TGCCCAAACACTGTACAACA	GGGAAAAGTTTTGGCAGGA
KLF5	TCGTCTATACTTTTTATGCTCTGGAAT	CTGCCTCCAGAGGACCTG
KLF6	CCAGCTCTAGGCAGGTCTGT	GCACGAGACCGGCTACTTC
KLF9	GCGAGAAGCTTTTTAAGGCAGTC	CTCCGAAAAGAGGCACAAGT
ELOV5	TGTCAGCACAACTGAAGCAG	CCCTTCCATGCGTCCATA
SREBP1c	TGCGCAAGACAGCAGATTT	CGCTCCTCCATCAATGACA
ABC1A	AATGGTGACACAAAGCGATTC	TCGACATGGTGAAAAACCAG
CPT1A	AATAGGCCTGACGACACCTG	GACAATACCTCGGAGCCTCA
HMGCR	GCATTCGAAAAAGTCTTGACAAC	GTTCCGGTGGCCTCTAGTGAG
DGAT2	TTGGACCTATTGAGCCAGGT	GAGGGGTCTGGGAGATGG
FABP1	CACCTTCCAAGTGAACCACTG	TGATCCAAAACGAATTCACG
FASN	CGGAGTGAATCTGGGTTGAT	CAGGCACACACGATGGAC
FOXO1	TTCTGCACACGAATGAACTTG	AAGGGTGACAGCAACAGCTC
PCK1	GGTTGATGGCCCTTAAATGA	CAACCTGGCCATGATGAAC
SCD9	ACATCATCAGCAAGCCAGGT	CCTAGAAGCTGAGAACTGGTGA
XBP1	CACTGGCCTCACTTCATTCC	GGAGTTAAGACAGCGCTTGG
CYP1A	AAGCATGATCAGTGTAGGGATCT	TCCAAGAGTCCACCCTTCC
β Actina	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	CCAACCGCGAGAAGATGA

Anexo 2

Inhibidores de proteasas.

Inhibidor de proteasas	Concentración final
Complete	1x
NaF	1mM
DTT	0.5mM
Na₃VO₄	1mM

Anexo 3

Preparación de geles de acrilamida a diferentes porcentajes para el Western Blot

Resolving	8%	10%	12%
H₂O (ml)	11.17	8.15	6.83
Buffer 4x (ml)	5.12	5.12	5.12
Acrilamida/bis (ml)	4.06	6.6	7.92
TEMED (μl)	10	10	10
APS 10%(μl)	150	150	150

Stacking	3%
H₂O (ml)	5.2
Buffer 4x (ml)	2
Acrilamida/bis (ml)	0.8
TEMED (μl)	5.6
APS 10%(μl)	150

**I. 4x Buffer stacking:
(1.5M tris-base, 0.4% SDS, pH 8.8)**

TRIS BASE **18.17g**

SDS **0.4g**

Ajustar a pH 8.8 con HCl

Aforar con H₂O a 100ml

**II. 4x Buffer resolving
(0.5M tris base, 0.4% SDS, pH 6.8)**

TRIS BASE **6.06g**

SDS **0.4g**

Ajustar a pH 6.8 con HCl

Aforar a 100ml con H₂O

III. APS 10% (Persulfato de amonio)

100mg en 1ml de agua

Anexo 4

Secuencias de los oligos de las regiones promotoras de los genes Ppars, que se ocuparon para la inmunoprecipitación de cromatina (ChIp).

Gen	Antisentido (Right)	Sentido (Left)
Ppara (KEM1)	AAGCACAGGCGTGCAGTT	CCCAGGTCTTTCCGGAGT
Ppara (KEM2)	AACCGTTCCTCAAAGGTGGT	CAGAAGGTGCTTTCCGAGAC
Ppara (KEM3)	ACAACCCGAAGACCCAGAGT	CTCGGCCTCCCTCCTAGC
Ppary (KEM1)	TTTCCATTAATCCCCAGGT	GGCGGAGAGGCAGAATTAG
Ppary (KEM2)	TAGCAGCTAAGGGAGGAGCA	TGTCACTGCAAGTCACGTACC
Ppary (KEM3)	CCTCCCCTCCATCATCATT	AGGGGCGACAGAGTGAAACT
Pparβ/δ (KEM1)	AGCGACTTCGCCTTTCCAG	GTTGTGCTGCTGGCCCTACGC
Pparβ/δ (KEM2)	GACACCCTGCTCCAAAGTTC	GCTGAGGGTCGCGTCTAC
Pparβ/δ (KEM3)	TTCTCCCAGCTCTCATCC	CCGCAGGTCAGAGTACGG

