



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Uxía
Fernández Paz

Tesis doctoral

Papel de la nedilación de PCK1
en la gluconeogénesis hepática

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Endocrinología

TESIS DOCTORAL

PAPEL DE LA NEDILACIÓN DE PCK1 EN LA GLUCONEOGÉNESIS HEPÁTICA

UXÍA FERNÁNDEZ PAZ

Directores: Rubén Nogueiras Pozo
Carlos Diéguez González

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA
SANTIAGO DE COMPOSTELA
AÑO 2024

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Doña Uxía Fernández Paz

*Declora no tener ningún conflicto de interés en relación con la Tesis Doctoral
titulada:*

**PAPEL DE LA NEDILACIÓN DE PCK1 EN LA GLUCONEOGÉNESIS
HEPÁTICA**

Resumen

La nedilación es un mecanismo postraducciona que agrega una proteína similar a la ubiquitina, a saber, la proteína 8 regulada negativamente durante el desarrollo expresada por células precursoras neurales (NEDD8). En este trabajo mostramos en ratones que la nedilación en el hígado está modulada por la disponibilidad de nutrientes. La inhibición de la nedilación en el hígado de ratón reduce la capacidad gluconeogénica y las acciones hiperglucémicas de las hormonas contrarreguladoras. Además, las personas con diabetes tipo 2 presentan niveles elevados de nedilación hepática. A nivel mecanístico, el ayuno o la restricción calórica de ratones conduce a la nedilación de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (PCK1) en tres residuos de lisina: K278, K342 y K387. Encontramos que la mutación de las tres lisinas PCK1 que están nediladas reduce su tasa de actividad gluconeogénica. Las simulaciones de dinámica molecular muestran que la nedilación de PCK1 podría reposicionar dos bucles que rodean el centro catalítico en una configuración abierta, haciendo que el centro catalítico sea más accesible. Nuestro estudio revela que la nedilación de PCK1 proporciona un mecanismo preciso para controlar el metabolismo de la glucosa al vincular la disponibilidad total de nutrientes con la homeostasis metabólica.

Abstract

Neddylation is a post-translational mechanism that adds a ubiquitin-like protein, namely neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8 (NEDD8). In this work, we show in mice that neddylation in liver is modulated by nutrient availability. Inhibition of neddylation in mouse liver reduces gluconeogenic capacity and the hyperglycemic actions of counterregulatory hormones. Further, people with type 2 diabetes display elevated hepatic neddylation levels. At mechanistic level, fasting or caloric restriction of mice leads to neddylation of phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1) at three lysine residues—K278, K342 and K387. PCK1. We find that mutating the three PCK1 lysines that are neddylated reduces its gluconeogenic activity rate. Molecular dynamics simulations show that neddylation of PCK1 could re-position two loops surrounding the catalytic center into

an open configuration, rendering the catalytic center more accessible. Our study reveals that neddylation of PCK1 provides a finely-tuned mechanism of controlling glucose metabolism by linking whole nutrient availability to metabolic homeostasis.

Resumo

A nedilación é un mecanismo postraducional que agrega unha proteína semellante á ubiquitina, a saber, a proteína 8 regulada negativamente durante o desenvolvemento expresada por células precursoras neuronais (NEDD8). Neste traballo mostramos en ratos nos que a nedilación no fígado está modulada pola dispoñibilidade de nutrientes. A inhibición da nedilación no fígado de rato reduce a capacidade gluconeoxénica e as accións hiperglucemiantes das hormonas contrarreguladoras. Porén, as persoas con diabetes tipo 2 presentan niveis elevados de nedilación hepática. A nivel mecanístico, o xaxún ou a restricción calórica de ratos conduce á nedilación da fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (PCK1) en tres residuos de lisina: K278, K342 y K387. Encontramos que a mutación das tres lisinas PCK1 que están nediladas reduce a súa taxa de actividade gluconeoxénica. As simulacións de dinámica molecular mostran que a nedilación de PCK1 podería reposicionar dous bucles que rodean o centro catalítico nunha configuración aberta, facendo que o centro catalítico sexa máis accesible. O noso estudio revela que a nedilación de PCK1 proporciona un mecanismo preciso para controlar o metabolismo da glucosa ao vincular a dispoñibilidade total de nutrientes coa homeostasis metabólica.

Tabla de contenido

Tabla de contenido	5
Abreviaturas, acrónimos y anglicismos:.....	9
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1 Homeostasis glucídica	17
1.1.1 Regulación de los niveles de glucosa en sangre.....	17
1.1.1.1 Estado absorptivo	17
1.1.1.2 Estado interprandial y postprandial	17
1.1.2 Diabetes.....	18
1.1.3 Papel del hígado en la regulación de la homeostasis glucídica.....	21
1.1.4 Sistemas de detección de glucosa en sangre	21
1.1.4.1 Detección y control de los niveles de glucemia a nivel central	21
1.1.4.2 Detección de los niveles de glucemia por el hígado.....	24
1.1.4.3 Detección de los niveles de glucemia por el páncreas	25
1.1.4.4 Detección de los niveles de glucemia por el intestino	26
1.1.5 Sistemas de regulación de la homeostasis glucídica.....	27
1.1.5.1 Adaptaciones metabólicas al ayuno	27
1.1.5.1.1 Glucagón	28
1.1.5.1.2 Adrenalina.....	29
1.1.5.1.3 Glucocorticoides	31
1.1.5.1.4 Hormona de crecimiento y ghrelina	32
1.1.5.2 Adaptaciones metabólicas a la hiperglucemia.	34
1.1.5.2.1 Insulina.....	34
1.1.5.2.2 Amilina	38
1.1.5.2.3 Incretinas	39
1.1.6 Mecanismos hepáticos para mantener la normoglucemia.....	41
1.1.6.1 Utilización de glucosa en el hígado: glucólisis	42
1.1.6.1.1 Regulación alostérica y endocrina de la glucólisis.....	45
1.1.6.1.2 Regulación transcripcional de la glucólisis	45
1.1.6.2 Almacenamiento de glucosa en el hígado: glucogenogénesis	47
1.1.6.2.1 Regulación de la glucogenogénesis	48
1.1.6.3 Producción endógena de glucosa	49

1.1.6.3.1	Glucogenolisis	49
1.1.6.3.2	Gluconeogénesis.....	52
1.1.6.4	Liberación de glucosa al torrente sanguíneo.....	65
1.2	Modificaciones postraduccionales	65
1.2.1	Ubiquitinación	66
1.2.2	Nedilación.....	67
1.2.2.1	Complejo CRL.....	69
1.2.2.2	Proteínas reguladas por nedilación	71
2.	HIPÓTESIS.....	75
3.	OBJETIVOS	77
4.	METODOLOGÍA.....	79
4.1	Animales de experimentación.....	79
4.2	Procedimientos en animales	81
3.2.1	Monitorización de la ingesta y el peso corporal.	81
4.2.1	Estudio del efecto del estado nutricional en los niveles de nedilación	81
4.2.2	Estudio del efecto de la glucosa en los niveles de nedilación.....	81
4.2.3	Ayuno de 24 horas.....	81
4.2.4	Restricción calórica.....	81
4.2.5	Inyección intraperitoneal	82
4.2.6	Administración de hormonas	82
4.2.6.1	Administración de leptina.....	82
4.2.6.2	Administración de glucagón	82
4.2.6.3	Administración de adrenalina.....	82
4.2.6.4	Administración de cortisol.....	83
4.2.6.5	Administración de insulina	83
4.2.7	Tests de tolerancia	83
4.2.7.1	Test de tolerancia a piruvato	83
4.2.7.2	Test de tolerancia a glucosa	83
4.2.7.3	Test de tolerancia a insulina	84
4.2.7.4	Test de tolerancia a glicerol.....	84
4.2.8	Tratamiento con MLN4924	84
4.2.9	Inyección en la vena de la cola.....	85
4.2.10	Determinación de la producción hepática de glucosa	86

4.2.10.1	Cirugía para la canulación de la vena yugular	86
4.2.10.2	Infusión con glucosa tritiada.....	87
4.2.11	Análisis histológico del tejido hepático.	88
4.2.11.1	Hematoxilina/eosina.....	88
4.2.11.2	Inmunohistoquímica.....	88
4.2.12	Sacrificio, recogida de tejidos y muestras.	89
4.3	Cultivos celulares.....	89
4.3.1	Tratamientos celulares.....	90
4.3.1.1	Transfecciones	90
4.3.1.1.1	Silenciamiento de NAE1, NEDD8 y PCK1 en la línea celular AML12	90
4.3.1.1.2	Sobreexpresión de PCK1 en la línea celular AML12	91
4.3.1.2	Estudio del efecto del estado nutricional	91
4.3.1.3	Tratamiento con MLN4924.....	92
4.3.1.4	Medición de la glucosa en el medio.	92
4.3.1.5	Determinación de la actividad enzimática de PCK1.	93
4.4	Muestras de hígado de pacientes.	93
4.5	Análisis molecular	94
4.5.1	Análisis de la expresión proteica mediante <i>Western Blot</i>	94
4.5.1.1	Extracción de proteínas totales y preparación de las muestras.....	94
4.5.1.2	Cuantificación de los extractos proteicos.....	96
4.5.1.3	Preparación de las muestras para electroforesis en SDS-PAGE.	96
4.5.1.4	Electroforesis SDS-PAGE.	97
4.5.2	Transferencia semi-húmeda.....	98
4.5.2.1	Inmunodetección de proteínas.....	99
4.5.2.1.1	Bloqueo.....	99
4.5.2.1.2	Incubación con anticuerpo primario.	99
4.5.2.1.3	Incubación con anticuerpo secundario.....	100
4.5.2.1.4	Detección por quimioluminiscencia.	101
4.5.2.2	Cuantificación de la densidad óptica de las bandas.	101
4.5.3	Detección de hormonas en suero.	101
4.5.4	Detección de metabolitos en suero.	102
4.5.5	Immunoprecipitación de PCK1.....	102
4.5.6	Modelado de proteínas.....	103

4.5.7	Cuantificación de proteína por SWATH-MS (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra) en experimentos de pull-down.	103
4.5.8	Determinación del sitio de nedilación.....	104
4.6	Análisis estadístico.	104
5.	RESULTADOS	107
5.1	La nedilación hepática se activa durante la privación de nutrientes y es necesaria para mantener los niveles de glucosa en sangre.	107
5.1.1	La nedilación hepática está regulada por la disponibilidad nutricional.....	107
5.1.2	La inhibición de la nedilación hepática reduce la producción de glucosa.	110
5.1.3	La inhibición de la nedilación hepática reduce la producción de glucosa de manera independiente del sexo.....	112
5.1.4	La inhibición de la nedilación hepática no modifica los niveles de proteínas de enzimas gluconeogénicas o acetil-CoA.	113
5.2	La nedilación hepática regula la acción de las hormonas contrarreguladoras.	116
5.3	La nedilación hepática está asociada con la resistencia a la insulina.	120
5.3.1	La inhibición de la nedilación reduce la hiperglucemia inducida por una dieta alta en grasas.	120
5.3.2	La nedilación hepática está aumentada en el hígado de personas con diabetes tipo 2.	122
5.4	PCK1 se nedila ante la deficiencia de nutrientes y esta PTM es necesaria para su actividad gluconeogénica.....	124
5.4.1	PCK1 aumenta su nedilación en ayuno y en restricción calórica.	124
5.4.2	PCK1 está nedilado en tres lisinas después de restricción calórica y ayuno.....	127
5.4.3	La nedilación de PCK1 en sus residuos K278, K342 y K387 es necesaria para su actividad gluconeogénica <i>in vitro</i>	130
5.4.4	La nedilación de PCK1 en sus residuos K278, K342 y K387 es la responsable de la producción hepática de glucosa <i>in vivo</i>	134
6.	DISCUSIÓN.....	138
7.	CONCLUSIONES	146
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	148
	ANEXOS	165

Abreviaturas, acrónimos y anglicismos:

AAV: virus adenoasociado

AC: adenilato ciclasa

ACC: acetil-CoA carboxilasa

ACTH: hormona adrenocorticotropa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosina difosfato

AGL: enzima desramificadora de glucógeno

AKT/PKB: proteína quinasa B

AMPc: adenosina monofosfato ciclico

AMPK: proteína quinasa activada por AMP

APPBP1: proteína 1 de unión a la proteína precursora beta amiloide

AP: área postrema

APS: amonio persulfato

ARC: arcuato

Arg: arginina

ATP: adenosín trifosfato

AUC: área bajo la curva

BCA3: Gen 3 asociado al cáncer de mama

BPG: 1,3-bifosfoglicerato

BSA: albúmina de suero bovino

CAMKII: proteína enzima calcio calmodulina quinasa II

CBP: proteína de unión a CREB

C/EBP α : Factor de Transcripción de Unión al Elemento CCAAT Alfa

ChREBP: proteína de unión al elemento respuesta de carbohidratos

COP9: fotomorfogénesis 9 constitutiva

CREB: proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc

CRH: hormona liberadora de corticotropinas

CRL: ligasa cullin RING

CRTC2: Coactivador 2 de la transcripción regulado por CREB

CSN: signalosoma COP9

CUL: cullin

Cys: cisteína

DAG: diacilglicerol

DDB1: proteína 1 de unión al AND dañado

DEN1: desdenilasa 1

DGAT2: diacilglicerol O-aciltransferasa 2

DMT2: diabetes *mellitus* tipo 2

DPP4: dipeptidil peptidasa-4

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

FADH: flavín adenín dinucleótido

FAS: sintasa de ácidos grasos

FBPasa: fructosa 1,6-bifosfatasa

F2,6-BP: fructosa 2,6 bifosfato

FBXW8: proteína 8 que contiene la repetición F-box/WD

FGF21: Factor de Crecimiento de Fibroblastos 21

F1,6P: fructosa-1,6-bifosfato

F6P: fructosa-6-fosfato

FOXO1: proteína Forkhead Box O1

GABA: ácido γ -aminobutírico

GABAAR: receptor GABAA

GAP/G3P: gliceraldehido-3-fosfato

GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa

GCGR: receptor de glucagón

GCK: glucoquinasa

GCKR: proteína reguladora de la glucoquinasa

GE: (neuronas) excitadas por glucosa

GH: hormona de crecimiento

GHR: receptor de hormona de crecimiento

GHRH: hormona liberadora de hormona de crecimiento

GI: (neuronas) inhibidas por glucosa

GIP: polipéptido insulínico dependiente de glucosa/ péptido inhibidor gástrico

GIPR: receptor del péptido inhibidor gástrico

GK: glucoquinasa

Gly: glicina

G6Pt/SLC37A4: transportador de glucosa 6-fosfato

GR: receptor glucocorticoide

GRE: elemento respuesta de glucocorticoides

GLUT5: transportador de glucosa 5

GLUT2: transportador de glucosa 2

GLP1: péptido similar a glucagón 1

GlyTT: test de tolerancia a glicerol

GP: glucógeno fosforilasa

G1P: glucosa-1-fosfato

G6P: glucosa 6-fosfato

G6Pasa: glucosa-6-fosfatasa

GPAT: Glicerol-3-fosfato aciltransferasa 3

GPK: glucógeno fosforilasa quinasa

Grb2: factor de unión a Son of Sevenless homólogo 1

GS: glucógeno sintasa

GSK-3: glucógeno sintasa quinasa 3

GTP: guanosina trifosfato

GTT: test de tolerancia a glucosa

GWAS: Estudios de asociación del genoma completo

GYG1/2: glucogenina 1/2

HDAC6: histona desacetilasa 6

HGP: producción de glucosa hepática

HIF1 α : Factor Inducible por la Hipoxia 1-alfa

HK: hexoquinasa

HNF4 α : Receptor 4 Activado por Proliferador de Peroxisomas Alfa

HOMA-IR: *Homeostasis Model Assessment- Insulin Resistance*

HSL: hormona sensible a lipasa

Hsp90: proteína de choque térmico 90

HuR: antígeno R humano

IMC: índice de masa corporal

INE: Instituto Nacional de Estadística

Ip: intraperitoneal

IP3: inositol trifosfato

IP3R: receptor inositol-1,4,5-trifosfato

IR: receptor de insulina

IRS: sustrato del receptor de insulina

ITT: test de tolerancia a insulina

JAK: quinasas Janus

Km: constante de Michaelis-Menten

KO: *knockout*

Leu: leucina

LH: hipotálamo lateral

L-PK: piruvato quinasa hepática

Lys: lisina

MAFLD: Hígado Graso Asociado con el Metabolismo

MAPK: proteína quinasa por mitógenos

MDM2: *Mouse Double Minute 2*

MEK: MAP quinasa activada por mitógenos

mTOR: objeto de la rapamicina en mamíferos

NaCl: cloruro sódico

NAD: Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina

NADPH: Dinucleótido Fosfato de Nicotinamida Adenina reducido

NAE1: enzima activadora de NEDD8

NEDD8: Célula precursora neuronal expresada y regulada negativamente durante el desarrollo 8

NEDP1: proteasa 1 específica de NEDD8

NEFAs: ácidos grasos no esterificados

NLH: núcleo lateral

NR3C1a: Gen del receptor de glucocorticoides para isoforma α , subfamilia 3 de receptores nucleares, grupo C, miembro 1

NTS: núcleo del tracto solitario

NUR77/ NR4A1: Receptor Nuclear 4A1

NVMH: núcleo ventromedial

OMS: Organización Mundial de la Salud

OGTT: test de tolerancia a glucosa oral

PC: piruvato carboxilasa

PCK1/PEPCK1: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

PDH: piruvato deshidrogenasa

PDK: Quinasa de la Piruvato Deshidrogenasa

PDK1: Quinasa 1 de la Piruvato Deshidrogenasa

PDK4: Quinasa 4 de la Piruvato Deshidrogenasa

PEP: fosfoenolpiruvato

PFK-1: fosfofructoquinasa-1

PFK-2: fosfofructoquinasa-2

PFKFB1: enzima bifuncional fosfofructoquinasa 2/fructosa bifosfatasa 2

P_i: fosfato inorgánico

2PG: 2-fosfoglicerato

3PG: 3-fosfoglicerato

PGC1 α : Coactivador-1 del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas

PGM-1: fosfoglucomutasa

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PK: piruvato quinasa

PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc
PKB: proteína quinasa dependiente de proteína quinasa B
PLC: fosfolipasa C
PP1: proteína fosfatasa 1
PP2A: proteína fosfatasa 2A
PPAR γ : Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas Gamma
PTMs: modificaciones postraduccionales
PTT: test de tolerancia a piruvato
PVDF: fluoruro de polivinilideno
PVH: núcleo hipotalámico paraventricular
RCF: fuerza centrífuga relativa
RBX1/2: *Ring-Box* 1/2
SDS: dodecilsulfato sódico
Ser: serina
SEN8: SUMO/sentrina específico deisopeptidasa 1
SGLT1: transportador de glucosa sodio-dependiente
SHC: proteína Src homólogo que contiene dominio 2
SHP: compañero heterodímero corto
SIK: proteína quinasa inducible por sal
siRNA: ácido ribonucleico pequeño interferente
SIRT1: sirtuina 1
SKP1/p19: proteína 1 asociada a quinasa de fase S
SNP: Polimorfismo de Nucleótido Único
SOCS: supresor de señalización de citoquinas
SOS: *Son of Sevenless*
SPF: libre de gérmenes patógenos específicos
SREBP1c: proteína 1c de unión al elemento regulatorio de esteroides
STAT: Transductor de señal y activador de transcripción
SWATH-MS: Adquisición de ventana secuencial de todos los espectros de masas teóricos
TAGs: triacilglicéricos

TAC: ácidos tricarboxílicos

TBST: solución salina tamponada con tris y polisorbato

TEMED: tetrametil-etilendiamina

TSH: hormona estimuladora de la tiroides

TZD: tiazolidinedionas

UBA3: subunidad activadora 3 de la enzima E1

UBE1: enzima activadora de ubiquitina 1

UBE2F: enzima de conjugación de ubiquitina E2 F

UBE2M/UBC12: enzima de conjugación de ubiquitina E2 M

UCHL3: Hidrolasa L3 ubiquitina C-terminal

UFD: dominio pliegue de ubiquitina

UGT: glucuroniltransferasa

VMN: núcleo ventromedial

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

WT: wild type

XIAP: Proteína Inhibidora de la Apoptosis Ligada al Cromosoma X

ANGLICISMOS:

Background: fondo

Buffer: tampón

Enhancer: potenciador

Knockdown: reducido

Knockout: eliminación, desactivación

Stripping: desmontado

Plug: tapón

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Homeostasis glucídica

1.1.1 Regulación de los niveles de glucosa en sangre.

La concentración de glucosa en sangre se mantiene normalmente dentro de un estrecho margen, por lo general en torno a 90-100 mg/dl (normoglucemia) y su regulación es un proceso crítico, complejo y coordinado, ya que se trata de la principal fuente de energía a nivel celular. De hecho, los bajos niveles de glucosa en sangre, o hipoglucemia, rápidamente provoca eventos metabólicos en órganos como el cerebro o el intestino que necesitan una fuente continua de glucosa [1]. Es por ello que el organismo necesita mantener los niveles de glucosa constantes, siendo la ingesta de alimentos la principal fuente de asimilación de glucosa en condiciones fisiológicas. Sin embargo, una vez concluido el período postprandial, la producción de glucosa se vuelve crucial para evitar un descenso en los niveles de glucosa en sangre.

