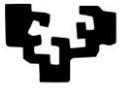
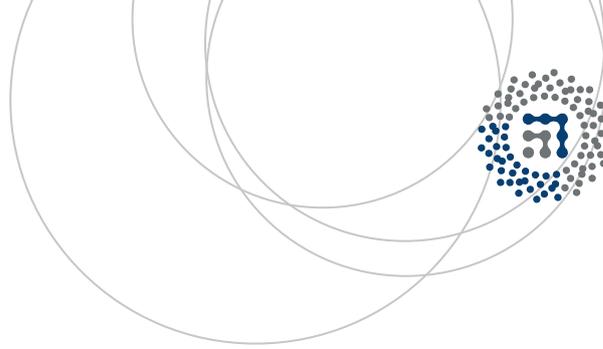


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado  
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

# Papel de E2F1 y E2F2 en la instauración de esteatosis inducida por dieta rica en grasa

Nombre:  
Irati Pisón Rodríguez  
Directora:  
Patricia Aspichueta Celaá

Leioa, 24 de junio de 2014

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 2  |
| 1.1. Ciclo celular.....   | 2  |
| 1.2. Factores de transcripción E2F.....   | 3  |
| 1.3. La enfermedad del hígado graso no alcohólica .....   | 3  |
| 1.4. E2F y el desarrollo del cáncer .....   | 4  |
| 2. OBJETIVOS .....  | 4  |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 5  |
| 3.1. Animales de experimentación .....  | 5  |
| 3.2. Obtención de suero .....   | 5  |
| 3.3. Extracción y homogenización de hígado y corazón .....  | 5  |
| 3.4. Incorporación de [ <sup>3</sup> H]colina y [ <sup>14</sup> C]glicerol.....                       | 5  |
| 3.5. Determinación de proteína.....   | 6  |
| 3.6. Determinación de ácidos grasos.....  | 6  |
| 3.7. Determinación de triglicérido.....   | 6  |
| 3.8. Extracción, separación y cuantificación de los lípidos.....                                      | 6  |
| 3.9. Tratamiento estadístico de los resultados.....   | 7  |
| 4. RESULTADOS.....  | 8  |
| 4.1. Contenido hepático de lípidos .....  | 9  |
| 4.2. Incorporación de [ <sup>3</sup> H]colina y [ <sup>14</sup> C]glicerol en lípidos hepáticos ..... | 9  |
| 4.3. Contenido de lípidos en corazón .....  | 10 |
| 4.4. Contenido de triglicéridos y ácidos grasos séricos .....   | 12 |
| 5. DISCUSIÓN .....  | 13 |
| 6. CONCLUSIONES.....  | 15 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA .....   | 15 |

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Ciclo celular

El ciclo celular es un complejo conjunto de procesos a través de los cuales una célula se divide. Está implicado en procesos como el crecimiento y la proliferación celular o la regulación de la reparación de daños en el ADN, entre otros. Su regulación resulta crucial para el organismo, ya que su alteración puede desencadenar una proliferación celular descontrolada, origen de patologías como el cáncer o las respuestas autoinmunes.

El crecimiento celular y la proliferación están rigurosamente controlados por factores de crecimiento. En presencia de exceso de nutrientes, los factores de crecimiento activan cascadas de señalización que actúan sobre la absorción y el uso de éstos. La mayoría de estas cascadas iniciadas activan en última instancia reguladores del ciclo celular, sobre todo la vía de pRb-E2F de ciclinas dependientes de quinasa (CDK). En numerosas células, la entrada en la fase S depende de la activación de las ciclinas G1 y la vía pRb-E2F. Las CDKs son serina/treonina quinazas que trabajan para fosforilar la familia retinoblastoma de proteínas supresoras de tumores mediando el compromiso de la célula para entrar en el ciclo celular. Los factores de transcripción E2F son los efectores en esta vía y controlan la expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular, apoptosis y síntesis de ADN, bien activando como suprimiendo su transcripción. La función de los factores E2F es muy dependiente del sistema de regulación de las ciclinas y las CDKs, ya que son éstas la que posibilitan la liberación de E2F para que pueda realizar su función. En principio, esta vía dirige la progresión y división del ciclo celular, pero la realidad es que también está implicada en la respuesta metabólica desencadenada por factores de crecimiento.

Para llevar a cabo la proliferación, el metabolismo celular está dirigido hacia un incremento en la producción de energía para satisfacer las necesidades anabólicas. El metabolismo de las células en proliferación tiene un ratio mayor de glicólisis, producción de lactato y biosíntesis de lípidos y otras macromoléculas. Dicha adaptación metabólica observada en células proliferativas está aumentada en células cancerosas, donde se da un alto descontrol de la proliferación [1].

Sin duda, existe una relación entre el ciclo celular y el control metabólico. La modulación de la actividad de factores que actúan sobre vías metabólicas en respuesta a estímulos proliferativos abre nuevas perspectivas en el control de enfermedades como la diabetes tipo II, la obesidad y el cáncer.

### **1.2. Factores de transcripción E2F**

Los factores de transcripción E2F pertenecen a una familia constituida por varias proteínas y están implicados en la regulación de la expresión de genes necesarios para la replicación del ADN y la progresión del ciclo celular. La familia E2F determina si se da la división celular mediante la regulación de la expresión de genes clave en el proceso, como los reguladores del ciclo celular, además de enzimas implicadas en la biosíntesis de nucleótidos y componentes de la maquinaria de replicación del ADN. Considerando la estructura y la función de los miembros de la familia E2F, éstos pueden dividirse en: E2F1, E2F2 y E2F3a como activadores de la transcripción y E2F3b, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7 y E2F8 como represores de la transcripción [2]. Los denominados E2F activadores son necesarios para la activación de genes implicados en la transición G1/S, pero se sabe que pueden actuar también como represores transcripcionales. Los mecanismos a través de los cuales es posible que estos factores actúen tanto como activadores como reprimiendo la transcripción son todavía desconocidos.