11. Bibliografía

1. Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, S.-L. T., Villalpando-Hernández S, Franco A, C.-N. L. & Al, E. ENSANUT 2012 Resultados Nacionales. *Inst. Nac. Salud Pública* (2012).
2. Cave, M. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 184–95 (2007).
3. Cohen, J. C., Horton, J. D. & Hobbs, H. H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* **332**, 1519–23 (2011).
4. Westwater JO, F. D. Liver impairment in the obese. *Gastroenterology* **34**, 686–93 (1958).
5. Adler, M. & Schaffner, F. Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. *Am. J. Med.* **67**, 811–816 (1979).
6. Smith, B. W. & Adams, L. a. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* **7**, 456–65 (2011).
7. Mehta, K., Van Thiel, D. H., Shah, N. & Mobarhan, S. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr. Rev.* **60**, 289–93 (2002).
8. Puri, P. & Sanyal, A. J. Nonalcoholic fatty liver disease: Definitions, risk factors, and workup. *Clin. Liver Dis.* **1**, 98–102 (2012).
9. Anstee, Q. M., Targher, G. & Day, C. P. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 330–44 (2013).
10. Anstee, Q. M. & Day, C. P. The genetics of NAFLD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 645–55 (2013).
11. Tiniakos, D. G., Vos, M. B. & Brunt, E. M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* **5**, 145–71 (2010).
12. Dowman, J. K., Tomlinson, J. W. & Newsome, P. N. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM* **103**, 71–83 (2010).
13. Di Rosa, M. & Malaguarnera, L. Genetic variants in candidate genes influencing NAFLD progression. *J. Mol. Med. (Berl)*. **90**, 105–18 (2012).

14. Kawano, Y. & Cohen, D. E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.* **48**, 434–41 (2013).
15. Asrih, M. & Jornayvaz, F. R. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *J. Endocrinol.* **218**, R25–36 (2013).
16. Després, J.-P. & Lemieux, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **444**, 881–7 (2006).
17. Hernández-Jiménez, S. Fisiopatología de la obesidad. *Gac Méd Méx* **140**, 27–32 (2004).
18. Cano, M., Chacón, A. & Rojas, A. Bases moleculares de la obesidad: regulación del apetito y control del metabolismo energético. *Med Clin* **117**, 463–476 (2001).
19. Camacho, A. Determinantes del sobrepeso: Biología, psicología y ambiente. *Rev. Endocrinol. y Nutr.* **13**, 197–202 (2005).
20. Guerra, F. & López, R. Antecedentes históricos sociales de la obesidad en México. *Investig. en Salud* **VIII**, 91–94 (2006).
21. Jump, D., Tripathy, S. & Depner, C. Fatty acid-regulated transcription factors in the liver. *Annu. Rev. Nutr.* **33**, 249–69 (2013).
22. PA Watkins. Fatty Acids: Metabolism. *Encycl. Hum. Nutr.* **2**, 220–230 (2013).
23. Badui, S. in *Química los Aliment.* (2006).
24. Yasutake, K. *et al.* Dietary habits and behaviors associated with nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **20**, 1756–67 (2014).
25. Fan, J.-G. & Cao, H.-X. Role of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28 Suppl 4**, 81–7 (2013).
26. Tessari, P., Coracina, a, Cosma, a & Tiengo, a. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **19**, 291–302 (2009).
27. Byrne, C. D. Fatty liver: role of inflammation and fatty acid nutrition. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* **82**, 265–71 (2010).
28. Vos, M. B. & McClain, C. J. Fructose takes a toll. *Hepatology* **50**, 1004–6 (2009).

29. Cruz, E. P., Elizabeth, A., Zúñiga, S. & Mier, G. M. Efectos benéficos y deletéreos del consumo de fructosa. *Rev. Endocrinol. y Nutr.* **15**, 67–74 (2007).
30. Nomura, K. & Yamanouchi, T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Nutr. Biochem.* **23**, (2012).
31. McCarthy, E. & Rinella, M. The role of diet and nutrient composition in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Acad. Nutr. ...* **112**, 401–409 (2012).
32. Musso, G., Gambino, R. & Cassader, M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog. Lipid Res.* **48**, 1–26 (2009).
33. Postic, C. & Girard, J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab.* **34**, 643–8 (2008).
34. Tarantino, G. Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. *World J. Gastroenterol.* **16**, 4773 (2010).
35. Buqué, X., Aspichueta, P. & Ochoa, B. Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. *Rev. Española ...* **100**, 565–578 (2008).
36. Puppala, J., Siddapuram, S. P., Akka, J. & Munshi, A. Genetics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview. *J. Genet. Genomics* **40**, 15–22 (2013).
37. Bechmann, L. P. *et al.* The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J. Hepatol.* **56**, 952–64 (2012).
38. Serviddio, G., Bellanti, F. & Vendemiale, G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 952–68 (2013).
39. Samar H. Ibrahim, Rohit Kohli, and G. J. G. Mechanisms of Lipotoxicity in NAFLD and Clinical Implications. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **53**, 131–140 (2011).
40. Basaranoglu, M., Basaranoglu, G., Sabuncu, T. & Sentürk, H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **19**, 1166–72 (2013).
41. Trauner, M., Arrese, M. & Wagner, M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* **1801**, 299–310 (2010).