1.1.1.1 Estado absorptivo

Los carbohidratos provenientes de la dieta son digeridos y procesados por varias glucosidasas en el tracto digestivo, y los monosacáridos resultantes, principalmente glucosa, son transportados a varios tejidos constituyendo la principal fuente para la generación de adenosín trifosfato (ATP). Este transporte de glucosa a través de la pared intestinal es mediado por el transportador de glucosa sodio-dependiente (SGLT1), y por el transportador de glucosa-independiente de facilitación de la difusión (GLUT5) en el caso de la fructosa. Por cada molécula de glucosa, se transportan al interior de la célula epitelial dos iones de sodio, los cuales regresan a la luz intestinal mediante la bomba de sodio y potasio [2]. Cuando la cantidad de glucosa en el lumen intestinal se encuentra en niveles elevados por encima de la saturación de SGLT1 y, además, es prolongada en el tiempo, un transportador independiente de monosacáridos (GLUT2) del lado contraluminal de la célula epitelial intestinal se transloca de la membrana basal a la apical para aumentar la absorción de glucosa. Esta entra entonces a la circulación por la vena porta, que la transporta al hígado [3].

1.1.1.2 Estado interprandial y postprandial

Por otro lado, entre comidas o en estado de ayuno como el ayuno nocturno, el aporte de glucosa al torrente sanguíneo proviene en primera instancia de la lisis del glucógeno

almacenado en el hígado. Este, junto con el músculo, es el principal almacén de glucógeno, y, además, cuando el ayuno se prolonga, es capaz de producir glucosa *de novo* a partir de sustratos no glucídicos como el glicerol proveniente de la lipólisis del tejido adiposo, el lactato y algunos aminoácidos (principalmente alanina y glutamina) procedentes del tejido muscular esquelético. Además, el hígado tiene la capacidad de sintetizar cuerpos cetónicos (β -hidroxibutirato, aceto-acetato y acetona) a partir de ácidos grasos libres. Estos pueden ser utilizados como fuente de energía por todos los tejidos y órganos, pero son especialmente importantes para el cerebro, para el cual constituyen dos tercios de su fuente de utilización de energía en situaciones fisiológicas, y la única fuente en situaciones en las que la glucosa puede escasear, como durante el ayuno [4].

1.1.2 Diabetes

Como ya se ha mencionado, el mantenimiento de la normoglucemia exige una respuesta coordinada a nivel central y periférico. Teniendo en cuenta que la secreción de insulina y su acción son procesos fundamentales para mantener la normoglucemia, defectos en cualquiera de los mecanismos involucrados en esos procesos pueden dar lugar al desequilibrio metabólico responsable del desarrollo de la diabetes. Esta patología es causada por la combinación de dos factores principales: un defecto en la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas (diabetes tipo 1), y por la incapacidad de los tejidos sensibles a insulina de responder correctamente a esta hormona (diabetes tipo 2) [5]. Todo ello tiene como consecuencia que los niveles de glucosa en sangre se eleven de forma anormal y mantenidos en el tiempo. En ese sentido, la captación de glucosa estimulada por insulina (sobre todo en el músculo esquelético) está enormemente reducida en pacientes con diabetes tipo 2. Además, el concomitante uso de radioisótopos ha permitido mostrar que la producción hepática de glucosa no se ve suficientemente inhibida por la insulina, lo cual pone de manifiesto la presencia de resistencia a insulina tanto hepática como periférica [6].

En estadios iniciales, las células β -pancreáticas pueden compensar el exceso de glucosa en sangre o hiperglucemia, y la resistencia a insulina, produciendo y secretando más insulina, generando así hiperinsulinemia [7]. Además, el aclaramiento de esta hormona por el hígado también juega un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad [8, 9].

La hiperinsulinemia compensatoria que se genera para controlar la hiperglucemia tiene como efecto colateral un aumento de la lipogénesis hepática, hiperlipidemia, y la expansión del tejido adiposo, debido a su poder lipogénico [10, 11]. Esto a su vez provoca un aumento en el flujo de lípidos a nivel hepático, promoviendo la esteatosis hepática, la resistencia a insulina y un aumento en la tasa gluconeogénica al aumentar el flujo de lípidos en forma de ácidos grasos libres (NEFAs) y glicerol. Esto último, junto con la resistencia hepática a insulina que hace que esta hormona sea incapaz de inhibir completamente la gluconeogénesis hepática, tiene como consecuencia un aumento en los niveles de glucosa que empeora el perfil glucémico [12]. En ese sentido, se ha visto que el aumento de la producción hepática de glucosa aumentada en estado postprandial se debe a ese aumento en la tasa gluconeogénica y no a una mayor tasa de glucogenolisis [13].

A nivel epidemiológico, la diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2) es de una de las patologías médicas más desafiantes del siglo XXI y que va de la mano del progresivo aumento de la prevalencia de la obesidad, convirtiéndose ambas en las pandemias de este siglo [14]. En la actualidad, aproximadamente 1 de cada 11 adultos en el mundo sufre diabetes, y la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha catalogado a esta patología como la séptima causa de muerte. Para 2045 se estima que habrá 693 millones de pacientes diabéticos en el mundo, y el coste de esta patología superará los 850.000 millones de dólares por año, y será responsable directa de una reducción de hasta 12 años en la esperanza de vida de los pacientes, así como la causante de 5 millones de muertes anuales en todo el mundo [15].

Las causas de la diabetes tipo 2, a diferencia de la diabetes tipo 1 producida por un déficit en la síntesis de insulina por las células β -pancreáticas y que sí tiene un potente factor genético, en este caso son multifactoriales e incluyen tanto factores genéticos, como ambientales que afectan al funcionamiento de las células β -pancreáticas y a la sensibilidad a insulina del músculo, hígado, tejido adiposo e incluso el propio páncreas. Estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) encontraron más de 400 genes relacionados con el desarrollo de esta enfermedad, principalmente genes relacionados con la función pancreática. Sin embargo, el peso de la genética es relativamente minoritario y supone menos del 20% del riesgo de desarrollar la enfermedad [16, 17]. Por otro lado, estudios de modificación de hábitos sostienen que cambios en el estilo de vida, como el

aumento de la industrialización e ingesta de productos refinados e hiperpalatables, y el creciente sedentarismo de la sociedad, tienen un papel crucial. Además, se señalan otros factores ambientales como la contaminación ambiental, las condiciones socioeconómicas y psicosociales, el tabaquismo y la falta de sueño [18]. Asimismo, el estilo de vida parental, la programación intrauterina y alteraciones metabólicas posnatales tempranas pueden influenciar el riesgo de padecer esta enfermedad mediante alteraciones en la metilación del ADN [19-21].

Siguiendo la línea de que la mayoría de pacientes con diabetes tipo 2 tienen sobrepeso y que la obesidad juega un papel importante en su desarrollo, el exceso de grasa abdominal está asociado a una mayor liberación de NEFAs a la sangre, lo cual estimula la gluconeogénesis hepática; reduce el aclaramiento de insulina y aumenta la síntesis de lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL). A nivel del músculo esquelético, los NEFAs provocan una reducción en la tasa de oxidación de glucosa y una reducción en la tasa de almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno (el llamado efecto Randle) [22]. Todo ello contribuyendo a la elevación de los niveles de glucosa en sangre y a la hiperglucemia. Numerosos pacientes obesos que padecen resistencia a insulina poseen también el denominado Síndrome Metabólico, que asocia la diabetes tipo 2, dislipidemia e hipertensión arterial; todos ellos factores agravantes del riesgo cardiovascular [23], la principal causa de muerte a nivel mundial según la OMS, y en España, según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE).

Además de que el exceso de tejido adiposo en pacientes con obesidad se relaciona con una mayor liberación de NEFAs, también se relaciona con la acumulación de lípidos ectópica, reduciendo la capacidad de los diferentes órganos de funcionar y responder correctamente. En ese sentido, la esteatosis hepática es común en estos pacientes y la esteatosis hepática no alcohólica es considerada ahora como parte del Síndrome Metabólico asociada a resistencia a insulina. Además, los niveles de triglicéridos intramusculares se encuentran incrementados en pacientes obesos y se correlaciona con una mayor severidad de resistencia a insulina a nivel muscular [24].

El papel de las hormonas contrarreguladoras en la resistencia a insulina de la diabetes tipo 2 también es importante en el desarrollo de esta enfermedad. Quienes la padecen poseen unos niveles de glucagón en sangre elevados, de manera que esta hormona contribuye a potenciar

la gluconeogénesis y la glucogenolisis, sobre todo en presencia de una deficiencia de insulina [21]. Acorde con esto, se ha demostrado que los niveles circulantes de glucagón disminuyen notablemente durante la infusión sistémica de insulina [25], y que el mantenimiento de los niveles circulantes de glucagón constantes durante dicha infusión sistémica de insulina, disminuyen la capacidad de esta para suprimir la producción hepática de glucosa [26].

1.1.3 Papel del hígado en la regulación de la homeostasis glucídica

Con todo, la concentración de glucosa en sangre sufre fluctuaciones durante los estados de ayuno y alimentación, y la regulación coordinada entre la utilización y la producción de glucosa es crítica para mantener los niveles de glucosa en sangre constantes en un rango fisiológico. Una de las principales funciones del hígado es mantener esa normoglucemia, alterando la tasa de liberación de glucosa (glucogenolisis) y controlando procesos de producción de glucosa *de novo* (gluconeogénesis) [27]. Los hepatocitos constituyen uno de los pocos tipos celulares que tienen la capacidad de consumir y producir glucosa. El control normoglucémico, por tanto, es resultado de un equilibrio entre estos dos procesos.

Para llevar a cabo estas acciones fisiológicas que mantienen los niveles de glucosa circulantes dentro del rango homeostático, es necesaria una estrecha coordinación entre los sistemas de detección de los niveles circulantes de glucosa (principalmente el sistema nervioso central, el hígado, el páncreas y el tracto gastrointestinal) y el resto de tejidos y órganos. Esta comunicación sistémica se lleva a cabo principalmente por la acción coordinada de las principales hormonas involucradas en la homeostasis de la glucosa, esto es, la insulina y las hormonas contrarreguladoras: el glucagón, la adrenalina, los glucocorticoides y la hormona de crecimiento.

1.1.4 Sistemas de detección de glucosa en sangre

Por todas las razones mencionadas, es esencial que el cuerpo detecte los niveles de glucosa plasmática constantemente para ser capaz de responder rápida y adecuadamente cuando los recursos energéticos son insuficientes.

1.1.4.1 Detección y control de los niveles de glucemia a nivel central

A nivel central, el hipotálamo juega un papel fundamental en la detección y regulación de los niveles de glucosa en sangre mediante la coordinación de la respuesta del organismo para mantener la homeostasis de la glucosa y asegurarse de que haya suficiente energía disponible.

En cuanto a la detección de los niveles de glucosa, las neuronas detectoras de glucosa pueden clasificarse en dos categorías: neuronas excitadas por glucosa (GE), que aumentan la frecuencia de su potencial de acción ante altos niveles de glucosa; y neuronas inhibidas por glucosa (GI), que aumentan la frecuencia de su potencial de acción y su potencial de membrana en respuesta a un descenso de los niveles de glucosa [28]. Las neuronas detectoras de glucosa se encuentran en múltiples regiones del cerebro, incluyendo el arcuato (ARC), el núcleo paraventricular (PVH), el núcleo ventromedial (VMH), el núcleo lateral (LH), el núcleo supraóptico, el núcleo del tracto solitario (NTS) y el área postrema (AP) [29, 30]. Entre los núcleos hipotalámicos, el VMH ha sido reconocido como uno de los principales lugares de detección de los niveles de glucosa y de regulación de la homeostasis glucídica a nivel sistémico [29, 31].

Niveles elevados de glucosa activan neuronas GE, provocando un efecto inhibitorio en la respuesta sistémica a la hipoglucemia y activando la respuesta a hiperglucemia. Como resultado de esta activación, se estimula la liberación del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) en el VMN del hipotálamo, y el NTS, o neuropéptidos anorexigénicos en el ARC [32]. Ello tiene como resultado la activación del sistema nervioso autónomo parasimpático que estimula la liberación de insulina desde el páncreas [32, 33].

Por el contrario, cuando los niveles de glucosa descienden, aumenta la actividad de neuronas GI en el ARC, el PVN, el VMH, y el LH [34]. Esa mayor activación neuronal está mayoritariamente asociada con la secreción de los neurotransmisores glutamato y noradrenalina [35]. En este apartado, cabe destacar el papel del núcleo VMH en la respuesta contrarreguladora, puesto que se ha descrito que lesiones del VMH bloquean la respuesta sistémica hormonal a la hipoglucemia, y que la glucoprivación en el VMH aumenta rápidamente los niveles de glucosa en sangre como resultado de la liberación de hormonas contrarreguladoras (glucagón, adrenalina, y corticosteroides) mediante la activación del sistema nervioso simpático, dando como resultado final la estimulación de la glucogenolisis, la gluconeogénesis y la liberación de glucosa, para así, en última instancia, dar como

resultado el aumento de los niveles de glucosa en sangre [28, 36, 37]. En línea con esto, se ha visto que la activación de la secreción de glucagón por hipoglucemia hiperinsulinémica se puede bloquear mediante la infusión de glucosa en el VMH, y esta inhibición se puede prevenir mediante la administración en el VMH de un antagonista del receptor GABA_A (GABAAR), lo que indica que la secreción de GABA inducida por glucosa en el VMH bloquea la respuesta contrarreguladora [38].

El sistema nervioso central también afecta a la homeostasis glucídica sistémica mediante inervaciones del sistema nervioso simpático y parasimpático. Las fibras eferentes simpáticas en los islotes pancreáticos liberan noradrenalina para estimular la liberación de la secreción de glucagón mediante la unión a receptores α -adrenérgicos en las células α ; e inhiben la secreción de insulina mediante la activación de receptores β -adrenérgicos de las células β . Por el contrario, las fibras parasimpáticas envían inputs colinérgicos a los islotes pancreáticos para inhibir la secreción de glucagón en las células α , así como aumentar la secreción de insulina mediante la liberación de acetilcolina que se une a receptores muscarínicos en las células β [29]. Además de la acción en los islotes pancreáticos, el cerebro también modula la liberación de adrenalina desde la médula adrenal. Por último, desde el eje hipotálamo-hipofisario, la adenohipófisis libera hormonas hipofisarias, entre ellas la hormona adrenocorticotropa (ACTH) con el fin de estimular la producción de glucocorticoides en la médula suprarrenal; y la liberación de GH por la adenohipófisis como consecuencia de cambios en la liberación hipotalámica de la hormona liberadora de GH (GHRH) y de la somatostatina (SST) [39, 40].

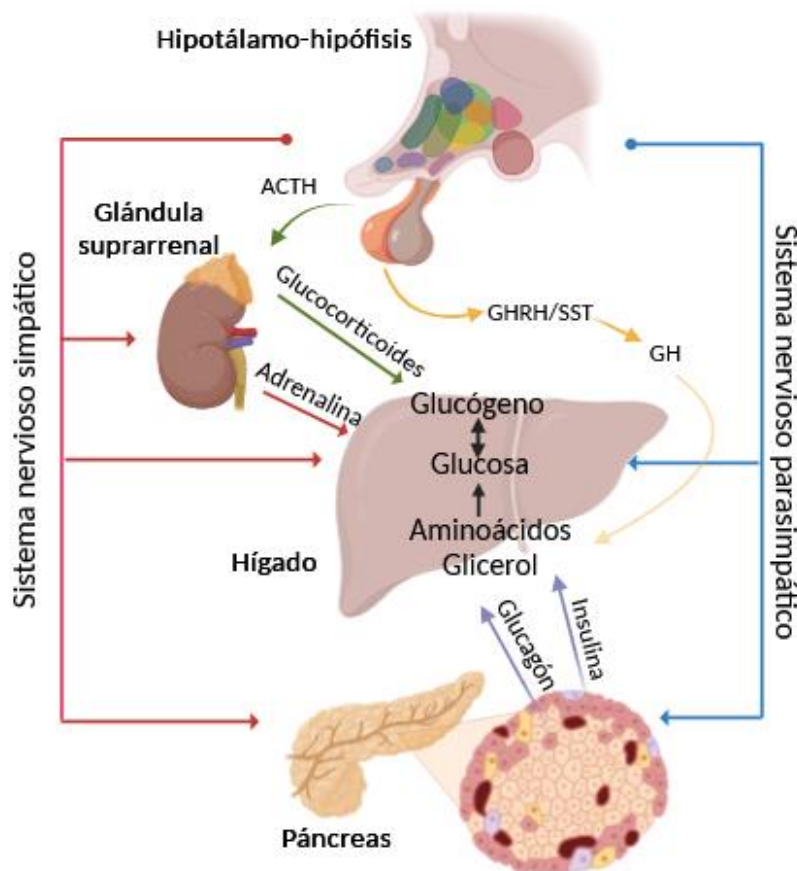


Figura 1. Representación esquemática del control metabólico a nivel central. Imagen de elaboración propia con Biorender.

1.1.4.2 Detección de los niveles de glucemia por el hígado

Cuando los niveles de glucemia son altos, los sensores hepáticos inducen una respuesta adaptativa para dirigir el metabolismo glucídico hacia el consumo y almacenamiento de glucosa. En el hígado se expresan 5 tipos de transportadores GLUT (GLUT 1, GLUT 2, GLUT 5, GLUT 8 y GLUT 9) [41]. Sin embargo, GLUT2 es el principal transportador de membrana que permite a la glucosa entrar en los hepatocitos [42]. En los hepatocitos, GLUT2 controla la mayor parte de la captación de glucosa dependiendo de los niveles de glucosa circulante en el torrente sanguíneo. Sin embargo, su actividad no parece ser crítica para la detección de los niveles de glucosa postprandrial, ya que se ha visto que la deficiencia de GLUT2 en el hígado de ratones no altera la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células β -pancreáticas [43].

Una vez en la célula, la glucosa es rápidamente fosforilada a glucosa-6-fosfato (G6P) por la enzima glucoquinasa (GCK) o hexoquinasa IV (HK IV), paso crítico para la glucólisis, glucogenogénesis y la vía de las pentosas fosfato. Esta enzima es quien cataliza el primer paso del metabolismo de glucosa a nivel intrahepático y su actividad aumenta sigmoidalmente con respecto a la concentración de glucosa en sangre. Se trata de una enzima que no se inhibe por su producto (glucoa-6-fosfato, G6P) y la cual ve la unión a su regulador negativo (GCKR) debilitada cuando se dan situaciones de altas concentraciones de glucosa [44], momento en el que se transloca al citoplasma, donde puede acceder a la glucosa y convertirla en G6P. Por tanto, la glucoquinasa actúa como un enzima sensible a glucosa y permite a los hepatocitos captar la glucosa cuando los niveles de esta aumentan. Acorde a ello, la sobreexpresión de GCK induce el almacenamiento de glucógeno y la glucólisis en hepatocitos primarios [45].