### **1.3. La enfermedad del hígado graso no alcohólica**

Las enfermedades inflamatorias crónicas del hígado se encuentran entre las patologías de mayor prevalencia en las sociedades actuales. En esta categoría se incluye una amplia gama de síndromes entre los que se encuentra la enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD), asociada a enfermedades como la obesidad, la diabetes *mellitus* tipo 2 y las dislipemias.

Actualmente, el término NAFLD engloba un espectro de enfermedades que abarca desde la esteatosis hepática, siendo éste el primer paso en el desarrollo de la enfermedad, hasta la cirrosis, pasando por esteatosis con inflamación y distintos grados de fibrosis [3]. La resistencia a la insulina, el estrés oxidativo y una respuesta inflamatoria sostenida parecen desempeñar un papel importante en el desarrollo de NAFLD. En algunos casos se puede desarrollar hepatocarcinoma sobre el hígado cirrótico, debido a que los procesos de proliferación celular y apoptosis se encuentran alterados, por lo que se sospecha que hay una fuerte relación causa-efecto entre ambas patologías [4].

### **1.4. E2F y el desarrollo del cáncer**

El gen de la proteína del retinoblastoma (pRb) fue el primer supresor de tumores identificado y se encuentra ausente o mutado en un tercio de los tumores humanos [5]. Pertenece a una familia de proteínas conocidas como “proteínas de bolsillo”, entre cuyas propiedades biológicas se encuentra la capacidad de unirse a E2F, inhibiendo así su actividad y, por lo tanto, deteniendo el crecimiento celular [6]. Sin embargo, se ha observado que diversas mutaciones

que causan la activación de las CDKs provocan la fosforilación de pRb y, por lo tanto, la supresión de su actividad y disociación de los factores E2F [7].

Por otro lado, los E2F activadores promueven la progresión a través del ciclo celular, por lo que es fácil imaginar que actúen como oncogenes. Además, se ha visto en diferentes estudios que el factor de transcripción E2F1 se encuentra sobreexpresado en un alto porcentaje de casos de hepatocarcinoma [8].

E2F2 también juega cierto papel como supresor de tumores, ya que los ratones mutantes carentes de E2F2 son más propensos a padecer tumores y la mutación combinada de E2F1 y E2F2 conlleva un incremento tanto en la incidencia como en el comienzo de la génesis de tumores [9].

## 2. OBJETIVOS

La enfermedad del hígado graso no alcohólica es una de las hepatopatías más frecuentes en los países industrializados. La etiología y mecanismos que intervienen en la aparición de la enfermedad no son bien conocidos; sin embargo, uno de los aspectos más controvertidos en la patogénesis es la existencia de alteraciones en el metabolismo de lípidos. La NAFLD se considera un factor de riesgo para el desarrollo de hepatocarcinoma. Al mismo tiempo, es bien sabido que una alteración en los niveles de factores de transcripción E2F aparece en casos de hepatocarcinoma pero se desconoce la implicación de E2F1 o E2F2 en la desregulación metabólica asociada al origen de la enfermedad hepática o en la repercusión en el metabolismo lipídico de órganos periféricos como el corazón. Por ello, el objetivo general de este trabajo es investigar la implicación de los factores E2F1 y E2F2 en la modulación del metabolismo de lípidos en ratón y su contribución al desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólica. Los objetivos concretos que se plantearon fueron:

1. Investigar si E2F1 y E2F2 modulan el contenido lipídico hepático y cardiaco y si están implicados en la generación de esteatosis por dieta rica en grasa.
2. Investigar si los flujos metabólicos ligados al metabolismo energético en hígado de ratón deficiente en E2F1 y E2F2 están alterados.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Animales de experimentación

Se emplearon ratones E2F1<sup>-/-</sup> y E2F2<sup>-/-</sup> y sus WT, procedentes del grupo de investigación de Dra. Ana Zubiaga, Departamento de genética y antropología, Facultad de Ciencia y Tecnología, UPV/EHU. Los animales de cada genotipo se dividieron en dos grupos y se alimentaron con una dieta comercial normal (Mouse Diet Control, Bio Serv®) y una dieta rica en grasa (High Fatty Diet, Bio Serv®). Toda la metodología empleada en el manejo de los animales está aprobada por el comité de ética de la UPV.

#### 3.2. Obtención de suero

Se extrajeron 50 µl de sangre por punción de la vena safena de ratones anestesiados y se dejó coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para obtener el suero, la sangre se centrifugó a 2000 xg durante 30 minutos y a 4 °C y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 10000 xg durante 10 minutos, a la misma temperatura. El suero se utilizó para medir los niveles variables de ácidos grasos y triglicérido.

#### 3.3. Extracción y homogenización de hígado y corazón

El hígado y el corazón se extrajeron de los ratones, se pesaron y se consiguieron alícuotas de pesos diferentes. Inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido, preservándose en un ultracongelador a -80 °C hasta su posterior análisis. Para analizar las muestras, se homogenizaron aproximadamente 30 mg de hígado o corazón en 300 µl de tampón fosfato salino (PBS) con un homogenizador Potter S, realizando 20 golpes por cada muestra.