42. Kumashiro, N. *et al.* Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16381–5 (2011).
43. Parekh, S. & Anania, F. a. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **132**, 2191–207 (2007).
44. Samuel, V. T. Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* **22**, 60–5 (2011).
45. Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H. & Zaidi, N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 0–7 (2014). doi:10.1016/j.metabol.2014.04.003
46. Ferré, P. & Foufelle, F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes. Obes. Metab.* **12 Suppl 2**, 83–92 (2010).
47. Delarue, J. & Magnan, C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **10**, 142–8 (2007).
48. Koo, S.-H. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin. Mol. Hepatol.* **19**, 210–5 (2013).
49. Falcon, A., Doege, H. & Fluit, A. FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, 384–393 (2010).
50. Doege, H. *et al.* Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology* **130**, 1245–58 (2006).
51. Koonen, D., Jacobs, R. & Febbraio, M. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes* **56**, 2863–2871 (2007).
52. López-Bojorquez, L. La regulación del factor de transcripción NF-κB. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Rev. Investig. clínica* **56**, 83–92 (2004).
53. Arratia, J. & Aguirre, J. Los factores de transcripción tipo Myb, una familia de reguladores de la diferenciación celular conservada en los organismos eucariontes. *TIP. Rev. Espec. en ciencias químico- ...* **16**, 98–108 (2013).
54. Jump, D. B., Tripathy, S. & Depner, C. M. Fatty acid-regulated transcription factors in the liver. *Annu. Rev. Nutr.* **33**, 249–69 (2013).

55. Shimano, H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog. Lipid Res.* **40**, 439–52 (2001).
56. Liang, G. *et al.* Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J. Biol. Chem.* **277**, 9520–8 (2002).
57. Byrne, C. D., Olufadi, R., Bruce, K. D., Cagampang, F. R. & Ahmed, M. H. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Sci. (Lond)*. **116**, 539–64 (2009).
58. Yecies, J. L. *et al.* Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab.* **14**, 21–32 (2011).
59. Malaguarnera, M., Di Rosa, M., Nicoletti, F. & Malaguarnera, L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J. Mol. Med. (Berl)*. **87**, 679–95 (2009).
60. Dentin, R., Girard, J. & Postic, C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* **87**, 81–6 (2005).
61. Denechaud, P.-D., Dentin, R., Girard, J. & Postic, C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett.* **582**, 68–73 (2008).
62. Iizuka, K. & Horikawa, Y. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr. J.* **55**, 617–24 (2008).
63. Wagner, M., Zollner, G. & Trauner, M. Nuclear receptors in liver disease. *Hepatology* **53**, 1023–34 (2011).
64. Kota, B. P., Huang, T. H.-W. & Roufogalis, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol. Res.* **51**, 85–94 (2005).
65. Berger, J. & Moller, D. E. The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med* **53**, 409–435 (2002).
66. Poulsen, L. L. C., Siersbæk, M. & Mandrup, S. PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 631–9 (2012).
67. Daynes, R. A. & Jones, D. C. EMERGING ROLES OF PPARS IN INFLAMMATION AND IMMUNITY. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 748–759 (2002).

68. Bugge, A. & Mandrup, S. Molecular Mechanisms and Genome-Wide Aspects of PPAR Subtype Specific Transactivation. *PPAR Res.* **2010**, (2010).
69. Tailleux, A., Wouters, K. & Staels, B. Roles of PPARs in NAFLD: potential therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 809–18 (2012).
70. Stienstra, R., Duval, C., Müller, M. & Kersten, S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res.* **2007**, 95974 (2007).
71. Yessoufou, a & Wahli, W. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med. Wkly.* **140**, w13071 (2010).
72. Barak, Y. & Kim, S. Genetic manipulations of PPARs: effects on obesity and metabolic disease. *PPAR Res.* **2007**, 12781 (2007).
73. Guzmán, C. *et al.* The human liver fatty acid binding protein (FABP1) gene is activated by FOXA1 and PPAR α ; and repressed by C/EBP α : Implications in FABP1 down-regulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 803–18 (2013).
74. Rahimian R, Masih-Khan E, Lo M, van Breemen C, McManus BM, D. G. Hepatic over-expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma2 in the ob/ob mouse model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Mol. Cell. Biochem.* **224**, 29–37 (2001).
75. Matsusue, K. *et al.* Liver-specific disruption of PPAR γ in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J. Clinical Investig.* **111**, 737–747 (2003).
76. Inoue, M. *et al.* Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**, 215–22 (2005).
77. Pearson, R., Fleetwood, J., Eaton, S., Crossley, M. & Bao, S. Krüppel-like transcription factors: a functional family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1996–2001 (2008).
78. Nagai, R., Friedman, S. & Kasuga, M. *The biology of Krüppel-like Factors.* (2009). at <<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-4-431-87775-2.pdf>>
79. Dang, D. T., Pevsner, J. & Yang, V. W. The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 1103–21 (2000).