1.1.4.3 *Detección de los niveles de glucemia por el páncreas*

La secreción de insulina por las células β -pancreáticas depende en cierta medida de la presencia de transportadores de glucosa, GLUT, en la membrana celular. Datos obtenidos en roedores han puesto de manifiesto la gran relevancia de GLUT2 en el caso de roedores, mientras que en humanos se ha visto que GLUT1 y GLUT3 juegan un papel más relevante. Además, otros GLUT y SGLUT han sido implicados en este proceso [41]

Una vez dentro de la célula, como se ha mencionado anteriormente, la enzima hexoquinasa es la responsable de convertir la glucosa en G6P en presencia de ATP y se encuentra presente ubicuamente en todos los tejidos, pero la isoforma IV (también conocida como glucoquinasa, GK) tan solo se encuentra presente en el hígado, en las células β del páncreas, en el intestino delgado y en el sistema nervioso central (SNC). La actividad de esta enzima, posiblemente el sensor de glucosa más relevante, depende de la glucosa disponible y tiene una K_m alta (10 veces más alta que en otros tejidos), por lo que su actividad es casi nula a niveles basales y aumenta ante un incremento en la concentración de glucosa. Además, y a diferencia de las demás isoformas presentes en los demás tejidos, la actividad de la GK no se inhibe por su producto, la G6P [46].

En 1993, German. S. describió cómo al sobreexpresar el gen de la glucoquinasa en células β aumentaba la actividad transcripcional del gen de la insulina en respuesta a altas concentraciones de glucosa. No ocurría lo mismo al sobreexpresar el gen del transportador de glucosa GLUT2. Contrariamente, una disminución en la fosforilación de glucosa causada por un descenso en la actividad de la glucoquinasa disminuía la actividad del promotor del gen de la insulina en respuesta a altas concentraciones de glucosa. Esto señala también la importancia de la fosforilación de glucosa para regular la tasa de catabolismo glucídico y, por tanto, la detección de los niveles de glucosa en las células β -pancreáticas [47]. A partir de la G6P se genera ATP, el cual provoca un incremento en los niveles de NADH-NADPH, incremento en calcio intracelular, cierre de los canales K^+ ATP, despolarización celular y secreción de insulina [48, 49].

Por otro lado, mutaciones en el gen de la glucoquinasa que reducen su funcionalidad en las células β provoca que la concentración de glucosa requerida para estimular la síntesis y secreción de insulina sea más alta y, por tanto, que los niveles basales de glucosa en ayuno sean más altos. Más concretamente, mutaciones en el gen que codifica para la glucoquinasa se han relacionado con diabetes *mellitus* tipo 2 [50, 51]. Con todo, esta enzima cataliza un paso limitante en el catabolismo glucídico y, por tanto, actúa como un sensor de glucosa.

1.1.4.4 *Detección de los niveles de glucemia por el intestino*

Ya que la ingesta de alimentos es la forma más inmediata de mantener la glucemia en respuesta a una bajada de los niveles de glucosa en sangre, tiene sentido que el intestino tenga un papel importante en la detección de los niveles de glucosa, aunque de la regulación de sus niveles se encarguen principalmente el hígado, el páncreas y otros tejidos.

Más concretamente, la vena porta recibe sangre de todo el intestino, por lo que ha sido el foco de múltiples investigaciones que han terminado concluyendo que la detección de los niveles de glucosa plasmática a nivel de la vena porta tiene un papel muy importante en la homeostasis glucídica [52, 53]. Además, esa detección se ve facilitada por la localización de las células enteroendocrinas, encargadas de liberar varias hormonas en respuesta a la presencia de alimentos mediante glucorreceptores [54] capaces de modular la actividad de neuronas del hipotálamo en áreas involucradas en el control de la ingesta y el metabolismo.

Prueba de esto último es la atenuación de los efectos de las hormonas intestinales liberadas en respuesta a la ingesta — como lo son la colecistoquinina [55], el péptido similar a glucagón 1 (GLP1), el péptido Y [56], e incluso la ingesta de alimentos inducida por ghrelina [57] — tras la alteración de las conexiones entre el tracto gastrointestinal y el sistema nervioso central.

1.1.5 Sistemas de regulación de la homeostasis glucídica

Las hormonas tienen un papel clave para mantener la estabilidad de los niveles de glucosa en sangre. Si las concentraciones de glucosa caen por debajo de un nivel crítico, entra en juego la conocida como respuesta contrarreguladora. Esta consiste en un conjunto de mecanismos fisiológicos que el cuerpo utiliza para contrarrestar esa disminución de los niveles de glucosa y, así, recuperar la homeostasis. Por otro lado, cuando las concentraciones de glucosa aumentan por encima del rango fisiológico basal, las células β del páncreas liberan insulina.

1.1.5.1 Adaptaciones metabólicas al ayuno

La respuesta contrarreguladora consiste en un sistema escalonado en el que entran en juego diferentes hormonas. Cuando los niveles de glucosa en sangre disminuyen por debajo del rango fisiológico, lo primero que ocurre es la disminución/cese en la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas [30, 58]. Cuando se alcanza un rango de 64-74 mg/dl se produce la liberación de glucagón por parte de las células α del páncreas. La liberación de glucagón es desencadenada por diferentes mecanismos. Entre ellos se incluyen el propio cese de la inhibición paracrina por parte de la insulina, y diferentes grupos neuronales tanto del hipotálamo como extrahipotalámicos, por un mecanismo dependiente en su mayor parte (75%-90%) de la activación del sistema nervioso simpático [59]. Esta activación tiene como consecuencia la liberación de catecolaminas, las cuales activan receptores β_2 -adrenérgicos de las células α para finalmente estimular la secreción de glucagón [30].

De forma similar, la activación de distintos grupos neuronales cuando se alcanzan hipoglucemias en el rango de 55-68 mg/dl provoca el aumento de los niveles de adrenalina/noradrenalina para revertir la hipoglucemia [30]. Por último, y en el marco de una hipoglucemia severa, especialmente si esta es mantenida en el tiempo, se producen

incrementos en los niveles de cortisol y GH que contribuyen a revertir la hipoglucemia de forma más retrasada en el tiempo. El incremento en los niveles de GH se cree que es mediado principalmente por el GHRH hipotalámico, mientras que el de cortisol puede ser mediado por activación del eje CRH-ACTH-cortisol, así como mecanismos ACTH independientes [30, 60].

1.1.5.1.1 Glucagón

El glucagón es una hormona peptídica de 29 aminoácidos secretada por las células α de los islotes de Langerhans del páncreas. La secreción de glucagón aumenta durante el estado de ayuno y durante el ejercicio [61]. Cualquier alteración genética que tenga como resultado la deficiencia de glucagón tiene como consecuencia una mejor tolerancia a glucosa y una menor expresión de genes gluconeogénicos, producción hepática de glucosa (HGP), y niveles de glucemia durante el ayuno [62]. Asimismo, la deficiencia de sus receptores a nivel sistémico tiene como resultado menores niveles de glucosa en sangre y mejor tolerancia a glucosa [63]. Esta mejora en la tolerancia a la glucosa es debida a un aumento en la sensibilidad a la insulina, como así lo demuestran estudios de clamps euglucémicos-hiperinsulinémicos [64]. Además, los ratones *knockout* del receptor de glucagón son resistentes a la obesidad inducida por dieta, y por tanto no desarrollan la característica resistencia a insulina ni la esteatosis hepática asociada, lo que se debe a una mejora en la sensibilidad a la insulina y a una menor producción hepática de glucosa [65]. De manera acorde, ratones *db/db* y ratas *Zucker* que carecen del receptor de glucagón específicamente en el hígado no desarrollan hiperinsulinemia ni hiperglucemia [66-68]. El glucagón actúa directamente en el hígado a través de su unión al receptor de glucagón (GCGR), el cual es un receptor acoplado a proteínas G localizado en las membranas plasmáticas de sus tejidos diana, principalmente el hígado, donde promueve la glucogenolisis y la gluconeogénesis [69], y secundariamente en el tejido adiposo, donde promueve la lipólisis.

A nivel molecular, la unión de la hormona al receptor activa a una proteína G estimuladora (Gs) que, a su vez, provoca la liberación de la subunidad α de la proteína Gs. Esta activa la adenilato ciclasa (AC), una enzima de la membrana celular, que convierte el ATP en AMPc (adenosín monofosfato cíclico) [70]. El AMPc funciona como segundo mensajero que transmite la señal intracelular del glucagón, y un aumento en sus niveles intracelulares tienen

como consecuencia la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). Esta proteína fosforila diversas proteínas y enzimas intracelulares involucradas en la gluconeogénesis hepática, fosforila y activa enzimas del metabolismo glucogenolítico, y suprime la expresión del gen de la piruvato quinasa (PK), enzima clave en la vía glucolítica [71].

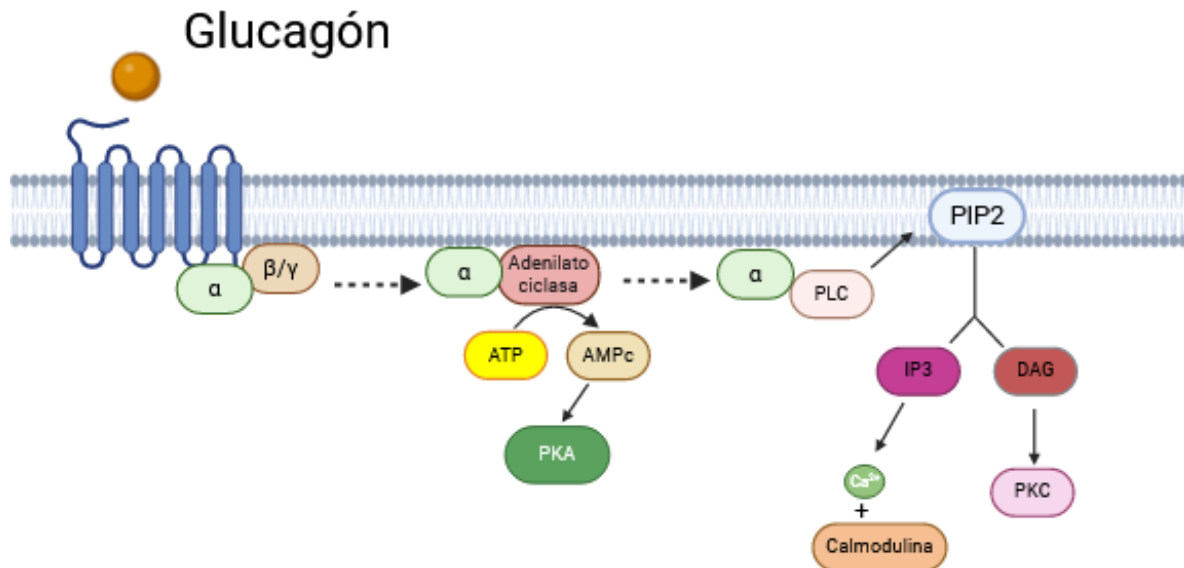


Figura 2. Representación esquemática de la vía de señalización del glucagón. Imagen de elaboración propia con Biorender.

1.1.5.1.2 Adrenalina

La adrenalina o epinefrina es una catecolamina producida por la médula de la glándula suprarrenal. Junto con el glucagón, la adrenalina participa en la respuesta rápida a la hipoglucemia y además comparte su misma vía de señalización a través de AMPc una vez se une a su receptor en cada tejido diana. Según el tejido, la adrenalina se une a un tipo diferente de receptor desencadenando una respuesta específica [72].

En el hígado y en el músculo esquelético, la adrenalina activa los receptores β 2-adrenérgicos, provocando la activación de PKA, que a su vez fosforila y activa a la enzima glucógeno fosforilasa (GP), promoviendo la glucogenolisis; y fosforila y activa a la enzima fosfofructoquinasa-2 (PFK-2), promoviendo la glucólisis. Tras la unión al receptor β -

adrenérgico, además de activar la adenilato ciclasa, la subunidad α s de la proteína G activa la fosfolipasa C (PLC). La activación de la PLC resulta en la hidrólisis del fosfolípido fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), generando inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ estimula la liberación de calcio (Ca^{2+}) almacenado en el retículo endoplasmático, lo cual promueve la contracción muscular, mientras que el DAG activa la proteína quinasa C (PKC), que inactiva la glucógeno sintasa. Además, el complejo calcio-calmodulina activa la fosforilasa quinasa y la proteína quinasa dependiente de calmodulina, lo cual activa la glucógeno fosforilasa e inactiva la glucógeno sintasa, respectivamente. Por tanto, el complejo calcio-calmodulina bloquea la síntesis de glucógeno y promueve su degradación. En el hígado además, también se une a receptores α 1-adrenérgicos para promover la gluconeogénesis hepática a través de la fosforilación de CREB por PKA [73-75].

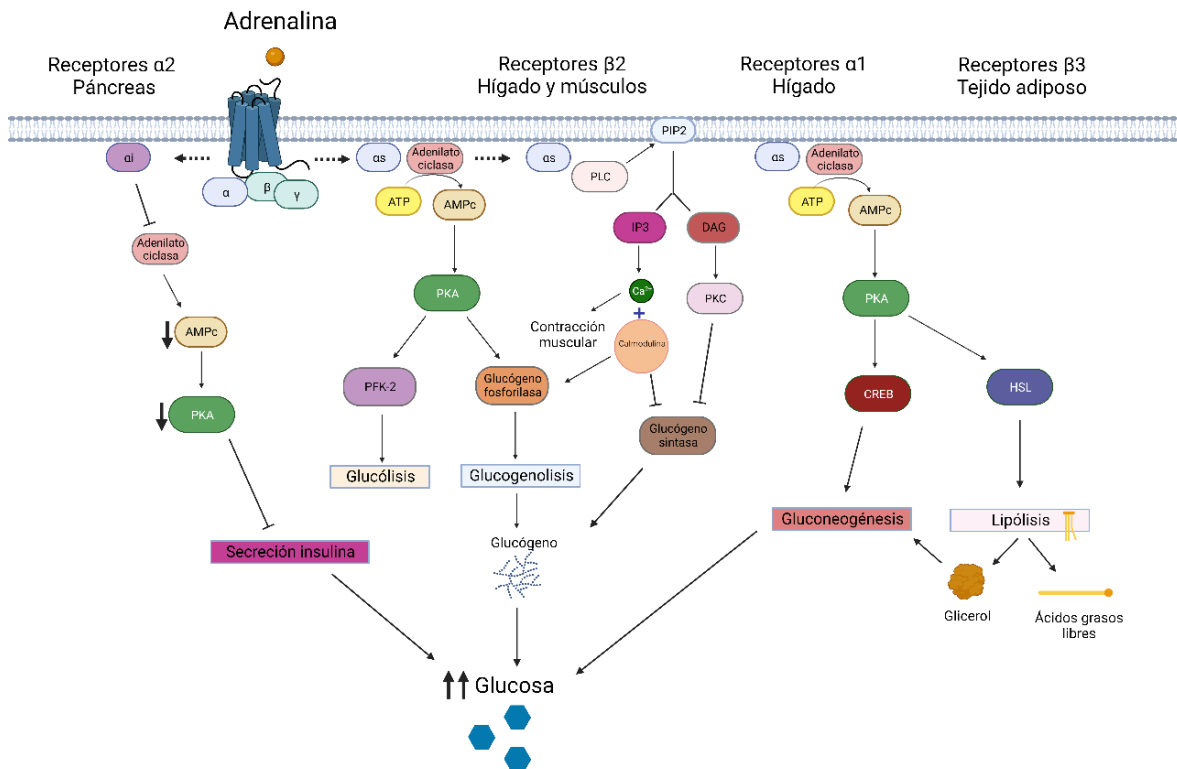


Figura 3. Representación esquemática de la vía de señalización de la adrenalina. Imagen de elaboración propia con Biorender.

Por último, la adrenalina afecta a la homeostasis glucídica no solo por sus efectos en el hígado y tejidos periféricos, sino también por alterar la secreción de insulina. Se ha descrito que la administración intravenosa de adrenalina provoca intolerancia a glucosa al alterar la sensibilidad a insulina hepática y periférica. Con ello, la adrenalina inhibe la liberación de insulina desde las células β -pancreáticas a través de receptores α_2 -adrenérgico, y con ello la captación de glucosa por los tejidos periféricos, con el fin de mantener la glucosa libre en la sangre [48, 49]. De hecho, se ha visto que los niveles de adrenalina y noradrenalina están elevados en pacientes diabéticos tipo 1 en el momento de su diagnóstico, y sus niveles se reestablecen a niveles basales tras el tratamiento con insulina [76].

Con todo, la unión de la adrenalina a cualquiera de sus receptores tiene como resultado la elevación de los niveles intracelulares de AMPc, que activa a PKA, la cual fosforila a diferentes proteínas teniendo como consecuencia final un aumento de los niveles de glucosa en sangre y la disponibilidad de sustratos que sirven como fuente de energía para suplir una mayor demanda energética como lo es el ejercicio, o una respuesta de lucha o huida [77].

1.1.5.1.3 Glucocorticoides

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas secretadas por la corteza de las glándulas suprarrenales, y son las encargadas, junto con la hormona de crecimiento, de la respuesta lenta a la hipoglucemia, cuando el estímulo del ayuno es persistente en el tiempo. En mamíferos, estos glucocorticoides son el cortisol, la cortisona y la corticosterona, aunque el cortisol es la forma biológicamente activa en humanos y la corticosterona en roedores. Aunque siempre se ha considerado al glucagón como la hormona con más poder inductor de la gluconeogénesis durante el ayuno, ratones adrenalectomizados presentan una capacidad gluconeogénica menor en situaciones de ayuno, un efecto que es restaurado tras la administración de glucocorticoides [78, 79].

Este conjunto de hormonas fomentan la acción del glucagón, ya que tienen la capacidad de estimular directamente la producción endógena de glucosa en el hígado [10, 80], pero también promueven el almacenamiento de glucógeno o glucogenogénesis en este órgano, estimulando la actividad de la glucógeno sintasa (GS). Indirectamente, los glucocorticoides también proveen de precursores gluconeogénicos promoviendo la degradación de proteínas

en el músculo esquelético para generar aminoácidos [81], y promoviendo la lipólisis en el tejido adiposo blanco, liberando glicerol y ácidos grasos [82].

Por otro lado, en el tejido adiposo blanco y en el músculo esquelético, disminuyen la utilización de glucosa antagonizando la acción de la insulina [83]. Todos estos efectos tienen como fin elevar los niveles de glucosa circulantes para estar disponibles en situaciones de estrés, pero una exposición crónica tienen un efecto contraproducente, causando hiperglucemia y resistencia a insulina [84, 85]. Contrariamente, alteraciones en la vía de señalización de los glucocorticoides desembocan en una mejora en la sensibilidad a insulina y en la utilización de glucosa en músculo esquelético, en modelos de ratón y humano. Coherentemente, los niveles de glucocorticoides están elevados en la sangre de ratones *ob/ob* y *db/db* comparado con ratones *wild type* (WT), de manera que estos ratones son resistentes a insulina [86, 87]. De hecho, ensayos de clamp euglicémico-hiperinsulinémico han demostrado que los glucocorticoides disminuyen la tasa de infusión de glucosa necesaria para mantener la normoglucemia, previenen la inhibición por la insulina de la producción endógena hepática de glucosa, e inhiben la utilización de glucosa en el músculo esquelético [88].

Por otro lado, los glucocorticoides regulan la liberación de glucagón e insulina desde el páncreas, aumentando los niveles de glucagón [85], e induciendo la hiperplasia de los islotes pancreáticos, lo cual da lugar a hiperinsulinemia [89].