#### 3.4. Incorporación de [<sup>3</sup>H]colina y [<sup>14</sup>C]glicerol

Para definir los flujos metabólicos que regulan la disponibilidad de glicerolípidos, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 100 µl de suero salino estéril que contenía 5µCi de [<sup>3</sup>H]colina y 5µCi de [<sup>14</sup>C]glicerol con 250 µM de glicerol. Los órganos se extrajeron 2 h después de la inyección. Los lípidos se extrajeron del hígado como se describe más adelante. Para la separación de los lípidos se realizó una cromatografía de capa fina de cuatro pases con las siguientes disoluciones: cubeta 1 cloroformo:metanol:agua (60:40:10, v/v/v), cubeta 2 acetato de etilo:etanol:isopropanol:metanol:cloroformo:KCl al 0.25 % en agua (35:20:5:15:22:9, v/v/v/v/v/v), cubeta 3 n-heptano:eter diisopropílico:ácido acético (70:30:2, v/v/v) y cubeta 4 n-heptano únicamente. Las bandas correspondientes a fosfolípidos (PL), triglicéridos (TG),

diglicéridos (DG), monoglicéridos (MG) y ácidos grasos (AG) se rascaron y se determinó la radiactividad mediante el contador de centelleo.

### **3.5. Determinación de proteína**

Para la determinación de proteína se utilizó un kit comercial de Pierce basado en el método del ácido bicinconínico (BCA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de proteína de la muestra se determinó por la interpolación de los valores de absorbancia en una curva patrón realizada con seroalbúmina bovina que fue lineal para un rango de 0 a 15 µg de proteína.

### **3.6. Determinación de ácidos grasos**

Para la determinación de ácidos grasos se utilizó un kit enzimático de Wako Chemicals y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se calculó la concentración de ácidos grasos por interpolación de los datos a la recta patrón obtenida con la absorbancia del calibrador, cuya concentración es de 0.035 mmol/l. Los resultados se expresan en nmol de ácidos grasos/mg de proteína.

### **3.7. Determinación de triglicérido**

Para determinar el nivel de triglicérido del suero se utilizó un kit enzimático de A. Menarini Diagnostics y se siguieron las instrucciones del fabricante. La concentración de triglicérido se obtuvo por interpolación del valor de absorbancia obtenido en la curva de calibrado de un patrón aportado por el kit que fue lineal en un rango de 2.58 a 13 nmol.

### **3.8. Extracción, separación y cuantificación de los lípidos**

#### *Extracción de lípidos*

Los lípidos se extrajeron por el método de Folch y cols. [10]. El extracto se evaporó en un concentrador-evaporador a 45 °C durante 1 hora. Los extractos secos obtenidos se resuspendieron en 115 µl de tolueno y se procedió a la separación lipídica por cromatografía en capa fina (TLC), siguiendo una metodología específica [11], para su posterior cuantificación.

Con este método se cuantificaron diferentes fosfolípidos (PC, PE, PI y PS), cardiolipina, colesterol, diglicéridos y triglicéridos. Con el fin de eliminar impurezas de las placas, previamente a la aplicación de las muestras se lavaron con una mezcla de cloroformo:metanol:agua (60:40:10, v/v/v) durante 12h. Posteriormente, las placas se activaron a 100 °C durante 30 minutos. Una vez preparada la placa, se procedió a la aplicación

de la muestra de lípidos. En cada placa se aplicaron concentraciones crecientes de patrones de lípidos en estudio en los rangos siguientes: oleato de colesterol (0.09-1.45), triglicérido (0.27-17), colesterol (0.36-3.6), cardioplipina (0.02-0.3), fosfatidiletanolamina (0.33-3.91), fosfatidilinositol (0.1-1.72), fosfatidilserina (0.13-2.22), fosfatidilcolina (0.63-7.63), esfingomielina (0.04-0.61) y lisofosfatidilcolina (0.1-2.01). Se realizaron aplicaciones de 3 µl de los patrones y el mismo volumen por duplicado de las muestras, todos disueltos en tolueno, a 1.5 cm del borde inferior de la placa.

Para el desarrollo cromatográfico se utilizaron cinco mezclas diferentes de polaridad decreciente, secando la placa con aire caliente entre cada uno de los pases: cubeta 1, cloroformo:metanol:agua (60:40:10, v/v/v), cubeta 2 cloroformo:metanol:agua (65:40:5, v/v/v), cubeta 3 acetato de etilo:etanol:isopropanol:metanol:cloroformo:KCl al 0.25 % en agua (35:20:5:15:22:9, v/v/v/v/v/v), cubeta 4 tolueno:eter dietílico:etanol (60:40:3, v/v/v) y cubeta 5 n-heptano:eter dietílico (94:48, v/v). La distancia desde el borde inferior que debía alcanzar cada desarrollo en la placa fue 1.8, 2.5, 6, 9 y 12.5 cm, respectivamente. Tras el pase por todas las mezclas y secar la placa, se introdujo la placa en una cubeta con n-heptano puro y se eluyó hasta 12 cm por encima del punto de aplicación para arrastrar impurezas.

La placa, una vez seca, se sometió a un proceso de quemado por inmersión en ácido. Para ello, se introdujo en posición vertical durante 15 segundos aproximadamente en una mezcla de sulfato cúprico al 10 % en ácido fosfórico al 8 %. Después, se dejó secar hasta que se empezaban a ver las manchas de lípidos. Una vez seca la placa, se mantuvo a 200 °C durante 3 minutos.

Las manchas correspondientes a cada lípido se cuantificaron mediante densitometría bidimensional por reflexión empleando el software Quantity One de Bio-Rad. Se determinó la densidad óptica integrada (IOD) de cada banda seleccionada, siendo éste el parámetro cuantitativo. La IOD de la banda se corrigió con la IOD del patrón interno y se procedió a la interpolación en la recta patrón, convirtiendo las densidades ópticas en nmoles de lípido que se refirieron a los mg de proteína de cada órgano.