80. Miele, L. *et al.* The Kruppel-like factor 6 genotype is associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **135**, 282–291.e1 (2008).
81. Gray, S. *et al.* Regulation of gluconeogenesis by Krüppel-like factor 15. *Cell Metab.* **5**, 305–12 (2007).
82. Mori, T. *et al.* Role of Krüppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 12867–75 (2005).
83. Pei, H., Yao, Y., Yang, Y., Liao, K. & Wu, J.-R. Krüppel-like factor KLF9 regulates PPAR γ transactivation at the middle stage of adipogenesis. *Cell Death Differ.* **18**, 315–27 (2011).
84. Bechmann, L. P. *et al.* Post-transcriptional activation of PPAR alpha by KLF6 in hepatic steatosis. *J. Hepatol.* **58**, 1000–6 (2013).
85. Lin, C.-L., Huang, H.-C. & Lin, J.-K. Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells. *J. Lipid Res.* **48**, 2334–43 (2007).
86. Yao, H.-R. *et al.* Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids. *Am. J. Transl. Res.* **3**, 284–91 (2011).
87. Thomas-Chollier, M. *et al.* RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **36**, W119–27 (2008).
88. De La Rosa-Velázquez, I. a, Rincón-Arano, H., Benítez-Bribiesca, L. & Recillas-Targa, F. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res.* **67**, 2577–85 (2007).
89. Mas-Oliva, J., Velasco-Loyden, G. & Haines, T. Receptor pattern formation as a signal for the capture of lipoproteins. *Biochem. Biophys. ...* **218**, 212–218 (1996).
90. Joshi-Barve, S. *et al.* Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology* **46**, 823–30 (2007).
91. Mei, S., Ni, H., Manley, S. & Bockus, A. Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **339**, 487–498 (2011).
92. Rebollo, A. *et al.* Liquid fructose downregulates Sirt1 expression and activity and impairs the oxidation of fatty acids in rat and human liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 514–24 (2014).

93. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–8 (2001).
94. Chávez-Tapia, N. C., Rosso, N., Uribe, M., Bojalil, R. & Tiribelli, C. Kinetics of the inflammatory response induced by free fatty acid accumulation in hepatocytes. *Ann. Hepatol.* **13**, 113–20 (2014).
95. Morán-Salvador, E. *et al.* Role for PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB J.* **25**, 2538–50 (2011).
96. Shan, W. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta protects against chemically induced liver toxicity in mice. *Hepatology* **47**, 225–35 (2008).
97. Perfield, J. W. *et al.* Altered hepatic lipid metabolism contributes to nonalcoholic fatty liver disease in leptin-deficient Ob/Ob mice. *J. Obes.* **2013**, 296537 (2013).
98. Oishi, Y. *et al.* Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab.* **1**, 27–39 (2005).
99. Oishi, Y. *et al.* SUMOylation of Krüppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR-delta. *Nat. Med.* **14**, 656–66 (2008).
100. Medina., S. de. *Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición.* 925 (2010).
101. Lackie, M. *The Dictionary of Cell and Biology.* (Sevier, EI, 2007).
102. Montano-Loza, A. J. Clinical relevance of sarcopenia in patients with cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* **20**, 8061–8071 (2014).
103. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, D. *Biología Celular y Molecular.* (2005).
104. Acosta-Viana, K. & Zavala-Castro, J. Proteínas de unión a DNA. *Rev Biomed* **7**, 163–172 (1996).
105. Saadeh, S. Nonalcoholic fatty liver disease and obesity. *Nutr. Clin. Pract.* **22**, 1–10 (2007).
106. Rojas, J. *et al.* Insulinorresistencia e hiperinsulinemia como factores de riesgo para enfermedad cardiovascular. *Arch. Venez. Farmacol. y Ter.* **27**, (2008).

107. Aguilar-Salinas, C. a, Tusie-Luna, T. & Pajukanta, P. Genetic and environmental determinants of the susceptibility of Amerindian derived populations for having hypertriglyceridemia. *Metabolism*. **63**, 887–894 (2014).
108. Ibarra L, Tamay De Dios, C. & Velasquillo, C. Fundamentos de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investig. en Discapac*. **2**, 70–78 (2013).
109. Hauner, H. Skurk, T. Wabitsch, M. in *Methods Mol. Biol.* (Ailhaud, G.) 239–247 (Humana Press).