A nivel molecular, su receptor, GR o NR3C1a, reside en el citoplasma unido a chaperonas Hsp90 hasta que su ligando, los glucocorticoides, se unen al receptor. Entonces, se transloca al núcleo, donde se une a elementos respuesta de glucocorticoides (GREs) para promover la transcripción de genes específicos.

1.1.5.1.4 Hormona de crecimiento y ghrelina

La hormona de crecimiento, GH, también conocida como somatotropina, es una hormona peptídica de 191 aminoácidos secretado por la hipófisis con un ritmo circadiano que da lugar a la secreción de más de la mitad de la secreción total durante la noche y que es desencadenada por la fase de ondas lentas del sueño [90]. Esta hormona aumenta directamente la producción de glucosa por el hígado al aumentar la disponibilidad de

sustratos (como lactato, glicerol y aminoácidos) y activar enzimas clave involucradas en este proceso. Por otro lado, la GH inhibe la captación de glucosa por los tejidos periféricos como el tejido muscular y el tejido adiposo, de manera que la sensibilidad a insulina de los tejidos periféricos disminuye desde las 2 hasta las 12 h tras la administración transitoria de esta hormona. En línea con esto, pacientes con acromegalia y, por tanto, altos niveles circulantes de esta hormona, presentan intolerancia a glucosa y una mayor resistencia a insulina [91]. Por otro lado, en contraste con el glucagón y la adrenalina, los cuales inhiben la acción de la insulina, el efecto inhibitorio de la GH sobre la insulina tarda varias horas en desarrollarse [92].

A nivel molecular, la GH se une a su receptor, GHR, en la superficie de sus células diana, entre las que se incluyen los hepatocitos y los adipocitos. Esta unión activa una cascada de señalización intracelular que involucra las quinasas Janus (JAK) y los factores de transcripción de transductores de señal y activadores de transcripción (STAT). Las proteínas JAK activadas se autofosforilan en residuos de tirosina en el dominio citoplasmático del receptor, y las proteínas STAT se unen al receptor fosforilado. Las quinasas JAK fosforilan a las proteínas STAT en residuos de tirosina y entonces se dimerizan y se translocan al núcleo de la célula. Dentro del núcleo, los dímeros STAT se unen a los elementos de respuesta de genes diana para estimular su transcripción [93]. Esto resulta en la síntesis de proteínas involucradas en el crecimiento y desarrollo celular, en la estimulación de la liberación de ácidos grasos desde el tejido adiposo, y en el aumento de la síntesis de glucógeno y la gluconeogénesis en el hígado. Finalmente, la señalización de la GH es regulada por retroalimentación negativa y está influenciada por otras hormonas, como la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1).

Además del efecto ejercido por la GH, estudios recientes han puesto de manifiesto que algunos efectos de la GH pueden ser mimetizados por la ghrelina, un secretagogo de la GH. La ghrelina es una hormona secretada por el estómago durante el ayuno que incrementa el apetito y la ingesta de alimentos, y que estimula la secreción de GH por la hipófisis. Aunque el papel de la ghrelina en la gluconeogénesis hepática no es tan directo como el de otras hormonas contrarreguladoras, la ghrelina puede influir en la regulación de la homeostasis glucídica mediante mecanismos indirectos, dado que la estimulación del apetito y la ingesta

de alimentos aumenta la disponibilidad de sustratos metabólicos. También regula la acción de hormonas contrarreguladoras como la GH y el glucagón, y algunas publicaciones recientes sugieren que la ghrelina puede reducir la sensibilidad a insulina, lo cual afecta a la captación de glucosa por los tejidos y aumenta la producción de glucosa por el hígado [94, 95]. Destacar, asimismo, que la ghrelina es sintetizada en el páncreas endocrino por las células ϵ [96].

Por último, destacar que tanto la GH como la ghrelina juegan un papel especialmente relevante en relación a la prevención de la hipoglucemia en ayuno en animales sometidos a restricción calórica parcial (60%). La adaptación al ayuno en estas condiciones está mediada por un marcado aumento de la GH plasmática, que es provocado a su vez por un aumento de la ghrelina plasmática. De esta manera, la instauración de la hipoglucemia es retrasada de forma muy marcada por la administración tanto de ghrelina como de GH, indicando que el efecto es mediado por GH. Además, se ha visto que ratones con silenciamiento hepático del receptor de GH exhiben una marcada hipoglucemia debido a una disminución de la producción de glucosa por el hígado, y una caída de triacilglicéridos hepáticos [97]. Sin embargo, en humanos, el efecto de la ghrelina no está tan claro, debido al efecto supresor de la insulina sobre la ghrelina con o sin hipoglucemia [30, 98].

1.1.5.2 Adaptaciones metabólicas a la hiperglucemia.

1.1.5.2.1 Insulina

Descubierta en 1921 por Banting y Best, la insulina es una hormona secretada por las células β del páncreas ante el aumento de los niveles de glucosa en sangre para disminuir sus niveles y devolverlos al estado normoglucémico.

Esta hormona se sintetiza a partir de un péptido precursor llamado preproinsulina que contiene tres segmentos: el péptido señal, la cadena A de insulina y la cadena B de insulina. La preproinsulina es dirigida al retículo endoplasmático, donde el péptido señal se escinde, dando lugar a la proinsulina. Esta consta de dos cadenas peptídicas, A y B, unidas por una región llamada péptido C, y se almacena en gránulos de secreción en el citoplasma de las células β . Antes de su liberación a la sangre, la proinsulina se convierte en insulina mediante la eliminación del péptido C [99].

En estado postprandial, la secreción de insulina tiene lugar en dos fases: una inicial rápida, de insulina previamente sintetizada y almacenada en vesícula citoplasmáticas de las células β , y una fase tardía donde la insulina es sintetizada *de novo* y que tiene lugar si los niveles de glucosa circulantes permanecen elevados en el tiempo [100]. Aunque la glucosa es el mayor estímulo de secreción de insulina, los niveles circulantes de aminoácidos (especialmente arginina, leucina y lisina), la acción de las hormonas gastrointestinales con efecto incretina como GLP-1 y GIP, y la estimulación por el sistema nervioso simpático a través del nervio vago también tienen un efecto en su síntesis y liberación [101].

La principal función de la insulina es regular el metabolismo glucídico, principal y directamente mediante la inhibición de la gluconeogénesis hepática, y secundaria e indirectamente actuando en el páncreas, el cerebro, el músculo y el tejido adiposo [102].

En primer lugar, la insulina inhibe directamente la gluconeogénesis al afectar a la transcripción de genes involucrados en el control gluconeogénico, como lo son PCK1 y G6Pasa [103], principalmente mediante la activación de la quinasa AKT, la cual fosforila e inactiva al factor de transcripción proteína Forkhead Box O1 (FoxO1) y a su coactivador PGC-1 α [104]. En condiciones de estrés celular, FoxO1 es activado por desacetilasas como la sirtuina 1 (SIRT1) y se une a los elementos respuesta de los genes diana gluconeogénicos [105, 106]. Al inhibir la actividad de FOXO1, la insulina reduce la expresión de genes que promueven la gluconeogénesis [107, 108]. De manera acorde con esto, ratones con una delección de FOXO1 específicamente en el hígado muestran niveles de glucosa en ayuno más bajos, mientras que cuando se expresa constitutivamente, los niveles de glucosa en ayuno aumentan [109, 110].

Además de inhibir directamente la producción de glucosa, la insulina también regula la homeostasis glucídica a través de mecanismos indirectos. En primer lugar, mediante la inhibición de la secreción de glucagón por las células α del páncreas, lo cual indirectamente conlleva la reducción de la producción hepática de glucosa al reducir la señalización del glucagón en el hígado [111, 112]. En segundo lugar, mediante la reducción de sustratos gluconeogénicos liberados desde el tejido adiposo y el músculo esquelético. Esto lo hace mediante la inhibición de la lipólisis (por tanto impidiendo la desintegración de los triglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol) y la proteólisis (impidiendo la liberación de

aminoácidos al torrente sanguíneo) en el tejido adiposo o en el músculo esquelético, respectivamente. Con ello, se ha visto que una reducción de los niveles de ácidos grasos libres en la sangre provoca una menor producción de glucosa por parte del hígado [113]. Otro modo mediante el cual la insulina reduce la disponibilidad de sustratos gluconeogénicos en circulación en la sangre es aumentando la captación de glucosa por los tejidos periféricos [114, 115], promoviendo el almacenamiento de triacilglicéricos (TAGs) en los adipocitos (lipogénesis) mediante la disminución de la actividad de la HSL y la inducción de enzimas lipogénicas; y el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en el hígado y en el músculo esquelético, por tanto estimulando la glucogenogénesis [10]. Esta acción la realiza mediante la estimulación de la enzima GS, clave para la síntesis de glucógeno, y mediante inhibición de la actividad de la GP, enzima responsable de la desintegración del glucógeno, por tanto evitando la liberación de glucosa [1, 116].

A nivel molecular, la vía de señalización de insulina se activa cuando esta se une a su receptor, IR, en la superficie de la membrana celular. Se trata de un receptor que es una proteína transmembrana con actividad tirosina quinasa que se activa al unirse el ligando. Esta activación resulta en la fosforilación de residuos de tirosina en el propio receptor de insulina. Los sustratos del receptor de insulina (IRS) son proteínas adaptadoras que se fosforilan en residuos de tirosina en respuesta a la activación del receptor, y su fosforilación proporciona sitios de unión para otras proteínas señalizadoras, como la proteína fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que convierte el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol 2,4,5-trifosfato (PIP3). Este último permite que la proteína quinasa-1 dependiente de la proteína quinasa 1 de la piruvato deshidrogenasa (PDK1) se una y fosforile a la proteína quinasa dependiente de proteína quinasa B (PKB/AKT), activándola y permitiendo su translocación del citoplasma al núcleo [117, 118]. AKT activado puede fosforilar y modular la actividad de varios factores de transcripción como FOXO1 que, en asociación con el coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PGC1 α), promueve la transcripción de G6Pasa y PCK1. AKT también inhibe la glucogenolisis y promueve la glucogenogénesis mediante la activación de GK y la fosforilación e inactivación de GSK3 [119].

Además de la vía PI3K-AKT, la insulina puede activar la vía de la proteína quinasa por mitógenos (MAPK), que está implicada en la proliferación celular y la diferenciación, y la vía de señalización de mTOR (objeto de la rapamicina en mamíferos). En el caso de la vía de las MAPK, la unión de la insulina a su receptor provoca la fosforilación del mismo en lugares que sirven de sitios de unión para proteínas adaptadoras como SHC que reclutan proteínas como GRB2 (factor de unión a *Son of Sevenless* homólogo 1). GRB2 se asocia con SOS (*Son of Sevenless*), dando lugar a la activación de RAS. La activación de RAS activa la cascada de quinasas RAF, MEK (MAP quinasa activada por mitógenos) y ERK (quinasa regulada por señales extracelulares). ERK activada se transloca al núcleo, donde fosforila factores de transcripción y modula la expresión de genes implicados en vías de proliferación celular, diferenciación, y otros procesos celulares [117, 118].

Es importante señalar que la función de AKT en el núcleo es solo una pequeña parte de su función en la célula, ya que su actividad en otras partes de la célula como el citoplasma o la membrana plasmática, donde aumenta la translocación de transportadores de glucosa (como GLUT4), es esencial para llevar a cabo sus diversas funciones en la regulación del metabolismo y el crecimiento o supervivencia celular.

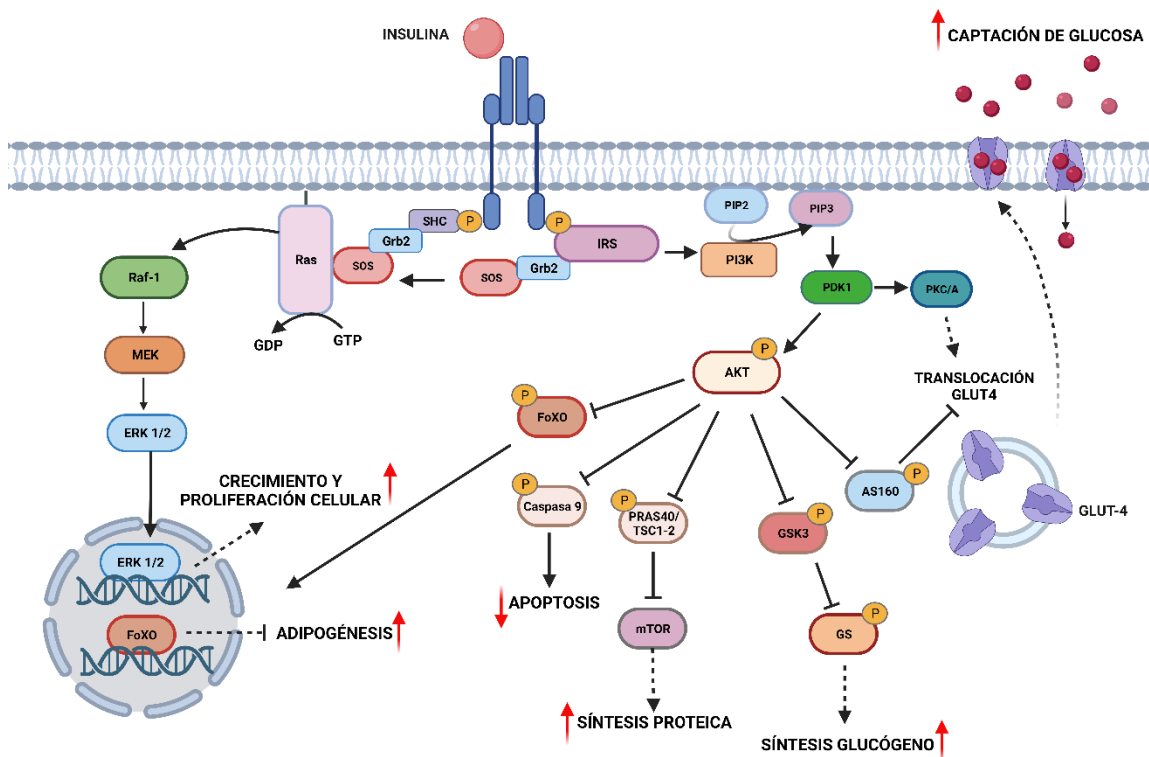


Figura 4. Representación esquemática de la vía de señalización de la insulina. Imagen de elaboración propia con Biorender.

La regulación de la vía de señalización de insulina está altamente regulada y coordinada, y su disfunción puede contribuir a trastornos metabólicos como la resistencia a insulina y la diabetes tipo 2.

Por otro lado, como ya se ha mencionado anteriormente en esta sección, pese a que la insulina es la principal hormona encargada de disminuir los niveles circulantes de glucosa, su acción se ve reforzada con la actuación de otras hormonas importantes como son la amilina y las incretinas.

1.1.5.2.2 Amilina

La amilina, también conocida como polipéptido amiloide tipo 1, es una hormona peptídica que se produce y secreta junto con la insulina (en una ratio 20:1 insulina-amilina) en las

células β -pancreáticas. Esta hormona es sintetizada a partir del mismo precursor de la insulina: la proinsulina.

Una vez liberada en el torrente sanguíneo, la amilina trabaja en coordinación con la insulina para mantener la homeostasis glucémica, principalmente de dos maneras: ralentizando la velocidad de vaciado gástrico, en especial los carbohidratos, para evitar picos de glucemia tras las comidas, e inhibiendo la liberación de glucagón. Además, se ha descrito que la amilina tienen un papel en el control de la ingesta y peso corporal, reduciéndolos [101, 120].

1.1.5.2.3 *Incretinas*

El término incretinas se refiere al poder de ciertas moléculas de estimular o incrementar la secreción de insulina en respuesta a la ingesta de alimentos. Este efecto fue descrito por primera vez en 1967, por Perley y Kipnis, cuando observaron que la ingesta de alimentos producía un aumento de insulina superior al de la infusión directa de glucosa intravenosa [121]. Para poner de relevancia la contribución de las incretinas, señalar que estas contribuyen en un 50% al total de insulina secretada después de una comida [122].

Los dos péptidos más importantes y estudiados en el contexto de la homeostasis de la glucosa son los péptidos intestinales GLP-1 y GIP.

GIP

El polipéptido inhibidor gástrico (GIP, por sus siglas en inglés), también conocido como polipéptido insulínótropo dependiente de glucosa, fue la primera incretina descrita, en 1971 por Brown y Dryburgh, y es sintetizada en las células K del intestino delgado, principalmente en el duodeno y el yeyuno, en respuesta a la ingesta de alimentos, especialmente carbohidratos y grasas [123].

Una de las principales acciones del GIP es estimular la secreción de insulina (efecto insulínótropo) ante el aumento de los niveles de glucosa, mediante la unión a su receptor (GIPR) localizado en las células β -pancreáticas. Además de estimular la secreción de insulina, el GIP puede tener un efecto directo sobre la captación de glucosa en tejidos periféricos, como el músculo y el tejido adiposo, ayudando así a disminuir los niveles de glucosa en sangre; y en la regulación de la secreción de ácido gástrico en el estómago, lo que

puede tener implicaciones en la digestión y absorción de nutrientes, y razón por la cual GIP debe su nombre. Además de sus efectos en el metabolismo glucídico, GIP también tiene un papel importante en el metabolismo lipídico, favoreciendo la lipogénesis al estimular la síntesis de triglicéridos y reduciendo la lipólisis en el tejido adiposo. Finalmente, GIP es degradado por la dipeptidil peptidasa-4 (DPP4) [122].

En resumen, el GIP es una hormona incretina que juega un papel importante en la regulación de la glucemia al estimular la secreción de insulina y, posiblemente, al facilitar la captación de glucosa en los tejidos. Sin embargo, a diferencia del GLP-1, el GIP no tiene un efecto claro en la inhibición de la liberación de glucagón. Ambas hormonas incretinas, junto con otros factores, contribuyen al control de los niveles de glucosa en sangre en respuesta a la ingesta de alimentos.

GLP-1

Catorce años más tarde, en 1985, Schmidt y colaboradores describieron el Péptido 1 Similar al Glucagón (GLP-1, por sus siglas en inglés), una hormona secretada principalmente por las células L del intestino delgado en respuesta a la ingesta de alimentos. El GLP-1 tiene un papel fundamental en la regulación de la glucemia a través de varios mecanismos: en primer lugar, mediante la estimulación de la secreción de insulina por parte de las células β ante un estímulo de aumento en los niveles de glucosa en sangre [124]. Este efecto insulínico se alcanza mediante la unión de GLP-1 a su receptor específico (GLP-1R), que está acoplado al aumento de los niveles intracelulares de AMPc y Ca^{2+} en las células β [122]. En segundo lugar, mediante la inhibición de la secreción de glucagón por parte de las células α -pancreáticas, contribuyendo así a que los niveles de glucemia no se disparen y manteniéndolos en un rango normoglucémico [125]. Además de eso, GLP-1 tiene un papel ralentizando el vaciado gástrico, disminuyendo la ingesta [126], y ralentizando la tasa de producción de glucosa endógena [127]. Al igual que GIP, GLP-1 es susceptible a la degradación enzimática por la DPP-4, la cual lo convierte en una forma biológicamente inactiva.

Por último, también en comparación con GIP, mientras que GIP es la incretina con un efecto más potente, el GLP-1 es liberado en mayores concentraciones y es fisiológicamente más importante en humanos [128].

Debido a sus efectos beneficiosos en la regulación de la glucemia, el GLP-1 ha sido un objetivo importante en el desarrollo de medicamentos para tratar la diabetes tipo 2, de manera que los análogos de GLP-1 se utilizan en el tratamiento de esta enfermedad. También se han desarrollado inhibidores de la DPP-4, que prolongan la acción del GLP-1 endógeno [129-131].