#### **3.9. Tratamiento estadístico de los resultados**

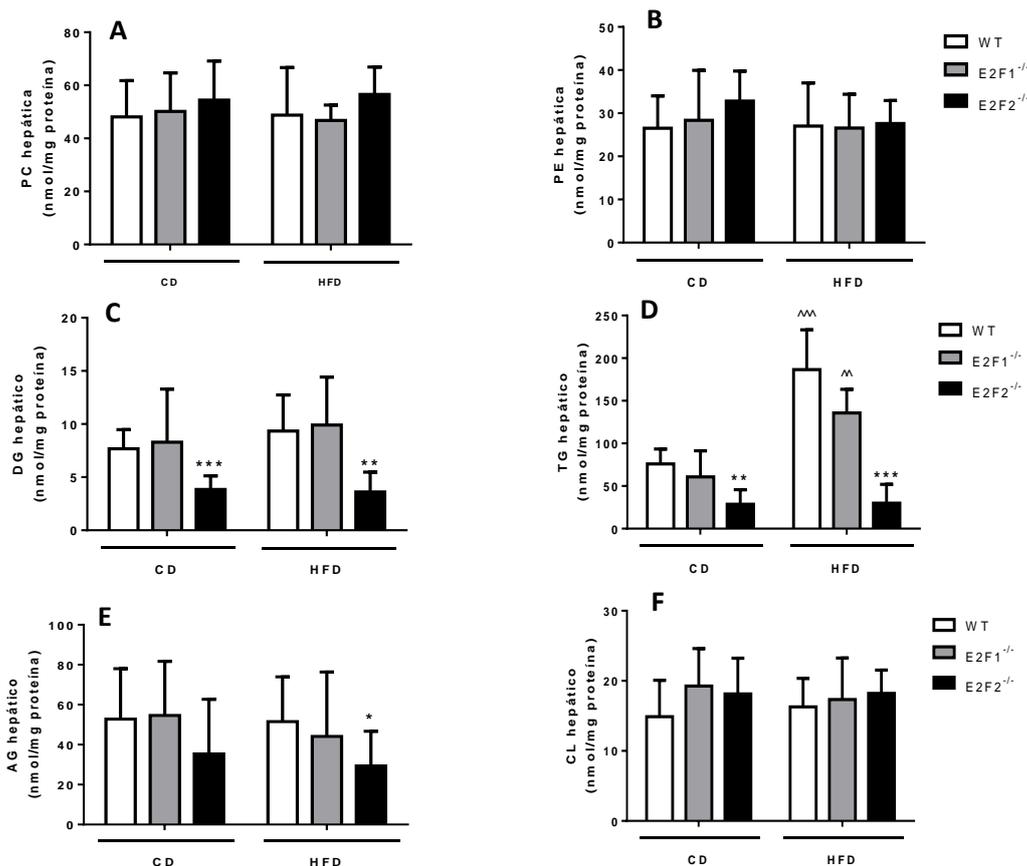
Los datos numéricos de los diferentes experimentos se procesaron utilizando hojas de cálculo Microsoft Excel. Los valores obtenidos en los ensayos experimentales se expresaron como la media de 6-8 animales por grupo.

El análisis estadístico de los resultados se efectuó mediante la aplicación del test de la “t” de student. Los valores estadísticamente significativos entre los genotipos KO y WT se indican de la siguiente manera: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ . De la misma forma, los valores estadísticamente significativos entre los animales alimentados con dieta control y dieta rica en grasa se indican:  $\wedge p < 0.05$ ,  $\wedge\wedge p < 0.01$  y  $\wedge\wedge\wedge p < 0.001$ ; y los de estado de alimento frente a estado de ayunas  $\# p < 0.05$ ,  $\#\# p < 0.01$ ,  $\#\#\# p < 0.001$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Contenido hepático de lípidos

Se determinó la concentración de numerosas especies lipídicas en el hígado de ratones E2F1<sup>-/-</sup>, E2F2<sup>-/-</sup> y sus controles (WT) de 3 meses de edad para averiguar si estos factores de transcripción están implicados en la regulación metabólica de los mismos. Además, se utilizó una dieta rica en grasa para definir la implicación de estos factores en la instauración de la hepatoesteatosis.



**Figura 1. Concentración de fosfatidilcolina (A), fosfatidiletanolamina (B), diglicérido (C), triglicérido (D), ácidos grasos (E) y colesterol (F) en los homogenados hepáticos de ratones KO y control (WT) de 3 meses.** Los valores se corresponden a la media  $\pm$  DE. El análisis estadístico de los resultados se efectuó mediante la aplicación del test de la “t” de student; las diferencias estadísticamente significativas se señalan de la siguiente forma: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , grupo KO respecto a control;  $\wedge p < 0.05$ ,  $\wedge\wedge p < 0.01$ ,  $\wedge\wedge\wedge p < 0.001$ , grupo del mismo genotipo alimentado con dieta rica en grasa respecto a la dieta control.

En la figura 1 se muestran los resultados del análisis. En A) y B) se observa que las concentraciones de PC y PE en el hígado no varían significativamente según el genotipo ni la dieta. Por otro lado, los niveles de diglicérido (C) y triglicérido (D) de las mismas muestras tienen un descenso significativo de la concentración en los ratones E2F2<sup>-/-</sup>. Además, la dieta rica en grasa afecta a la concentración de TG de los ratones control y E2F1<sup>-/-</sup>, aunque en menor grado; sin embargo, no provoca ningún cambio en los ratones E2F2<sup>-/-</sup>.

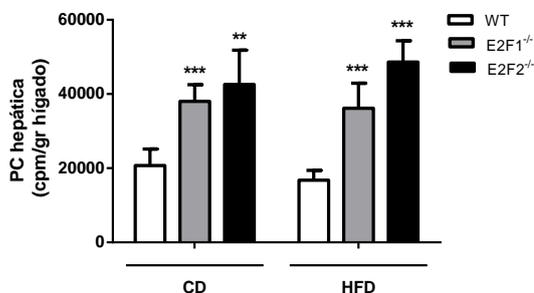
Por último, en E) y F) se muestran las concentraciones de AG y CL. No hay diferencias significativas entre las dietas ni, en la mayoría de los casos, entre los distintos genotipos. El grupo E2F2<sup>-/-</sup> presenta una reducción significativa de los niveles de AG frente al control.

Por lo tanto, los factores E2F1 y E2F2 no modulan la cantidad de fosfolípidos, ácidos grasos y colesterol total, sí en cambio las concentraciones de triglicérido y diglicérido. Además, una dieta rica en grasa puede aumentar los niveles de triglicéridos en hígado, contribuyendo al desarrollo de la esteatosis, con disminución en ausencia de los factores E2F1 o E2F2.

#### 4.2. Incorporación de [<sup>3</sup>H]colina y [<sup>14</sup>C]glicerol en lípidos hepáticos

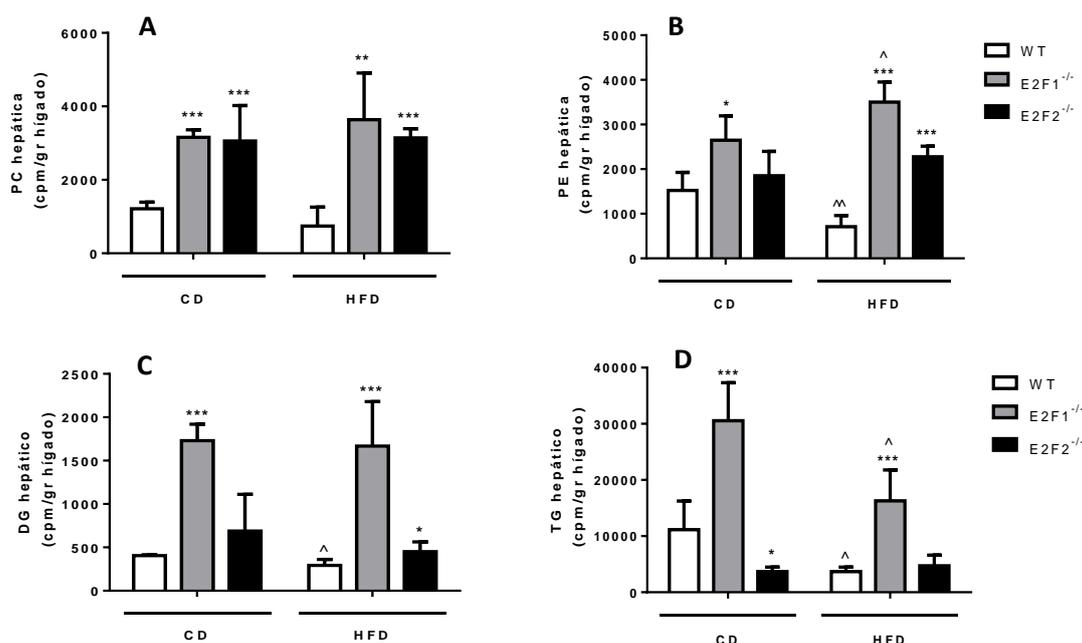
Para definir si los cambios en el contenido hepático lipídico estaban asociados a cambios en los flujos metabólicos asociados a glicerolípidos, se valoró la incorporación de [<sup>3</sup>H]colina en fosfatidilcolina y de [<sup>14</sup>C]glicerol en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, diglicérido y triglicérido.

La figura 2 muestra la incorporación de [<sup>3</sup>H]colina en la PC hepática de los ratones. Los valores de radiactividad en los ratones deficientes en estos factores de transcripción son superiores a los controles en ambos casos, debido a que tienen el flujo que regula la disponibilidad de PC modificado.



**Figura 2. Incorporación de <sup>3</sup>H-colina en fosfatidilcolina de ratones KO y control (WT) de 3 meses.** Los valores se corresponden a la media ± DE. El análisis estadístico de los resultados se efectuó mediante la aplicación del test de la "t" de student; las diferencias estadísticamente significativas se señalan de la siguiente forma: \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, grupo KO respecto a control.

La figura 3 representa la incorporación de [ $^{14}$ C]glicerol en las cuatro especies lipídicas mencionadas. En ratones E2F1 $^{-/-}$  y E2F2 $^{-/-}$  la incorporación hepática de glicerol en PC y PE estaba incrementada en comparación con sus respectivos controles. Además, la deficiencia en E2F1 también resultó en un aumento en la incorporación de glicerol en TG y DG. Sin embargo, estos efectos no se observaron en los animales carentes en E2F2, sugiriendo que en estos animales el incremento en la incorporación de sustratos radiactivos en PC podría derivar más de PE que de DG. Es decir, los factores E2F sí interfieren en los flujos metabólicos de fosfolípidos, diglicéridos y triglicéridos.