1.1.6 Mecanismos hepáticos para mantener la normoglucemia

Como hemos visto, la capacidad única del hígado de almacenar y liberar glucosa le posiciona como un órgano fundamental en la regulación de la homeostasis de la glucosa, integrando las diferentes señales periféricas y actuando como un centro de coordinación de los diferentes tejidos (incluidos el cerebro, el músculo esquelético y el tejido adiposo), adaptando su metabolismo a las necesidades sistémicas. Estas adaptaciones metabólicas son llevadas a cabo mediante cuatro procesos principales que tienen lugar en este órgano: la glucogenogénesis, la glucogenolisis, la glucólisis y la gluconeogénesis. El control alostérico por varios intermediarios metabólicos, así como modificaciones postraduccionales de estas enzimas constituyen el mayor punto de control de estas vías, y la expresión controlada de los genes que codifican estas enzimas es crítica mediando la regulación a largo plazo de estas vías metabólicas.

Cuando la concentración de glucosa en sangre aumenta, los sensores de glucosa hepática inducen respuestas adaptativas para inclinar el balance hacia el consumo de glucosa y almacenamiento a nivel hepático. En el caso opuesto, cuando la concentración de glucosa en sangre disminuye, tanto la gluconeogénesis como la glucogenolisis contribuyen a recuperar la homeostasis. Durante cortos períodos de ayuno, la glucogenolisis es la fuente predominante de glucosa liberada a la circulación. Sin embargo, durante períodos de tiempo más largos, las reservas de glucógeno se agotan y entonces la gluconeogénesis se convierte en la principal fuente de glucosa para el cuerpo.

1.1.6.1 *Utilización de glucosa en el hígado: glucólisis*

En la mayoría de los tejidos, el catabolismo de la glucosa a piruvato, denominado glucólisis, supone la principal ruta metabólica para la obtención de ATP. En estado postabsortivo donde la glucosa es abundante, tiene lugar este proceso, dando lugar a intermediarios y productos que son utilizados para la síntesis de lípidos, aminoácidos y otras moléculas importantes con el objetivo final de ser oxidados para generar ATP. En estado de ayuno donde los niveles de glucosa son bajos, por tanto, los hepatocitos cambian su fuente de energía hacia la oxidación de ácidos grasos o β -oxidación para cubrir la demanda energética. De esta manera, en estado postprandial, el hígado contribuye activamente a la tolerancia a la glucosa para así reducir los niveles de glucosa en sangre al aumentar su captación y catabolismo [132].

La glucosa entra en los hepatocitos a través de transportadores GLUT2, los cuales son transportadores pasivos (no requieren energía) y bidireccionales (importan y exportan glucosa). Una vez en el citoplasma, la glucosa es fosforilada por la enzima glucoquinasa (GK, o hexoquinasa IV). En los hepatocitos, esta enzima no se inhibe alostéricamente por su producto, la glucosa 6-fosfato (G6P), permitiendo así que el hígado pueda importar y utilizar la glucosa de forma continuada en condiciones de hiperglucemia [133]. En este punto, y según el estado energético del organismo, la vía se puede dirigir hacia una vía catabólica (glucólisis) o hacia una vía anabólica (glucogenogénesis), ya que una síntesis elevada de G6P activa alostéricamente a la GS, mientras que inhibe la GP [134, 135]. De este modo, cuando la demanda energética es elevada, como durante el ejercicio, el organismo favorece la glucólisis para utilizar la glucosa como fuente de energía y obtener ATP. El hecho de que la GK sea la enzima que actúa de nexo entre estos dos procesos la posiciona como una diana directa de control por parte de las hormonas contrarreguladoras, principalmente de la insulina y el glucagón, quienes la activan e inhiben, respectivamente [44, 136]. La ruta de las pentosas fosfato representa una tercera ruta de utilización de G6P que implica la producción de ribosa-5-fosfato, un intermediario de la síntesis de nucleótidos, y la coenzima nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) que aporta poder reductor necesario para la síntesis de nucleótidos y de otras moléculas.

Al final de la glucólisis, una molécula de glucosa se ha descompuesto en dos moléculas de piruvato, dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADPH. El piruvato producido por la

glucólisis en el citosol se transporta hasta la matriz mitocondrial, donde se descarboxila a acetil-coenzima A (acetil-CoA) por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH), que posteriormente ingresa al ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), donde se conjuga con oxalacetato, dando lugar a citrato. El ciclo de Krebs genera energía en forma de guanosina trifosfato, GTP (que es equivalente al ATP), y NADH y FADH₂, que se acoplan a la cadena de la fosforilación oxidativa para generar, a través de un gradiente de protones, más ATP. En determinados casos, como en los glóbulos rojos, que carecen de mitocondrias, o en condiciones de isquemia, el piruvato no se transporta hasta la matriz mitocondrial, sino que se convierte a lactato en el citosol, para regenerar los niveles de NAD⁺, necesarios para la generación de ATP por el proceso denominado glucólisis anaerobia [133, 137].

El TCA funciona como un centro metabólico central que participa tanto en la producción de energía como en la síntesis de biomoléculas. Para mantener los intermediarios del ciclo del TCA a un nivel constante, las reacciones que extraen los metabolitos del TCA para la biosíntesis (reacciones catapleróticas) se equilibran con aquellas que reponen los intermediarios del TCA (reacciones anapleróticas) [138]. En el ciclo del TCA, el acetil-CoA se metaboliza para generar equivalentes reductores utilizados para producción de ATP mediante fosforilación oxidativa. Los intermediarios del ciclo del TCA también sirven como precursores de aminoácidos no esenciales, que sirven como sustratos para la síntesis de proteínas. El citrato producido en el ciclo del TCA se transporta en parte desde las mitocondrias al citosol, donde se convierte en oxalacetato y acetil-CoA, el último de los cuales puede usarse como sustrato para la síntesis de lípidos. De hecho, la capacidad de oxidar los carbohidratos de la dieta es limitada y, cuando se excede, la glucosa adicional se redirige hacia la síntesis de ácidos grasos mediante lipogénesis, proceso promovido por la insulina e inhibido por el glucagón [139]

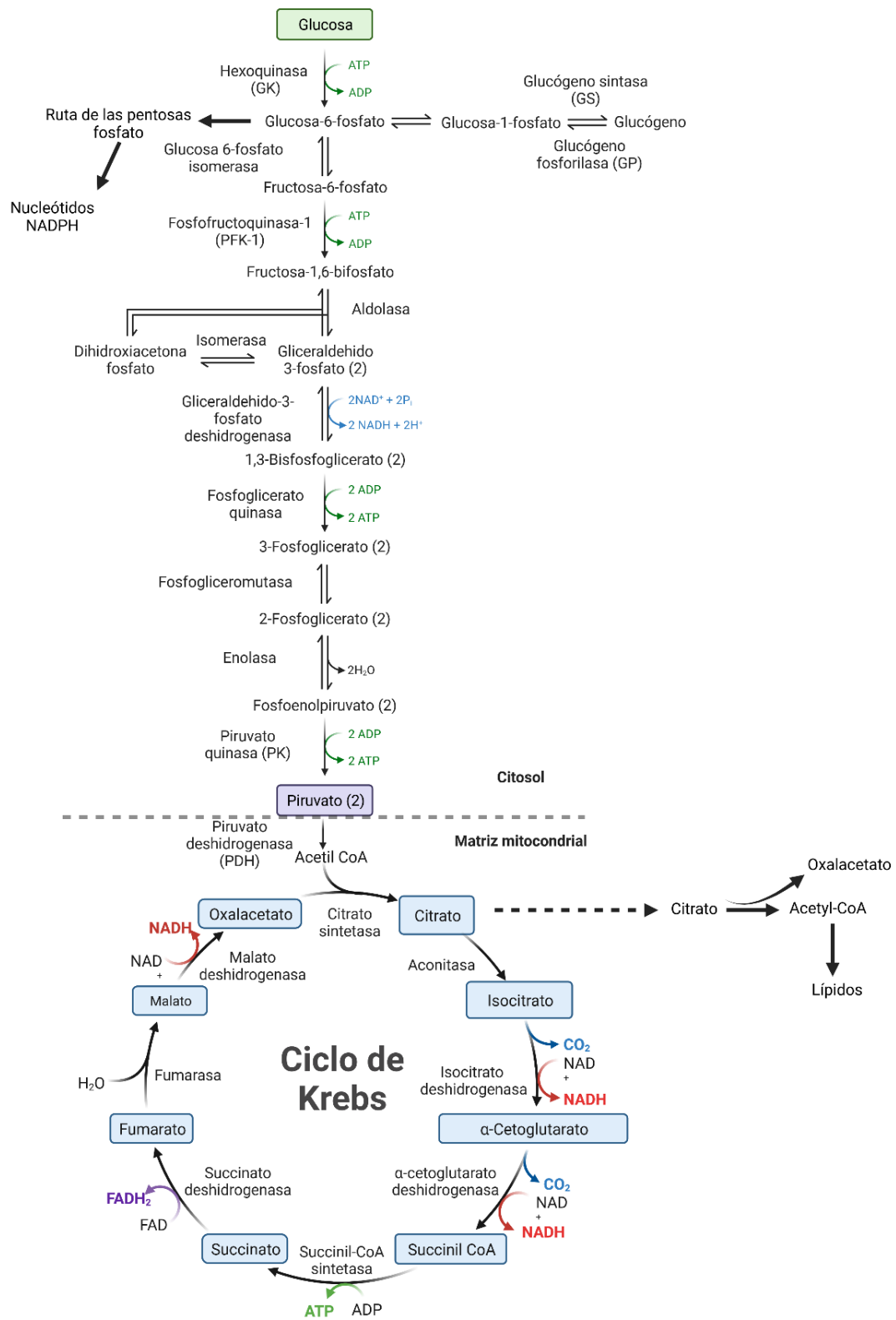


Figura 5. Representación esquemática de la glucólisis y el ciclo de Krebs. Imagen de elaboración propia con Biorender.

1.1.6.1.1 Regulación alostérica y endocrina de la glucólisis

En cuanto a la regulación de la glucólisis, las principales enzimas limitantes de este proceso son la GK, que convierte glucosa en glucosa 6-fosfato; fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), que convierte fructosa 6-fosfato (F6P) en fructosa 1,6-bifosfato (F1,6P); y la piruvato quinasa (L-PK), que convierte fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato en el hígado. Estas enzimas están estrechamente reguladas alostéricamente y por modificaciones postraduccionales, promovidas tanto por insulina como por el glucagón, que hacen que aumenten o disminuyan su actividad, respectivamente [137].

La GK está presente en el hígado y en las células β -pancreáticas, funcionando como sensor de glucosa, tal como se describió en apartados anteriores. En condiciones de baja disponibilidad de glucosa, la proteína reguladora de glucoquinasa (GKRP), se une a GK, promoviendo la translocación nuclear de este complejo. A medida que los niveles de glucosa aumentan, la F6P compite por esta unión, lo que conlleva que GKRP se libere de la GK, permitiendo que la enzima se active y comience a metabolizar glucosa [140].

PFK-1 fosforila la F6P, convirtiéndola en F1,6P. Esta enzima se inhibe alostéricamente por ATP y citrato, los cuales son signos de alto nivel energético, y se activa por ADP, AMP y fructosa 2,6-bifosfato (F2,6-BP). Este último es generado a partir de la F6P mediante la fosforilación por el dominio quinasa (PFK-2). Se ha visto que la activación de PKA mediada por glucagón es quien fosforila e inactiva la porción quinasa de esta enzima [141].

La actividad de L-PK se regula a nivel alostérico y mediante modificaciones postraduccionales. A nivel alostérico, es activada por F1,6P e inhibido por ATP, acetyl-CoA, y ácidos grasos de cadena larga, todos ellos indicadores de alta disponibilidad energética. Además, la alanina inhibe su actividad. Por otro lado, L-PK es inhibida por PKA tras la activación de esta última por el aumento de los niveles de AMPc estimulada por el glucagón durante el ayuno. En contraposición, en condiciones de disponibilidad de nutrientes, la liberación de insulina favorece la desfosforilación y activación de esta enzima [137].

1.1.6.1.2 Regulación transcripcional de la glucólisis

En este apartado cabe señalar a la proteína 1c de unión al elemento regulatorio de esteroides (SREBP-1c) y a la proteína de unión al elemento respuesta de carbohidratos (ChREBP), las

cuales no solo activan genes que codifican para enzimas glucolíticas, sino que además codifican para genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos (FAS y ACC), y formación de triacilglicerol (GPAT y DGAT2) [133].

SREBPs (SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2) son los mayores reguladores del metabolismo lipídico en mamíferos. Particularmente, SREBP-1c activa genes que codifican para enzimas de la ruta lipogénica (FAS, ACC) y la GK, enzima del primer paso de la glucólisis. De hecho, los ratones *knockout* de SREBP1c en el hígado muestran una activación deficiente de genes lipogénicos ante una dieta rica en carbohidratos, demostrando la importancia de este factor de transcripción en la regulación de la glucólisis hepática y la biosíntesis de ácidos grasos [142]. Además SREBP-1c está principalmente regulada a nivel transcripcional por la insulina, mientras que a nivel postraducciona, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y la quinasa inducible por sal (SIK) disminuyen su actividad [133].

ChREBP se expresa en tejidos con gran capacidad lipogénica, como el hígado, el tejido adiposo marrón, el tejido adiposo blanco, el intestino delgado y los riñones. Los niveles de ChREBP se ven incrementados en el hígado de ratones alimentados con una dieta rica en carbohidratos [143]. A nivel postraducciona, en condiciones de ayuno, PKA y AMPK fosforilan ChREBP, inhibiendo su actividad. Sin embargo, en condiciones de alta disponibilidad energética, la proteína fosfatasa 2A (PP2A) desfosforila esta proteína, activando su actividad transcripcional y promoviendo la transcripción de genes lipogénicos. Los ratones *knockout* de ChREBP muestran unos niveles reducidos de triacilglicerol y baja expresión de genes lipogénicos. Curiosamente, en estos ratones se observó un aumento en los almacenes de glucógeno probablemente como un mecanismo compensatorio alternativo a los triacilglicéridos mediante el cual almacenar energía [133, 144].

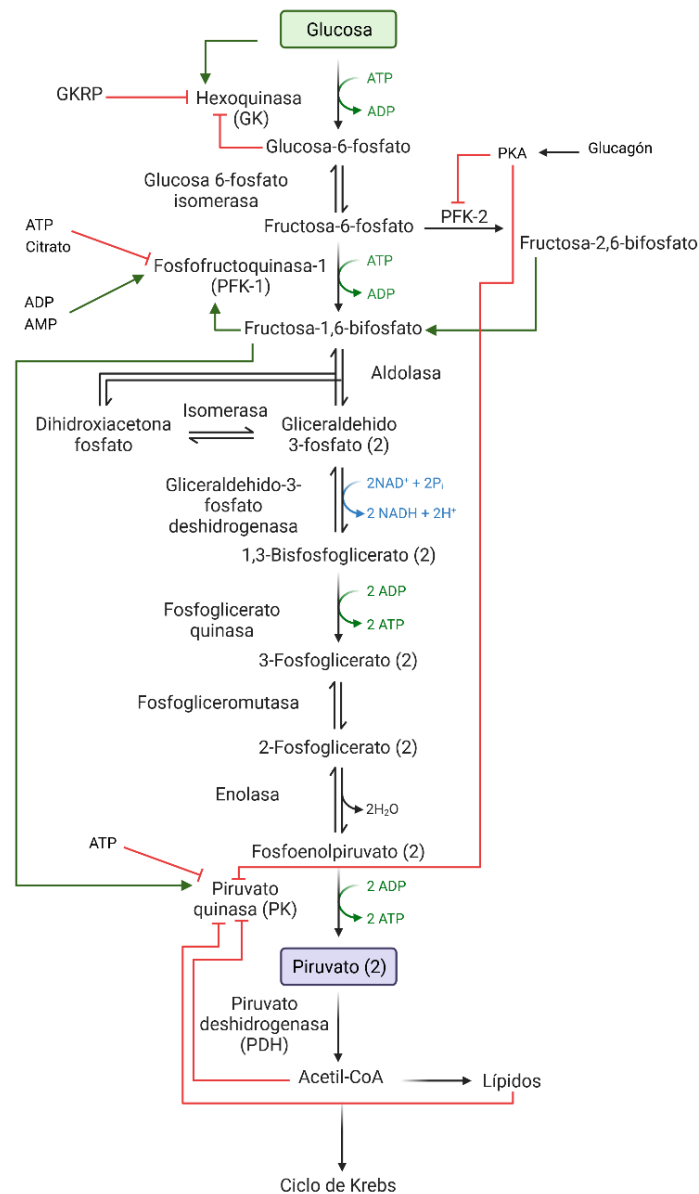


Figura 6. Representación esquemática de la regulación de la glucólisis. Las flechas rojas indican inhibición, mientras que las flechas verdes indican activación. Imagen de elaboración propia con Biorender.

1.1.6.2 Almacenamiento de glucosa en el hígado: glucogenogénesis

Como se mencionó anteriormente, la G6P puede desviarse hacia la síntesis de glucógeno, el cual supone un almacén de glucosa importante en estado de ayuno. El exceso de glucosa proveniente de la dieta que no se almacena como glucógeno se convierte en grasa mediante lipogénesis *de novo* en el hígado [145].

A nivel molecular, la G6P es isomerizada en glucosa 1-fosfato (G1P) por la enzima fosfoglucomutasa (PGM-1), y entonces es convertida por la enzima glucuroniltransferasa (UGT) en UDP-glucosa, que es el precursor del glucógeno. La glucogenina (GYG1/2) inicia la síntesis de glucógeno por autoglucosilación, transportando residuos de glucosa desde la UDP-glucosa hacia sí misma, formando una cadena corta linear de aproximadamente 10-20 residuos de glucosa. La GS es la enzima más importante en este proceso, ya que permite la elongación de las cadenas de glucógeno, catalizando la transferencia del residuo de glucosa de la UDP-glucosa al extremo no reductor de la cadena de glucógeno preexistente, mediante un enlace α 1-4 glucosídico [139].

1.1.6.2.1 Regulación de la glucogenogénesis

La activación de la GS, enzima clave de la glucogenogénesis, y la inhibición de la GP, la enzima clave de la glucogenolisis, son los dos procesos clave que regulan la formación de glucógeno. Las dos son alostéricamente reguladas por G6P, el precursor del glucógeno, de manera que la G6P activa alostéricamente a la GS, mientras que inhibe la GP [134, 135].

La actividad de ambas enzimas es también regulada por modificaciones postraduccionales. La fosforilación de la GS, principalmente por la enzima glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), inhibe la actividad de la enzima. En contraste, la fosforilación de la GP aumenta su actividad. Tanto la GS como la GP son susceptibles de desfosforilación por la proteína fosfatasa 1 (PP1). Se ha visto que tanto la glucosa como la insulina aumentan la actividad de PP1, mientras que el glucagón y la epinefrina han sido relacionados con su inactivación [133].

Con todo, en condiciones de ayuno, la GSK-3 desfosforilada y activa, fosforila e inactiva a la GS, llevando a la inhibición de la síntesis de glucógeno hepático. Sin embargo, en estado postprandial, la insulina secretada por las células β -pancreáticas estimula la GS mediante la activación de AKT, que fosforila e inactiva a GSK-3, por tanto, aumentando la síntesis de glucógeno. Además, la insulina también estimula la acetilación de la GP, lo cual promueve su desfosforilación e inhibición por la PP1, inhibiendo así la glucogenolisis [146]; y estimula la expresión de la GK, lo cual indirectamente aumenta la captación de glucosa por los hepatocitos al aumentar la fosforilación de la glucosa y generar G6P [147]. Por tanto, de manera indirecta, estimula la glucogenogénesis al aumentar los niveles de G6P.

Por otro lado, la secreción de glucagón y catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), activan a PKA mediante el aumento de los niveles intracelulares de AMPc. PKA fosforila y activa entonces la GP. El glucagón también inhibe la acetilación de la GP, lo cual disminuye la habilidad de la PP1 de unirse a la GP, y por tanto disminuye su capacidad de desfosforilación e inactivación de esta enzima [146].