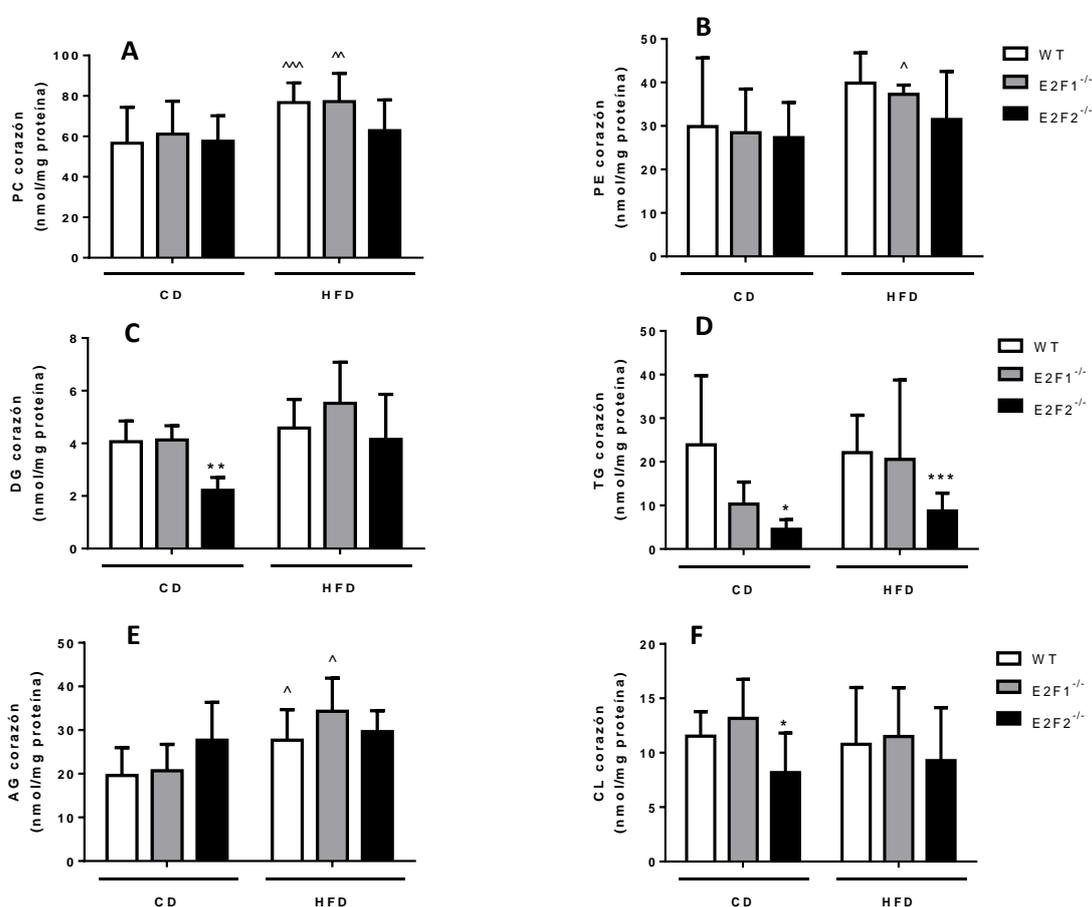
**Figura 3. Incorporación de  $^{14}$ C-glicerol en fosfatidilcolina (A), fosfatidiletanolamina (B), diglicérido (C) y triglicérido (D) de ratones KO y control (WT) de 3 meses.** Los valores se corresponden a la media  $\pm$  DE. El análisis estadístico de los resultados se efectuó mediante la aplicación del test de la "t" de student; las diferencias estadísticamente significativas se señalan de la siguiente forma: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , grupo KO respecto a control, ^ $p < 0.05$ , ^^ $p < 0.01$ , grupo del mismo genotipo alimentado con dieta rica en grasa respecto a la dieta control.

### 4.3. Contenido de lípidos en corazón

El desarrollo de la enfermedad de hígado graso no alcohólica está asociada a complicaciones extrahepáticas. El corazón es un tejido periférico que recibe lípidos en forma de lipoproteínas del hígado. Nuestro objetivo en este punto fue definir si cambios en el contenido hepático lipídico estaba asociado a cambios en el contenido lipídico cardiaco. Para ello, se determinó la concentración de algunas especies lipídicas en el corazón de ratones E2F1 $^{-/-}$ , E2F2 $^{-/-}$  y WT de 3 meses de edad. La figura 4 muestra la concentración de los distintos lípidos. En A) y B), los fosfolípidos PC y PE de corazón. Como ocurría en el contenido hepático lipídico, no se aprecian

importantes diferencias entre genotipos. Sin embargo, la administración de la dieta rica en grasa (HFD) provoca un aumento en el contenido cardiaco de PC y PE en el grupo control y E2F1<sup>-/-</sup>.

Los niveles de DG y TG se muestran en C y D, respectivamente. Los niveles de ambos aparecen disminuidos en el grupo de animales deficientes en E2F2. La HFD no provoca cambios en el contenido de TG y DG en ningún genotipo. Por último, se analizaron los niveles de ácidos grasos y colesterol mostrados en las figuras 4 E y F. La dieta rica en grasa aumenta los niveles de ácidos grasos en los animales control y en los deficientes en E2F1. En lo que respecta al contenido en colesterol, sólo mencionar el descenso en su concentración asociado al grupo de animales deficientes en E2F2. Por lo tanto, los factores E2F1 y E2F2 están implicados en el metabolismo lipídico de corazón



**Figura 4. Concentración de fosfatidilcolina (A), fosfatidiletanolamina (B), diglicérido (C), triglicérido (D), ácidos grasos (E) y colesterol (F) en los homogenados de corazón de ratones KO y control (WT) de 3 meses.** Los valores se corresponden a la media  $\pm$  DE. El análisis estadístico de los resultados se efectuó mediante la aplicación del test de la "t" de student; las diferencias estadísticamente significativas se señalan de la siguiente forma: \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, grupo KO respecto a control, ^ $p$ <0.05, ^^ $p$ <0.01, ^^ $p$ <0.001, grupo del mismo genotipo alimentado con dieta rica en grasa respecto a la dieta control.