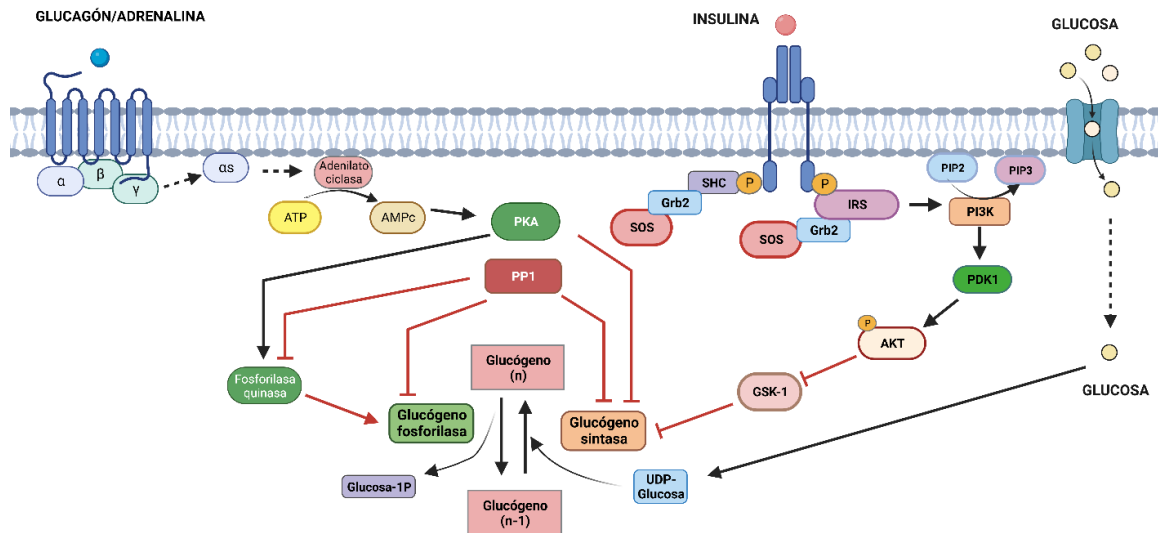


Figura 7. Representación esquemática de la regulación de la glucogenogénesis y glucogenólisis. Imagen de elaboración propia con Biorender.

1.1.6.3 Producción endógena de glucosa

Durante el estado de ayuno, la combinación de altos niveles de glucagón y bajos niveles de insulina incrementa la producción hepática de glucosa para responder a las demandas energéticas de los tejidos periféricos. El hígado contribuye a la producción endógena de glucosa mediante dos vías de producción de G6P. En la fase postabsortiva inicial, es decir, durante períodos cortos de ayuno, la G6P hepática deriva de la lisis del glucógeno (glucogenólisis). Sin embargo, a medida que el ayuno se prolonga en el tiempo, los depósitos de glucógeno se van agotando, y entonces la G6P proviene de la síntesis *de novo* (gluconeogénesis). Se considera que los depósitos de glucógeno contribuyen a la producción endógena de glucosa durante 10-12h en roedores y 20h en humanos.

La degradación de glucógeno en el citosol de los hepatocitos se lleva a cabo por la acción de dos enzimas: la GP y la enzima desramificadora de glucógeno (AGL). La GP libera glucosa-1-fosfato de la cadena lineal de glucógeno, mientras que la AGL separa o desramifica las diferentes cadenas de glucógeno.

Regulación de la glucogenolisis

La GP es activa cuando es fosforilada en el residuo de serina 14. El glucagón y la adrenalina, que incrementan los niveles intracelulares de AMPc, promueven la activación de la PKA, que fosforila y activa a GP, desencadenando de este modo la glucogenolisis. La AGL es la enzima encargada de la desramificación del glucógeno, es decir, la enzima encargada de eliminar las ramificaciones de una cadena de glucógeno, convirtiendo las ramas en cadenas lineales, lo que facilita su posterior degradación y liberación de glucosa. La regulación de la AGL se ve afectada por la PKA activada tras la unión del glucagón a su receptor, de manera que PKA fosforila y activa la AGL. La deficiencia congénita de la GP causa la enfermedad de Hers, que se caracteriza por la incapacidad de movilizar glucosa a partir del glucógeno en respuesta a ayuno o a glucagón [148], mientras que la deficiencia de la AGL provoca la enfermedad de Cori-Forbes, que se caracteriza por la acumulación excesiva de glucógeno en los tejidos afectados, entre ellos el hígado, el corazón y el músculo esquelético [149].

El resultado final de la glucogenolisis es la liberación de glucosa-1 fosfato a partir del glucógeno almacenado. Esta se convierte en glucosa-6 fosfato, que luego se hidroliza en glucosa y P_i mediante la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). En este punto, hay que señalar que el almacenamiento de glucógeno es una especificidad del hígado entre los órganos gluconeogénicos, ya que el riñón y el intestino delgado son incapaces de realizar la síntesis de glucógeno en condiciones fisiológicas [150]. Además, aunque el tejido muscular sí tenga la capacidad de sintetizar glucógeno, la glucosa liberada tras la glucogenolisis no puede ser liberada a la circulación y por tanto ser utilizada por otros tejidos, ya que el músculo no posee la G6Pasa que desfosforila la G6P. Por tanto, la G6P queda retenida en el tejido muscular y solo puede ser derivada hacia glucólisis para así obtener energía para su propio funcionamiento [151].

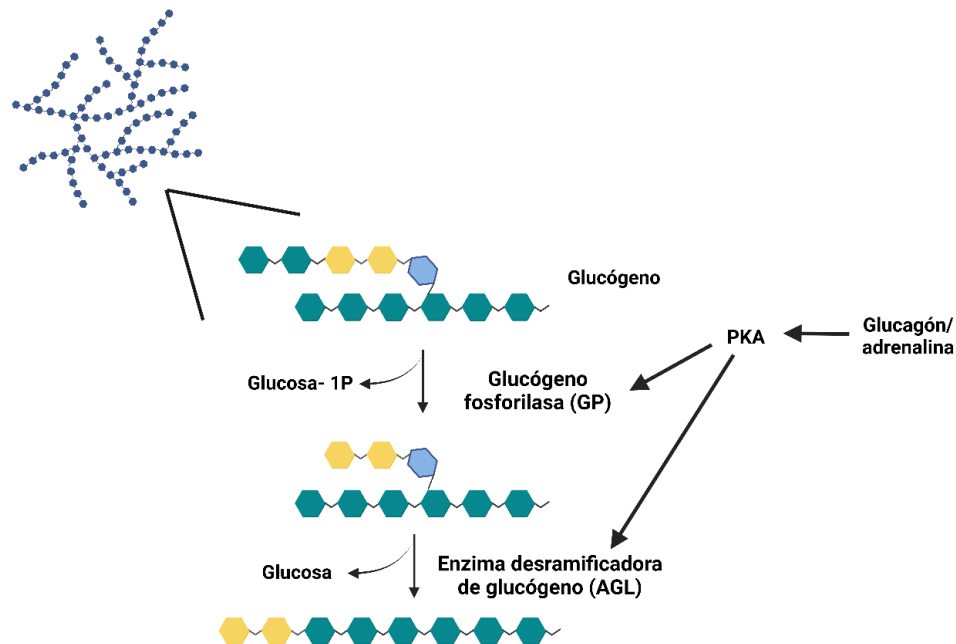


Figura 8. Representación esquemática de glucogenólisis y sus enzimas implicadas. Imagen de elaboración propia con Biorender.

Ciclo de Cori

Debido a que el músculo no posee la enzima G6Pasa que permita la liberación de la glucosa al torrente sanguíneo, en condiciones donde el requerimiento de glucosa por parte del músculo (por ejemplo, durante un ejercicio de alta intensidad) sea alto, existe el denominado Ciclo de Cori. Este consiste en la circulación cíclica de glucosa y lactato entre el hígado y el músculo. En estas condiciones de alta intensidad, el glucógeno muscular se desdobla a glucosa y, mediante glucólisis anaerobia (fermentación), la enzima lactato deshidrogenasa convierte el piruvato en lactato. El lactato viaja hasta el hígado a través del sistema circulatorio, y ahí se convierte de nuevo en glucosa a través de la gluconeogénesis. Esta glucosa retorna a la circulación y es llevada de nuevo al músculo. De esta manera, la célula muscular obtiene ATP de manera inmediata pese a las condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, evitando la acidosis láctica, y se regenera el NAD^+ para que pueda continuar la glucólisis.

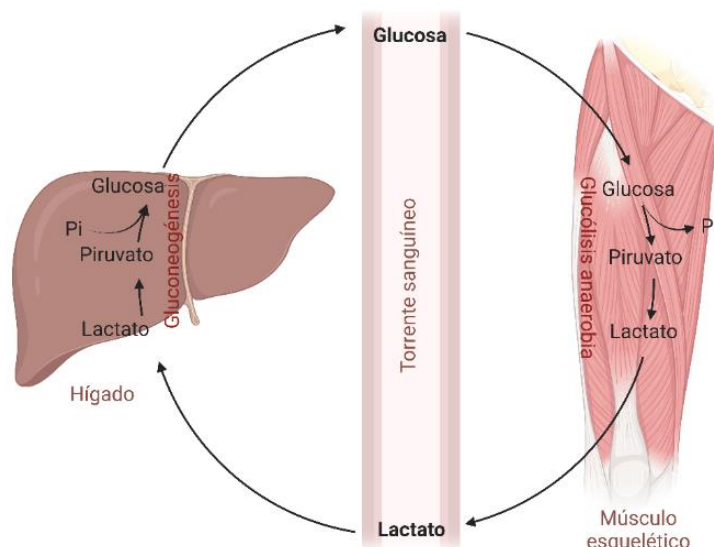


Figura 9. Representación esquemática del ciclo de Cori entre el hígado y el músculo. Imagen de elaboración propia con Biorender.

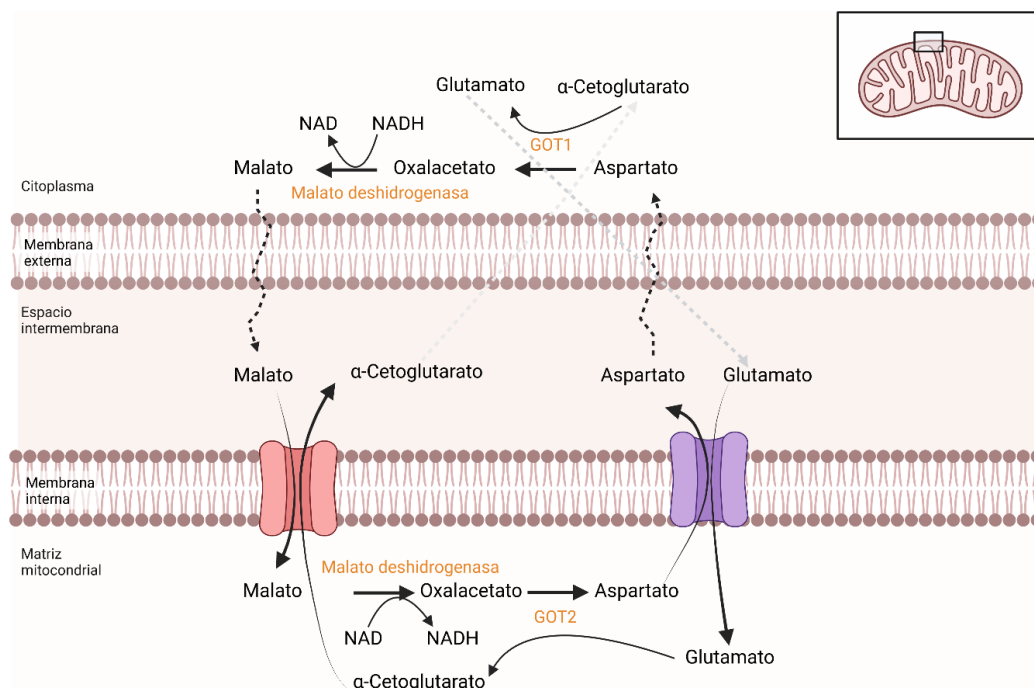
1.1.6.3.2 Gluconeogénesis

Si el ayuno se prolonga en el tiempo, los depósitos de glucógeno se agotan y la síntesis de glucosa *de novo* a partir de precursores no glucídicos se convierte en el principal mecanismo para mantener la euglucemia. Este proceso, conocido como gluconeogénesis, es el mecanismo más importante de producción hepática de glucosa, ya que permite un aporte continuo de glucosa a los tejidos periféricos cuando las reservas de glucógeno se han agotado y el ayuno persiste o cuando la demanda energética es muy alta. Tan solo existen otros dos órganos, aunque con una contribución mucho menor que el hígado, que puedan llevar a cabo esta función: el intestino y el riñón. Los tres órganos poseen esta capacidad debido a que son los únicos órganos que expresan la enzima G6Pasa capaz de hidrolizar la G6P y liberarla al torrente sanguíneo [152, 153].

La gluconeogénesis constituye la ruta casi opuesta a la glucólisis, compartiendo ambos procesos siete reacciones enzimáticas, puesto que son reversibles. Tan solo difieren en cuatro enzimas, que son las que constituyen los puntos de control de la gluconeogénesis: la PDH, la G6Pasa, la fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa1), la PC, y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK o PCK) [133]. La deficiencia congénita de cualquiera de estas enzimas da lugar a intolerancia al ayuno con hipoglucemia cetónica y acidosis láctica [154].

La gluconeogénesis comienza con la conversión de piruvato en oxalacetato por la enzima PC en la mitocondria, y termina con la conversión en glucosa tras varias reacciones enzimáticas en el citosol. Inicialmente, PC cataliza la carboxilación del piruvato para formar oxalacetato, que ingresa en el Ciclo de Krebs. Esta reacción, además de ser necesaria para la síntesis *de novo* de la glucosa, es un proceso anaplerótico muy importante, que permite reponer los niveles de oxalacetato en el Ciclo de Krebs [138, 155, 156]. Los niveles de PC están débilmente regulados por su activación transcripcional, aunque sí se ha descrito que en estado de ayuno se incrementa su expresión y sus niveles de proteína [157].

Dado que el oxalacetato formado por PC se debe transportar fuera de la mitocondria, al citosol, donde se encuentran el resto de enzimas gluconeogénicas, el oxalacetato es reducido a malato por la enzima malato deshidrogenasa mitocondrial. De esta manera, el oxalacetato se transporta al citosol en forma de malato mediante un sistema llamado lanzadera malato-aspartato. Una vez en el citosol, el malato es reoxidado a oxalacetato por la enzima malato deshidrogenasa citosólica.



Durante el ayuno, se estimula la carboxilación de piruvato para producir glucosa, mientras que se suprime la oxidación de glucosa mediante la descarboxilación de piruvato por el complejo PDH [158]. Este complejo se ve inhibido por quinasas PDKs, las cuales lo fosforilan e inactivan, reduciendo la conversión de piruvato a acetil-CoA y por tanto reduciendo la entrada de este último al ciclo de Krebs [159]. Existen 4 isoformas que fosforilan a la PDH, siendo PDK2 y PDK4 las isoformas más abundantes, expresándose en una gran variedad de tejidos, aunque mayoritariamente en corazón, riñones e hígado; mientras que PDK3 y PDK1 se limitan a expresarse en cerebro e hígado [160, 161]. De este modo, los niveles de PDK2 y PDK4 se ven aumentados durante el ayuno y en pacientes diabéticos [162]. La delección de PDK4 aumenta la actividad del complejo PDH, por lo que el piruvato es dirigido hacia el ciclo de Krebs para su oxidación completa, y deja de estar disponible para la gluconeogénesis. Esto último provoca una hipoglucemia durante el ayuno en los ratones *knockout* de PDK4 [163, 164].

Una vez convertido el piruvato en oxalacetato, la enzima PCK1 cataliza la formación de PEP a partir de oxalacetato. Una vez en el citosol, el PEP es secuencialmente transformado en 2-fosfoglicerato, 3-fosfoglicerato, 1,3-bifosfoglicerato, y gliceraldehído 3-fosfato, una triosa que puede interconvertirse en dihidroxiacetona fosfato. La combinación de gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato produce F1,6BP, y la desfosforilación de esta da lugar a F6P, que se transforma en glucosa 6-fosfato (G6P).

Entre los sustratos gluconeogénicos se encuentran algunos aminoácidos, los cuales pueden convertirse en piruvato o en intermediarios del ciclo de Krebs; el lactato (que puede ser convertido en piruvato por la enzima lactato deshidrogenasa); y el glicerol, proveniente de la lipólisis del tejido adiposo, que puede convertirse en dihidroxiacetona fosfato (DHAP), que pasa a glicerol 3-fosfato (G3P) o directamente a F1,6BP, por tanto entrando en la ruta gluconeogénica por encima o después de PCK1 [165].

La enzima bifuncional fosfofructoquinasa 2 (PFK2)/ FBPasa2 (PFKFB1) juega un papel crítico en el cambio de gluconeogénesis a glucólisis, y viceversa [141]. Esta enzima bifuncional regula la producción de F2,6-BP, que es un activador alostérico de la PFK1, una enzima de la ruta glucolítica. Cuando los niveles de glucosa son bajos, el glucagón inactiva PFK2, aumentando la actividad de la FBPasa. Esto provoca una disminución en la producción

de F2,6BP y reduce la glucólisis y potencia la gluconeogénesis. La enzima FBP1 convierte F1,6BP en F6P, que entonces se convierte en G6P. Esta entra en el retículo endoplasmático, donde la G6Pasa convierte la G6P en glucosa.

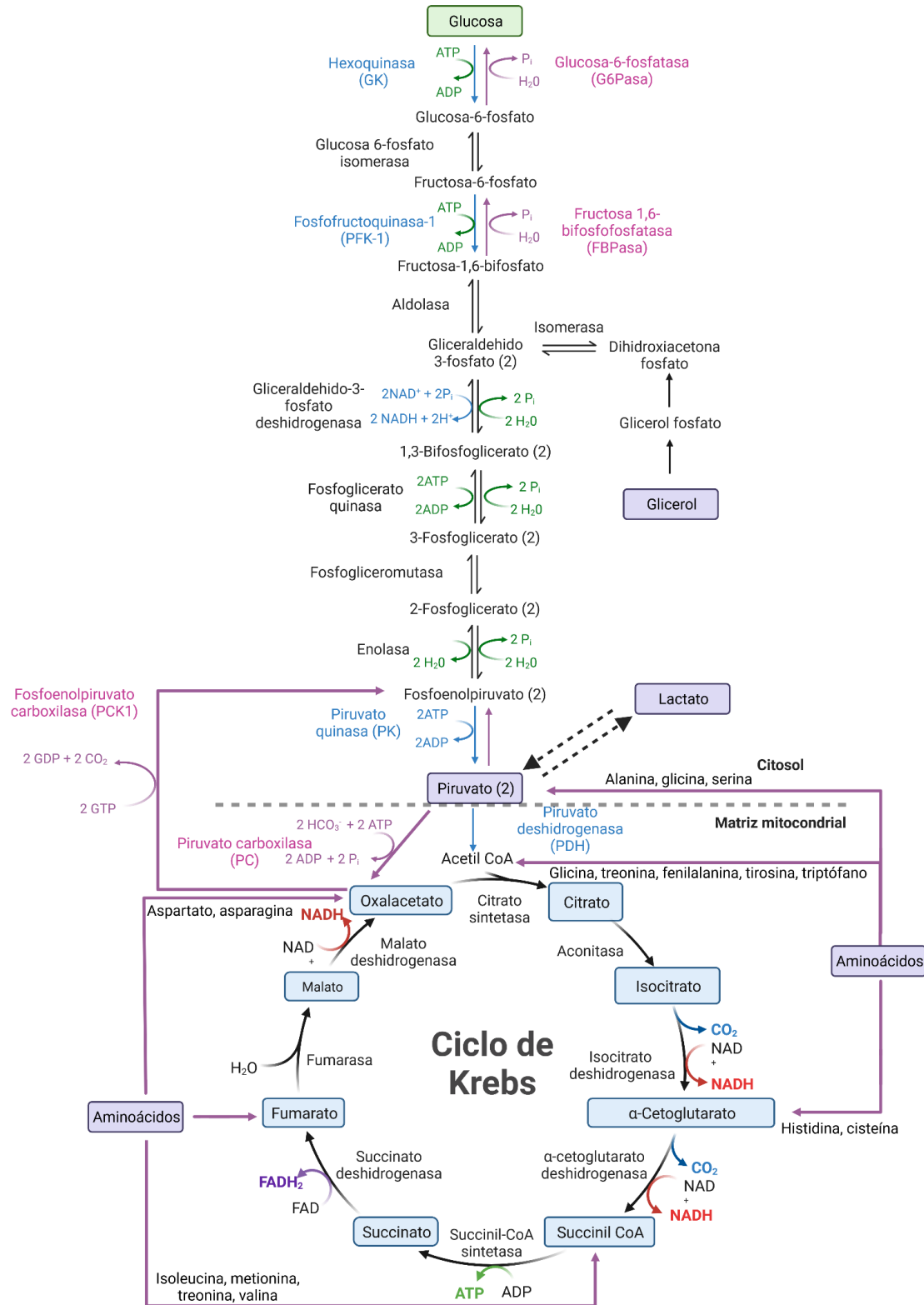


Figura 11. Representación esquemática de gluconeogénesis y los puntos de integración de los diferentes sustratos gluconeogénicos. Las vías relacionadas con la gluconeogénesis están marcadas en violeta, mientras que aquellas de la glucólisis permanecen en negro. Imagen de elaboración propia con Biorender.