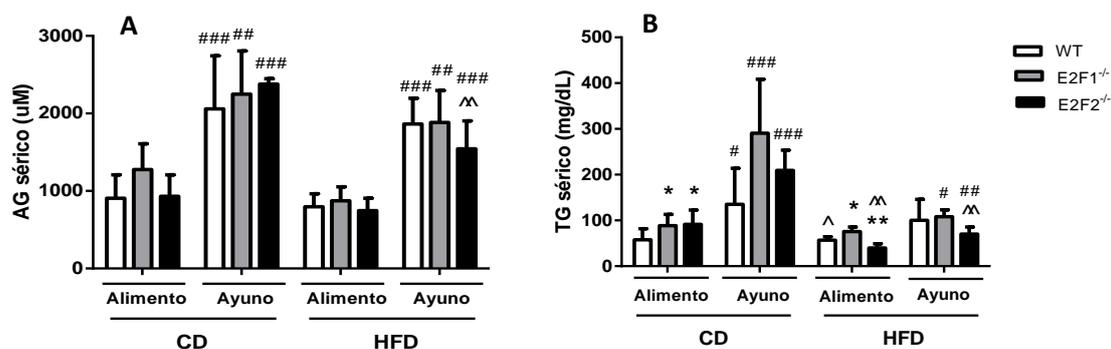
#### 4.4. Contenido de triglicéridos y ácidos grasos séricos

Con ánimo de establecer una vinculación entre los cambios lipídicos de hígado y corazón con cambios en niveles séricos de ácidos grasos y triglicéridos y para definir si E2F1 y E2F2 podrían estar implicados en la respuesta metabólica al ayuno, se realizó un análisis de estos lípidos en suero. El suero se analizó en ratones en alimento y tras 13 h de ayuno.

La figura 5 representa los niveles de AG y TG en el suero. Tras 13 h de ayuno, los niveles de ácidos grasos en el suero son superiores que en estado alimentado ya que la lipólisis de tejido adiposo está activa. Los resultados muestran que los cambios en el estado de ayuno-alimento o la alimentación con HFD no induce cambios en los niveles séricos de ácidos grasos.

El TG, sin embargo, está aumentado en los grupos E2F1<sup>-/-</sup> y E2F2<sup>-/-</sup> en ratones alimentados con dieta control, a pesar de que tras el ayuno no indiquen diferencias estadísticamente significativas. El grupo de animales E2F1<sup>-/-</sup> alimentados con dieta rica en grasa tiene también elevados estos niveles, pero la diferencia revierte tras el ayuno. Por otro lado, los E2F2<sup>-/-</sup> alimentados con dieta rica en grasa muestran disminuidos los triglicéridos tanto en alimento como tras el ayuno, siendo en este último caso significativa la diferencia entre la CD y la HFD.

En definitiva, la ausencia de los factores E2F1 y E2F2 altera los niveles séricos de triglicéridos, lo que sugiere la existencia de cambios en el metabolismo de lipoproteínas.



**Figura 5. Concentración de ácidos grasos (A) y triglicérido (B) en suero de ratones KO y control (WT) de 3 meses en alimento y tras 13 h de ayuno.** Los valores se corresponden a la media  $\pm$  DE. El análisis estadístico de los resultados se efectuó mediante la aplicación del test de la "t" de student; las diferencias estadísticamente significativas se señalan de la siguiente forma: \*p<0.05, \*\*p<0.01, grupo KO respecto a control, ^p<0.05, ^^p<0.01, grupo del mismo genotipo alimentado con dieta rica en grasa respecto a la dieta control, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 para estado de alimento contra estado de ayuno.

## 5. DISCUSIÓN

La enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD) es una de las patologías crónicas hepáticas más comunes. La composición de los lípidos que se acumulan en los sujetos con NAFLD no está bien caracterizada; sin embargo, Arun J. Sanyal y sus colaboradores concluyeron tras un estudio [12] que los niveles de DAG y TAG se encontraban aumentados en pacientes, mientras que los ácidos grasos libres no variaban. Además, vieron un incremento hepático de colesterol y una reducción de la cantidad total de PC y PE.

Debido al conocimiento ya existente de la relación entre los factores E2F y el metabolismo lipídico, en el presente estudio se quiso comprobar la implicación de dichos factores en el origen y desarrollo de NAFLD, ya que la variación lipídica es el marcador por excelencia de esta enfermedad.

Se ha demostrado que los ratones deficientes en E2F1 tienen los niveles ligeramente disminuidos de triglicérido en el hígado. Como ya se ha demostrado en otras ocasiones, la inducción del factor de transcripción E2F1 promueve la síntesis *de novo* de lípidos por lo que la ausencia de este factor podría provocar un fenotipo oxidativo [13].

Por otro lado, quisimos comprobar el papel de otro factor de la misma familia, el E2F2. Los ratones con este factor ausente han mostrado niveles de triglicérido y diglicérido reducidos frente a los controles, por lo que este factor de transcripción podría cumplir un papel similar al E2F1 promoviendo la formación de triglicéridos.

Los animales alimentados con dieta rica en grasa han mostrado en algunas ocasiones aumentados los niveles de diferentes lípidos. Sin embargo, los animales KO han demostrado menor diferencia en tal aumento. Se ha reportado en otras ocasiones, que los ratones E2F1<sup>-/-</sup> presentan resistencia a la obesidad por la dieta rica en grasa [14], y queda demostrado en esta ocasión que los E2F2<sup>-/-</sup> adquieren la misma capacidad, sin embargo, la resistencia de los ratones deficientes en E2F1 a la hepatoesteatosis es sólo parcial. Nuestros resultados sugieren que los factores E2F1 y E2F2 podrían estar de alguna manera regulando genes cuyos productos puedan estar implicados en la generación de distintos lípidos y, por lo tanto, estar implicados en enfermedades asociadas a la obesidad y al acúmulo lipídico como es la esteatosis hepática propia de la enfermedad del hígado graso no alcohólica.

Otro de los objetivos de la investigación fue descubrir que los cambios metabólicos del hígado afectan a órganos periféricos. Los resultados obtenidos a partir del análisis del corazón indican

que los factores E2F1 y E2F2 modulan el metabolismo lipídico en este órgano, aunque parecen indicar una menor relevancia. Sin embargo, la dieta rica en grasa no resulta en unos datos significativos diferentes, ya que, como es lógico, ningún órgano sufre tanto las variaciones dietéticas como el hígado. Es difícil establecer si los cambios lipídicos en corazón pueden estar vinculados con cambios lipídicos hepáticos con los resultados obtenidos por el momento. Los animales deficientes en E2F1 tienen más ácidos grasos en corazón, lo que podría vincularse de alguna manera al incremento en TGs séricos.

Lluís Fajas y sus colaboradores [15] vieron en músculo y tejido adiposo que la inactivación genética del factor E2F1 liberaba la inhibición de la biogénesis requerida para proporcionar a las células energía en caso de falta de nutrientes. Cuando se ha analizado el suero de ratones alimentados, se ha observado que los niveles de triglicéridos de los ratones KO son mayores que los del control y, al mismo tiempo, la concentración es mayor en los animales alimentados con dieta control. Por lo tanto, los factores E2F1 y E2F2 están implicados en el suministro energético a tejidos periféricos a partir del hígado. Por lo tanto, además del factor E2F1, E2F2 también podría de alguna manera regular el metabolismo oxidativo y glicolítico en diferentes condiciones metabólicas.

Todas las células de un organismo generan PC a partir de colina y DG, pero los hepatocitos son capaces de hacerlo también mediante la ruta PEMT, a partir de PE. Anteriormente se había visto que un exceso de PC podía provocar su catabolismo hacia un aumento de síntesis de TG, por vía de generación de DG, y su consecuente aparición de esteatosis [16]. Nuestros datos muestran que junto con el mayor flujo asociado al aumento en disponibilidad de PC, existe una mayor disponibilidad de DG en los animales deficientes en E2F1, lo que podría deberse a un incremento en la vía Kennedy (de la CDP-colina). Sin embargo, el aumento en el flujo metabólico hacia las PC de los deficientes en E2F2 no está asociado con cambios en los flujos que regulan el contenido en DG, lo que apunta a que podría ser la transformación de PE en PC la responsable de este incremento. Por lo tanto, ambos factores están implicados en el desarrollo de la enfermedad, aunque los deficientes en E2F2 parecen estarlo en mayor grado.

En conclusión, no cabe duda de la implicación de los factores E2F1 y E2F2 en la modulación del metabolismo de lípidos, pero su papel concreto es aún desconocido. Cabe mencionar que este estudio se ha realizado en ratones de 3 meses de edad, por lo que cuando se concluyan estos mismos en edades más avanzadas el desarrollo de la enfermedad estará también más marcado.

## 6. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y basándome en los objetivos planteados, se concluye lo siguiente:

1. La ausencia de los factores E2F1 y E2F2 alteran el contenido lipídico de triglicéridos y diglicéridos en hígado, lo que va asociado a cambios en los niveles cardiacos lipídicos.
2. Los factores E2F1 y E2F2 están implicados en la regulación de los flujos metabólicos que dirigen el contenido hepático de glicerolípidos. Una dieta rica en grasa aumenta los niveles de triglicérido en el hígado, pero no en el corazón ni en sangre. La carencia de factores E2F1 y, sobre todo, E2F2 provoca resistencia al almacén de TGs, reforzando la hipótesis de la implicación de estos factores en el desarrollo de la esteatosis hepática.

En definitiva, los factores de transcripción E2F1 y E2F2 juegan un papel importante en la modulación del metabolismo de lípidos y contribuyen, aunque en diferente grado, al desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólica.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cycling through metabolism. Victor Aguilar, Lluís Fajas. *Molecular Medicine*. 2010.
- [2] The transcription factor E2F: a crucial switch in the control of homeostasis and Tumorigenesis. Z.H. Fang, Z.C. Han. *Histology and Histopathology*. 2006.
- [3] Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. Brent A. Neuschwander-Tetri, Stepehn H. Caldwell. *Hepatology*. 2003.
- [4] Survival, Liver Failure, and Hepatocellular Carcinoma in Obesity-Related Cryptogenic Cirrhosis. Ratziu *et al.* *Hepatology*. 2002.
- [5] Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: Organization of the sequence and its encoded protein. Weinberg *et al.* *Genetics*. 1987.
- [6] Regions of the retinoblastoma gene product required for its interaction with the E2F transcription factor are necessary for E2 promoter repression and pRb-mediated growth suppression. Hiebert *et al.* *Molecular and Cellular Biology*. 1993.

- [7] Molecular Pathways: Regulation of Metabolism by RB. Brian F. Clem, Jason Chesney. *Clinical Cancer Research*. 2012.
- [8] E2F-1 is overexpressed and pro-apoptotic in human hepatocellular carcinoma. M. Palaiologou, J. Koskinas, M. Karanikolas, E. Fatourou, D. G. Tiniakos. *Virchows Archiv*. 2012.
- [9] E2F1 and E2F2 Determine Thresholds for Antigen-Induced T-Cell Proliferation and Suppress Tumorigenesis. Zhu *et al.* *Molecular and Cellular Biology*. 2001.
- [10] A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. Folch *et al.* *The Journal of Biological Chemistry*. 1957.
- [11] Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. Ruiz *et al.* *Journal of Lipid Research*. 1997.
- [12] A Lipidomic Analysis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Arun J. Sanyal *et al.* *Hepatology*. 2007.
- [13] Hedgehog-mediated regulation of PPARc controls metabolic patterns in neural precursors and shh-driven medulloblastoma. ZA Nahlé *et al.* *Acta Neuropathologica*. 2012.
- [14] pRb is an obesity suppressor in hypothalamus and high-fat diet inhibits pRb in this location. L Zhu *et al.* *The EMBO Journal*. 2013.
- [15] E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. L. Fajas *et al.* *Nature Cell Biology*. 2013.
- [16] Excess S-adenosylmethionine Reroutes Phosphatidylethanolamine Towards Phosphatidylcholine and Triglyceride Synthesis. P. Aspichueta *et al.* *Hepatology*. 2013.