Relevancia de PCK1

En todos los vertebrados existen dos isoformas de PCK, PCK1-c y PCK2-m, las cuales comparten un 68% de identidad y un 82% de similitud en sus secuencias [166]. La isoforma citosólica, PCK1-c, está codificada por el gen *Pck1*, mientras que la isoforma mitocondrial, PCK2-m, está codificada por el gen *Pck2*. La abundancia relativa de PCK1-c y PCK2-m es específica tanto de órgano como de especie. PCK1-c se expresa predominantemente en hepatocitos, epitelios tubulares proximales del riñón, adipocitos y epitelios intestinales. Por otro lado, mientras que en el hígado de ratas y ratones la relación PCK1-c:PCK2-m es de 95:5, en aves y conejos es casi lo contrario, 5:95, y en el hígado humano es de aproximadamente 50:5 [167].

Aunque el tejido adiposo no es un órgano gluconeogénico, los adipocitos y los hepatocitos contienen cantidades similares de PCK1-c en ratones. Para investigar el papel fisiológico de PCK1-c en los adipocitos, Olswang y colaboradores utilizaron el mecanismo de recombinación homóloga para generar ratones que carecen de PCK1-c en los adipocitos mediante la eliminación del elemento de respuesta a PPAR γ que se requiere para la expresión de *Pck1* específica de adipocitos [168, 169]. Estos ratones carecían de gliceroneogénesis y tenían cantidades reducidas de triglicéridos almacenados en depósitos de tejido adiposo. Además, una cuarta parte de los ratones eran levemente lipodistróficos y ligeramente hiperglucémicos. Por tanto, la disminución de PCK1 en el tejido adiposo provoca un tipo de síndrome metabólico lipodistrófico [167], lo que pone de manifiesto el papel de PCK1-c en la homeostasis de los adipocitos.

Es importante comprender que PCK1-c y PCK2-m tienen propiedades catalíticas muy similares y catalizan precisamente la misma reacción, con la diferencia de que en el caso de la PCK1-c, el oxalacetato debe ser transportado fuera de la mitocondria a través de la lanzadera malato-aspartato, mientras que para PCK2-m esto no es necesario, puesto que la reacción tiene lugar en la matriz mitocondrial para luego su producto ser translocado al citosol mediante los transportadores de dicarboxilato y tricarboxilato mitocondriales [167]. Sin embargo, es PCK1 quien se ha erigido como la enzima fundamental para la gluconeogénesis, ya que sus niveles de expresión están fuertemente regulados por el estado

nutricional y por las hormonas glucorreguladoras [170, 171], y su sobreexpresión se correlaciona con una producción incrementada de glucosa [172].

Además, PCK1, a parte de su importante papel en la gluconeogénesis, tiene un papel fundamental vinculando el ciclo de Krebs con la gluconeogénesis, ya que tiene un efecto cataplerótico, al catalizar la formación de PEP a partir del oxaloacetato. De este modo, posibilita que el incremento de los niveles de oxaloacetato que se da durante la estimulación de la gluconeogénesis, se transforme en PEP. De hecho, se ha descrito que los ratones *knockout* globales para PCK1 mueren a los pocos días de nacer, ya que son hipoglucémicos y el ciclo de Krebs deja de funcionar correctamente por la ausencia de cataplerosis [173, 174]. Sin embargo, los ratones *knockout* para PCK1 específicamente en el hígado son viables, puesto que desarrollan compensaciones extrahepáticas para mantener la normoglucemia mediante la disminución de la utilización de glucosa por los demás tejidos [173, 174], aunque muestran un deterioro casi absoluto de la gluconeogénesis hepática a partir de la cataplerosis del Ciclo de Krebs [175]. En concordancia, estos ratones no son capaces de eliminar el exceso de oxaloacetato que se genera durante el ayuno, desarrollando hígado graso [175-177]. Por lo tanto, PCK1 es esencial para la vida y PCK1 hepático es necesario para mantener el ciclo del Krebs, especialmente para la oxidación de los ácidos grasos.

Por último, cabe destacar el papel de PCK1 en la formación de glicerol, ya que, durante la gluconeogénesis, el PEP producido por esta enzima puede ser convertido en glicerol en el hígado, proceso conocido como gliceroneogénesis. En este proceso, el PEP generado es convertido en glicerol 3-fosfato, el cual puede ser utilizado en la síntesis de triglicéridos. Con todo, la gliceroneogénesis es importante en el tejido adiposo y el hígado para mantener el ciclo de triglicéridos y ácidos grasos, el cual consiste en la continua liberación de ácidos grasos del tejido adiposo a la sangre, desde donde serán captados por los diferentes tejidos y, en última instancia, por el hígado. Este reesterifica los ácidos grasos en triacilglicéridos, y los empaqueta en vesículas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés) que son liberadas de vuelta a la sangre para ser de nuevo captados por el tejido adiposo. Un componente esencial del ciclo triglicéridos-ácidos grasos se produce en el tejido adiposo, donde se induce la gliceroneogénesis, junto con la lipólisis, mediante el ayuno. Esto crea un ciclo fútil en el que los triacilglicéridos se degradan y resintetizan simultáneamente, pero

donde existe una liberación neta de ácidos grasos libres al torrente sanguíneo como fuente de energía [178]. En circunstancias fisiológicas, los adipocitos no pueden fosforilar el glicerol; por tanto, la gliceroneogénesis es la única fuente de glicerol-3-fosfato durante el ayuno y la función de PCK1 en los adipocitos es regular el almacenamiento y la liberación de ácidos grasos mediante la producción de glicerol-3-fosfato durante el ayuno [167, 178].

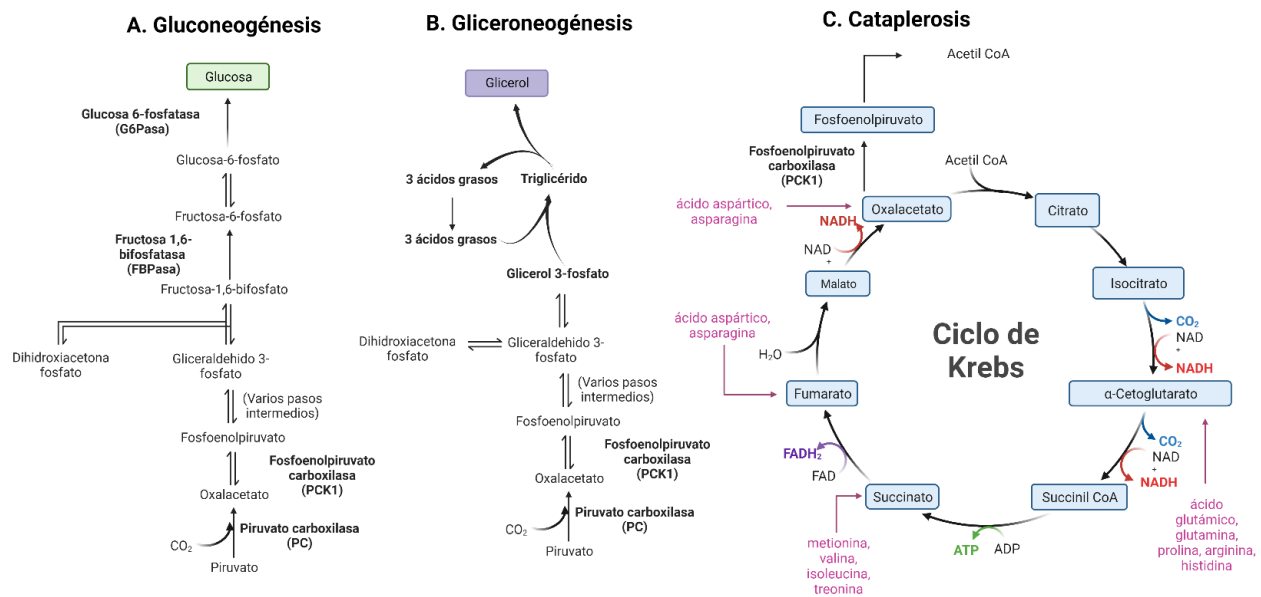


Figura 12. Representación esquemática de las rutas que involucran a PCK1. (A) La gluconeogénesis a partir de piruvato requiere las cuatro enzimas únicas que se muestran en negrita. Todos los pasos restantes están catalizados por enzimas glucolíticas. (B) La gliceroneogénesis es una versión abreviada de la gluconeogénesis. El producto final es glicerol-3-fosfato que se utiliza para reesterificar los ácidos grasos. (C) La cataplerosis es la eliminación de intermediarios del ciclo del TCA, lo que contrasta con la anaplerosis, la adición de intermediarios del TCA, como ocurre con el catabolismo de los aminoácidos. Se muestran los puntos de entrada de 13 aminoácidos. El destino final del PEP puede ser cualquier intermediario glucolítico o sus metabolitos. Imagen de elaboración propia con Biorender basada en la figura 1 de [167].

Regulación de la gluconeogénesis

La regulación de la producción hepática de glucosa es un proceso complejo, dado que se realiza a nivel de sustrato, a nivel alostérico y a nivel transcripcional, donde confluyen factores de transcripción (como FOXO1, CREB, Nur77, HNF4a, C/EBPα y PPARγ) y coactivadores (como PGC-1α, CBP y CRTC2) que integran y median las diferentes respuestas desencadenadas por el estado nutricional y las hormonas contrarreguladoras, dando lugar a la activación o a la represión de la expresión de los diferentes genes implicados en la producción de glucosa.

Regulación postraducciona, a nivel de sustrato y alostérica de la gluconeogénesis

Las enzimas gluconeogénicas están reguladas mediante modificaciones postraduccionales, a nivel de sustrato y mediante regulación alostérica. En ese sentido, la acetilación es una modificación postraducciona regulada por el estado nutricional [179]. La glucosa estimula la acetilación de PCK1-c por p300, lo cual promueve la ubiquitinación y degradación de PCK1-c. En contraste, SIRT2 desacetila y estabiliza a PCK1-c [180], lo cual aumenta la gluconeogénesis en condiciones de ayuno. La F2,6P, que deriva de la G6P, se une a FBPasa e inhibe su actividad catalítica, por tanto inhibiendo la gluconeogénesis en condiciones de acceso libre a alimento [141].

El acetil-CoA mitocondria, derivado del aumento de la oxidación de ácidos grasos en ayuno, funciona como un activador alostérico de PC, aumentando así los niveles de oxalacetato para la síntesis de glucosa.

El complejo PDH presenta una regulación estricta por acetil-CoA y NADH, sus productos. Además, en condiciones de ayuno, PDH es fosforilado por PDKs e inactivada, permitiendo que el piruvato ingrese en el ciclo de Krebs [159, 161].

Durante el ayuno, el glucagón y la adrenalina pueden aumentar los niveles intracelulares de AMPc mediante la activación de la adenilato ciclasa, activando a PKA y la subsecuente inducción de CREB mediante la fosforilación de su serina 133.

Regulación transcripcional de la gluconeogénesis

El promotor de PCK1-c integra numerosas señales que incluyen AMPc, glucocorticoides, insulina, hormona tiroidea, ácidos grasos y glitazonas para regular la transcripción del gen [181]. La vida media del ARNm de PCK1-c es corta, aproximadamente 30 minutos, por lo que los cambios transcripcionales pueden afectar los niveles de ARNm de PCK1-c en 1-2h [182]. Algunos de los factores de transcripción que se ha visto que inducen la gluconeogénesis incluyen CREB, FoxO1 y varios receptores nucleares [183].

CREB es un factor de transcripción que es activado por la fosforilación de PKA, y estimula la expresión de PCK1, G6Pasa y PGC-1 α . La inhibición de CREB específicamente en el hígado conlleva una reducción en la expresión de PCK1, G6Pasa y PGC1- α , teniendo como

resultado una reducción en la producción de glucosa hepática (HGP, por sus siglas en inglés) e hipoglucemia [170]. Asimismo, el *knockdown* de CREB reduce la HGP en roedores con diabetes tipo 2 [184]. Por otro lado, se han descrito varios coactivadores que estimulan la expresión de PCK1 y G6Pasa en el hígado. Tanto p300/CBP como el coactivador transcripcional 2 regulado por AMPc (CRTC2) se unen a CREB y estimulan la expresión de PCK1 y G6Pasa, por tanto aumenta la gluconeogénesis hepática [171, 185].

FoxO1 es un factor de transcripción que también es susceptible de ser regulado por fosforilación. En estado postprandial, la liberación de insulina estimula la fosforilación de FoxO1, lo que provoca su exclusión del núcleo hacia el citosol donde se degrada vía proteosomal. Esto evita que active genes involucrados en la síntesis de glucosa. En el caso opuesto, en condiciones de bajos niveles de insulina, como durante un ayuno, FoxO1 se desfosforila y se transloca al núcleo, donde promueve la expresión de genes que aumentan la gluconeogénesis [186, 187]. Además de su susceptibilidad a fosforilación, FoxO1 también puede ser regulada mediante acetilación, inhibiendo su actividad transcripcional. En el hígado, FoxO1 regula la gluconeogénesis mediante la regulación transcripcional de PCK1 y G6Pasa. De hecho, ratones *knockout* de FoxO1 específicamente en el hígado muestran menor glucogenolisis y menor gluconeogénesis, dando como resultado menores niveles de glucosa en ayuno [188].

PGC-1 α es un coactivador de receptores nucleares que funciona como un coactivador transcripcional de FoxO1 en la gluconeogénesis hepática. PGC-1 α fue originalmente descrito en los adipocitos marrones mediando la termogénesis adaptativa en respuesta al frío [189]. En el hígado, la expresión de PGC-1 α se encuentra regulada al alza en condiciones de ayuno mediante mecanismos dependientes de CRTC2-CREB y es crítico en situaciones de gluconeogénesis prolongada durante períodos de hambruna, donde aumenta la actividad transcripcional de FoxO1 mediando como coactivador [190]. La delección de PGC-1 α en el hígado resulta en una reducción en la tasa gluconeogénica y una disminución de los niveles de glucosa en ayuno [191]. Los niveles de PGC-1 α se encuentran incrementados en estado de ayuno y en diabetes, y promueve la gluconeogénesis funcionando como coactivador de HNF-4 α [170, 190].

*Regulación de la gluconeogénesis por señales hormonales**Regulación por glucagón y adrenalina*

La unión a su receptor del glucagón y la adrenalina tiene como resultado el aumento de los niveles intracelulares de AMPc y la activación de PKA, compartiendo ambas hormonas la misma vía de señalización, tal como ya se ha mencionado en anteriores apartados. PKA fosforila y activa a CREB, el cual es un factor de transcripción que se une a secuencias específicas del ADN conocidas como elementos de respuesta al AMPc principalmente en el promotor del gen de PCK1 y G6Pasa [192, 193], donde promueve su actividad transcripcional y donde recluta a coactivadores como CRTC2, HNF-4 α y PGC-1 α [170, 171, 190, 194]. En el caso de CRTC2, un coactivador de CREB, se fosforila por SIK2 y entonces se transloca del núcleo al citoplasma, donde se ubiquitina y degrada [195]. PKA promueve la desfosforilación de CRTC2, evitando su degradación. El glucagón también estimula la acetilación de CRTC2 por p300/CBP, lo cual aumenta su estabilidad [196]. Por otro lado, además de fosforilar a CREB, PKA activa otras vías que llevan a la inhibición de la glucólisis y a la activación de la glucogenolisis, aumentando así la producción de glucosa mediante diferentes vías. En el caso concreto de la adrenalina, esta además estimula la lipólisis en el tejido adiposo, aumentando la disponibilidad de sustratos y el flujo gluconeogénico.

Por otro lado, en el caso concreto del glucagón, además de estimular la vía CREB/CRTC2, el glucagón estimula la gluconeogénesis a través de otros mecanismos, como mediante la estimulación de la liberación de Ca²⁺ desde el retículo endoplasmático de los hepatocitos. PKA fosforila y activa receptores inositol-1,4,5-trifosfato (IP3Rs), que aumentan esa liberación de Ca²⁺ al citoplasma, donde activa la calcineurina [197]. Esta última desfosforila y estabiliza a CRTC2, pero, además, el Ca²⁺ activa la enzima calcio calmodulina quinasa II (CaMKII), la cual promueve la translocación nuclear de FoxO1 mediante la MAPK p38. En línea con esto, la gluconeogénesis hepática se encuentra reducida en ratones *knockout* de CaMKII γ , y su sobreexpresión específicamente en el hígado, así como la activación de la vía MAPK p38, aumenta la gluconeogénesis [198, 199]. Por último, como ya se ha mencionado, FoxO1 es acetilado en múltiples residuos por p300/CBP, lo cual reduce su capacidad de unión a los promotores de sus genes diana. El glucagón promueve la desacetilación de FoxO1, potenciando así la gluconeogénesis [200].

En cuanto al metabolismo del glucógeno, PKA fosforila y activa la glucógeno fosforilasa quinasa (GPK), que a su vez fosforila y activa la GP, enzima clave en la glucogenolisis que cataliza la liberación de glucosa-1-fosfato (G1P) a partir del glucógeno almacenado. PKA también fosforila y desactiva la glucógeno sintasa, una enzima que cataliza la síntesis de glucógeno [193].

Por último, el glucagón regula la tasa glucolítica mediante la inhibición de la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1). Al inhibir esta enzima, el glucagón reduce la conversión de F6P a F1,6P, un paso crucial en la glucólisis [201-203]. La acción del glucagón cesa cuando el glucagón se disocia de su receptor o cuando se degrada el AMPc por la enzima fosfodiesterasa.

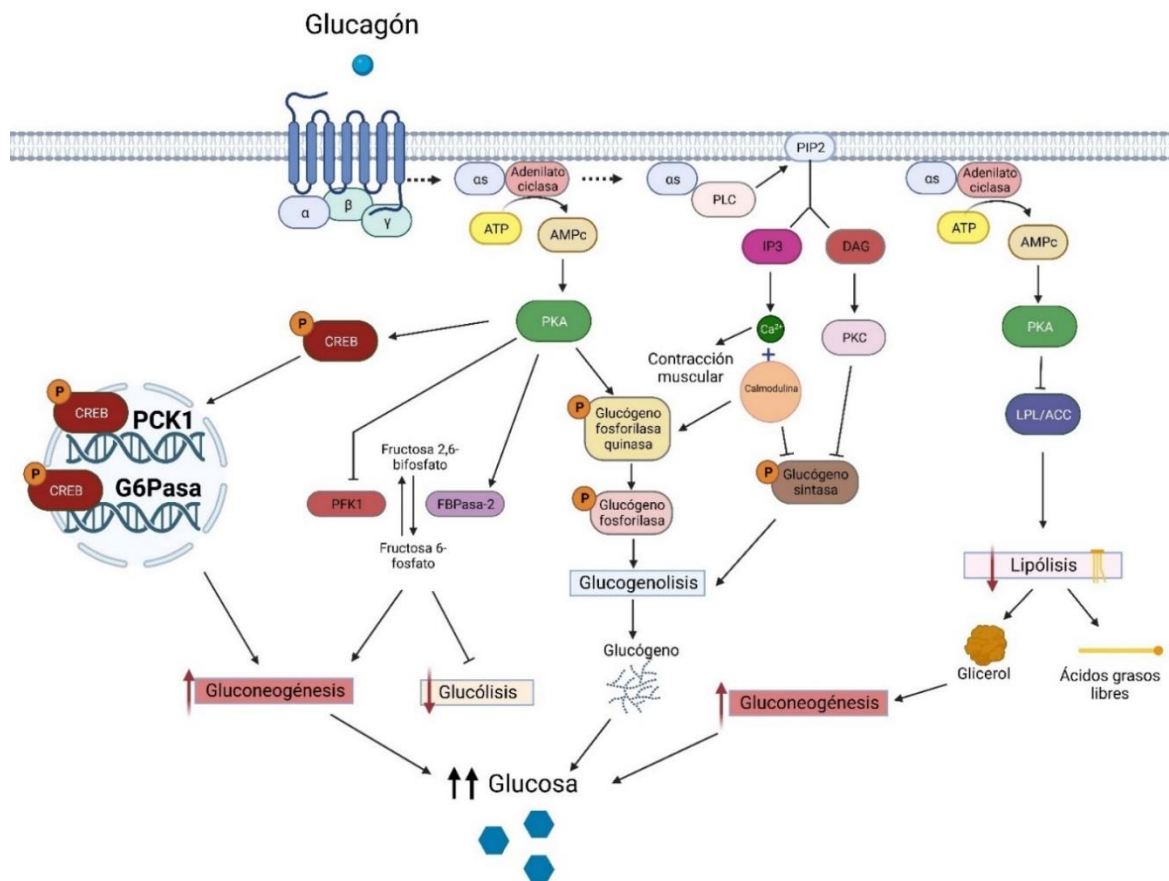


Figura 13. Representación esquemática de la regulación de los niveles de glucosa mediante la vía de señalización del glucagón y la adrenalina. Imagen de elaboración propia con Biorender.

Regulación por glucocorticoides y receptores nucleares

La regulación de la gluconeogénesis mediada por glucocorticoides es principal y directamente a través de la estimulación de la transcripción de PCK1, aunque también G6Pasa y FBPasa.

A nivel molecular, los glucocorticoides, como el cortisol, son sustancias liposolubles que pueden atravesar la membrana celular hacia el citosol, donde se unen a su receptor (GR) reclutado por chaperonas [204]. La unión del glucocorticoide a su receptor provoca la disociación de las chaperonas, y el complejo GR-glucocorticoide puede entonces translocarse al núcleo, donde interacciona con regiones específicas del ADN, llamadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE, por sus siglas en inglés), presentes en los promotores de los genes diana. La unión del complejo GR-glucocorticoide al GRE del promotor de PCK1 estimula su transcripción y por tanto la gluconeogénesis. El *knockdown* de GR en el hígado inhibe la expresión de genes gluconeogénicos, reduce los niveles de glucosa en ayuno, y reduce la hiperglucemia en ratones *db/db* y con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) [205, 206]. La desacetilasa HDAC6 desacetila a la chaperona HSP90, evitando que esta se disocie del GR y por tanto evitando la translocación nuclear del GR. Los ratones *knockout* de HDAC6 poseen una translocación nuclear aberrante del GR, y por tanto menores niveles de activación transcripcional de los genes PCK1, G6Pasa, FBPasa y PC en el hígado [207].

Regulación por hormona de crecimiento

La GH estimula la vía de JAK2/STAT5, donde STAT5, fosforilado y activado, se transloca al núcleo y se une directamente al promotor de PCK1 [208] y al de PDK4 [209], estimulando directamente la gluconeogénesis, e, indirectamente, inhibiendo la entrada de piruvato en el ciclo de Krebs y, por tanto, desviándolo hacia la producción de glucosa [210].

La acción gluconeogénica de la GH se encuentra regulada negativamente por múltiples factores, entre los que se encuentran los ácidos biliares y el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21). Los primeros activan al receptor FXR, el cual estimula la expresión del represor SHP que impide la unión de STAT5 a los promotores de PCK1, PDK y G6Pasa, impidiendo así la gluconeogénesis. De este modo, se ha visto que ratones *knockout* de SHP

muestran una cierta hiperglucemia en ayuno y su sobreexpresión en ratones diabéticos mejora sus niveles de glucemia [212-214].

Regulación por insulina

Tal como se ha mencionado en apartados anteriores en esta tesis, la insulina puede inhibir la producción hepática de glucosa de forma directa, actuando en el hígado a través de su receptor ubicado en la membrana celular, o de forma indirecta, actuando en el páncreas, el cerebro y el tejido adiposo [102]. Acordemente, la delección de los receptores de insulina específicamente en el hígado tiene como resultado intolerancia a glucosa e hiperglucemia [211]. En línea con esto, la resistencia a insulina es un determinante para el desarrollo de la diabetes tipo 2.

1.1.6.4 Liberación de glucosa al torrente sanguíneo

La G6P generada a partir de la glucogenolisis o la gluconeogénesis se transloca del citosol al retículo endoplásmico por el transportador de glucosa 6-fosfato (G6Pt, también conocido como SLC37A4), donde da lugar a glucosa mediante la desfosforilación por la G6Pasa. La deficiencia congénita de la G6Pt o la G6Pasa da lugar a la enfermedad de Von Gierke o glucogenosis tipo I (GSD-I), la cual se caracteriza por una acumulación anormal de glucógeno y una incapacidad de mantener la normoglucemia, por tanto dando lugar a una hipoglucemia durante los períodos interprandiales. La elevada acumulación intracelular de glucosa 6-fosfato promueve la utilización de vías alternativas para la utilización de glucosa, incluyendo la lipólisis, lo cual provoca un aumento en los niveles de triacilglicéridos y colesterol en sangre, y hepatomegalia debido a la acumulación de glucógeno y ácidos grasos en el hígado [212].

La glucosa es finalmente liberada al torrente sanguíneo a través de los transportadores bidireccionales GLUT2. Análogamente, los pacientes con mutaciones en el gen SLC2A2 que codifica para el transportador GLUT2 desarrollan el Síndrome de Fanconi-Bickel, padeciendo hipoglucemia en períodos de ayuno y acumulación de glucógeno [213].

1.2 Modificaciones postraduccionales

La actividad de una proteína puede ser modificada de varias maneras para regular su función biológica. De hecho, las modificaciones postraduccionales de proteínas son los mayores

reguladores de las funciones de una célula eucariota. En ese sentido, las modificaciones postraduccionales (PTMs) de proteínas reguladoras permiten respuestas adaptativas a una variedad de señales metabólicas. De este modo, la actividad de una proteína puede ser modificada de diversas maneras para regular su función biológica. Estas modificaciones pueden ser reversibles o irreversibles y están reguladas por diversos procesos celulares [214, 215]. La ubiquitinación es la mejor caracterizada de esas modificaciones y está involucrada en la regulación de cada aspecto de la homeostasis celular, principalmente a través de sus funciones proteosomales [216].

1.2.1 Ubiquitinación

La ubiquitinación es una de las modificaciones postraduccionales más importantes que juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y para el correcto funcionamiento celular. La ubiquitinación de proteínas tiene lugar por una serie secuencial de tres reacciones enzimáticas: en primer lugar, el residuo Gly del extremo C-terminal de la ubiquitina es activado mediante ATP por una enzima E1 activadora, la E1 ubiquitina-activante (UBE1), dando lugar a la formación de un enlace tioéster entre la ubiquitina y el residuo Cys del centro activo de la enzima E1. A continuación, la ubiquitina activada se transfiere a un residuo Cys de una enzima E2 conjugadora una vez más mediante un enlace tioéster. Finalmente, una enzima E3 ligasa une el extremo C-terminal de la ubiquitina a un residuo Lys de una proteína sustrato mediante un enlace peptídico. La unión de una molécula de ubiquitina a una proteína sustrato altera su localización celular o su función. Sin embargo, la adición de varios residuos de ubiquitina (poliubiquitinación) es señal para la degradación de dicha proteína en el sistema proteosomal [217].

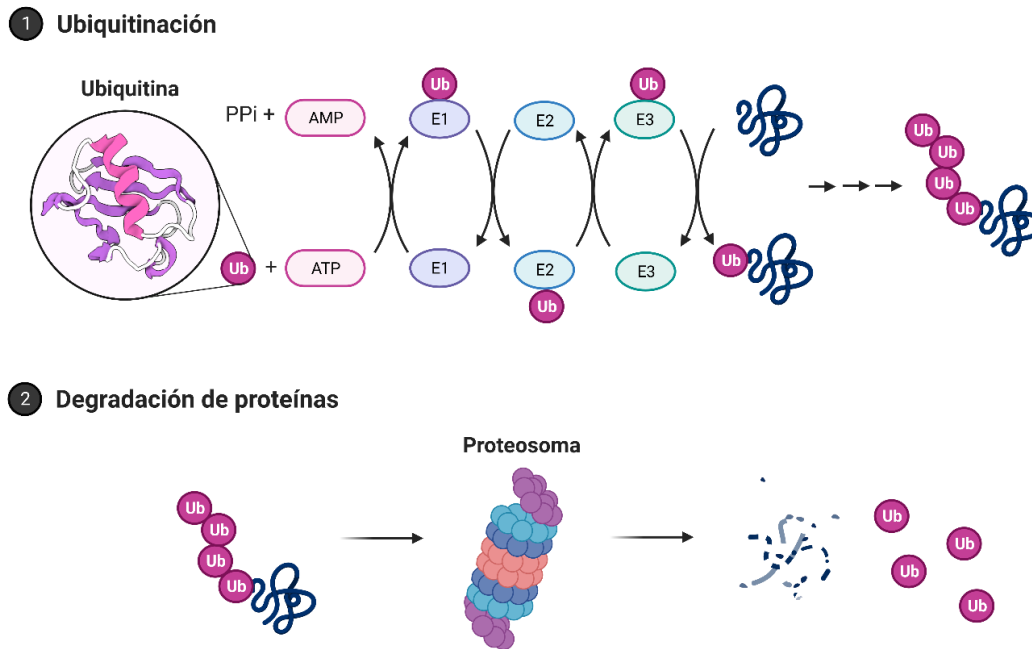


Figura 14. Representación esquemática del (1) proceso de ubiquitinación y (2) su papel en la degradación de proteínas por el proteosoma. Adaptado de "Ubiquitin proteasome system", por BioRender.com (2023). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

1.2.2 Nedilación

Análogamente, la nedilación es un proceso de conjugación de la proteína NEDD8 (*neural precursor cell-expressed developmentally downregulated protein 8*) a proteínas diana, no para marcarlas para degradación, sino para regular su función y actividad. NEDD8 es una proteína tipo ubiquitina, y, entre todas las proteínas de esta familia, NEDD8 es la que poseen la mayor similitud y homología con respecto a la ubiquitina [218].

NEDD8 fue por primera vez descrito que se expresa en el cerebro de ratones en fase embrionaria [219], jugando un papel en la embriogénesis, y cuya expresión disminuye en el cerebro en fases del desarrollo más avanzadas. Pese a que tanto NEDD8 como ubiquitina contengan una secuencia conservada de residuos Leu-Arg-Gly-Gly en su extremo C-terminal, y que es crucial en el caso de la ubiquitina para su conjugación a proteínas sustrato, ambas proteínas difieren en sus funciones debido a diferencias en sus estructuras [218]. De este modo, NEDD8 posee siete residuos diferenciales que se conservan entre sus ortólogos pero que difieren de los de la ubiquitina, por tanto siendo responsables de las interacciones específicas de NEDD8. Uno de esos residuos, Ala-72, impide la interacción de NEDD8 con

la enzima ubiquitina E1 [220], mientras que los otros seis son esenciales para regular las actividades de ubiquitina ligasa de NEDD8 [221].

Al igual que la ubiquitina, NEDD8 es sintetizado como un precursor con cinco residuos adicionales en su extremo C-terminal que son escindidos por hidrolasas como la hidrolasa L3 ubiquitina C-terminal (UCH-L3) [222] y la desdenilasa 1 (NEDP1/DEN1/SEN8) [223, 224], con el fin de dejar expuesto un residuo de glicina en su extremo C-terminal. Mientras que UCHL3 posee una especificidad dual por procesar tanto NEDD8 como ubiquitina [225], DEN1 es específica del procesamiento del precursor de NEDD8, así como de su desconjugación de las proteínas sustrato [226].

Una vez procesado, NEDD8 se une covalentemente a proteínas sustrato de una manera similar a la ubiquitina mediante una cascada de enzimas E1 activadoras, enzimas E2 conjugadoras y enzimas E3 ligasas. En un primer momento, el NEDD8 maduro es activado por una enzima E1 activadora, la enzima E1 activadora de NEDD8 (NAE1), que es en realidad un heterodímero, formado por una subunidad reguladora NAE1/APPBP1 y una subunidad catalítica UBA3 (abreviatura de Modificador similar a la ubiquitina que activa la enzima 3) [227]. El dominio pliegue de ubiquitina (UFD) en el extremo C-terminal de UBA3 juega un papel importante mediando las interacciones con las enzimas E2 conjugadoras de NEDD8 [228].

Una vez activado por NAE1, NEDD8 es transferido a un residuo de cisteína de una enzima E2 conjugadora de NEDD8 mediante una reacción de transtiolación. Hasta ahora se han identificado dos enzimas E2 conjugadoras de NEDD8: UBE2M (también conocida como Ubc12) y UBE2F [229, 230]. La extensión N-terminal y el dominio catalítico de UBA2M o UBE2F interacciona con el surco hidrofóbico de UBE3 y el UFD de NAE1, respectivamente [231]. Además, en los últimos años se ha demostrado que UBE2M y UBE2F interaccionan entre sí, de manera que UBE2M promueve la ubiquitinación y degradación de UBE2F, tanto en condiciones fisiológicas como de estrés [232].

Tras la formación del puente tioéster, el complejo E2-NEDD8 interacciona con E3-ligasas para transferir el residuo de NEDD8 a proteínas diana. Los sustratos nedilados pueden ser desnedilados por una desnedilasa, que son proteasas como NEDP1 (proteasa 1 específica de

NEDD8) y CSN (signalosoma COP9), y el NEDD8 libre es reciclado. De entre todos los sustratos nedilados que han sido identificados hasta ahora, solo las proteínas cullin se consideran su sustrato fisiológico [233].

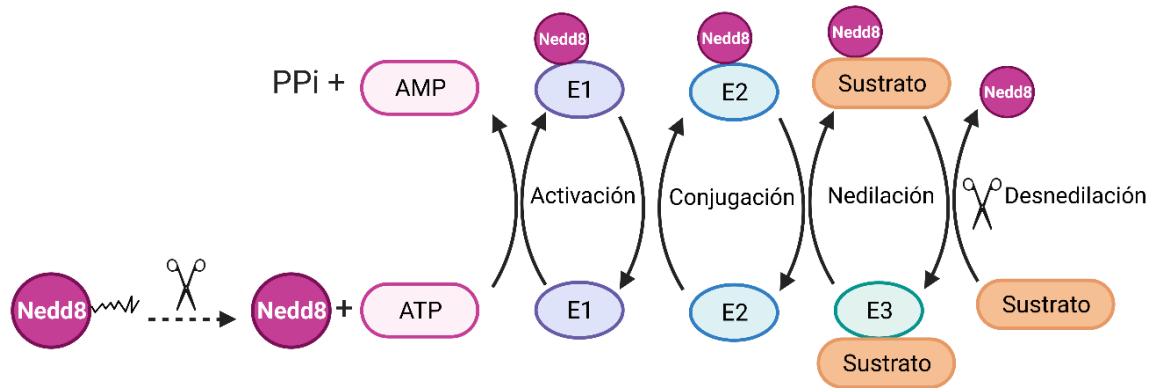


Figura 15. Representación esquemática la cascada de nedilación. Imagen de elaboración propia con Biorender.

1.2.2.1 Complejo CRL

La nedilación está estrechamente relacionada con los complejos CRL (*Cullin-RING Ligase*), que son complejos proteicos involucrados en la ubiquitinación de proteínas, responsables del 20% de ubiquitinaciones de proteínas para su degradación en el sistema proteosomal. La unión de NEDD8 a una lisina C-terminal de las cullins provoca un cambio de conformación abierto del CRL, lo cual da lugar a su activación y permite el acceso de sustratos para ser ubiquitinizados [234].

El complejo CRL es una E3 formada por cuatro componentes, incluidas las cullins, una proteína adaptadora, un receptor que reconoce el sustrato, y una proteína RING. Estructuralmente, las cullins actúan como proteínas andamio con su extremo N-terminal unido a una proteína adaptadora, y a una proteína receptor de sustrato, y con su extremo C-terminal unido al componente proteína RING [235].

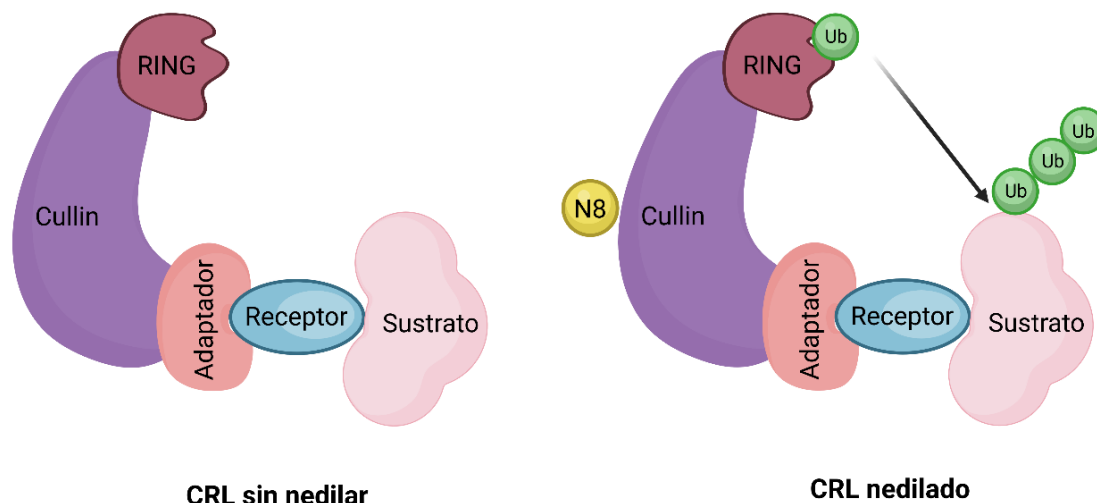


Figura 16. Representación esquemática del complejo cullin-RING ligasas. Imagen de elaboración propia con Biorender.

En el genoma humano se han identificado ocho miembros de la familia cullin (CUL1, CUL2, CUL3, CUL4A, CUL4B, CUL5, CUL7 y CUL9), todos ellos con un dominio homólogo cullin conservado en su extremo C-terminal, el cual es responsable de la interacción de las cullins con el componente RING, el cual está constituido por la proteína RBX1 (Ring-Box 1) o RBX2 (Ring-Box 2), las cuales están involucradas en la transferencia de la ubiquitina a proteínas sustrato diana. El dominio N-terminal de las proteínas RING media la unión con la proteína cullin, mientras que su extremo C-terminal se une y activa enzimas E2 conjugadoras. UBE2M promueve la nedilación de proteínas cullins asociadas a Rbx1 (CUL1-3, CUL4A y CUL4B), mientras que UBE2F promueve la nedilación de la CUL5 asociada a Rbx2 [231, 235].

Con respecto a las proteínas adaptadoras, Skp1 se une a las cullins 1 y 7, la elongina B/C interacciona con las cullins 2 y 5, y DDB1 a las cullins 4A y 4B. Por otro lado, con respecto a los receptores reconocedores de sustrato, se han identificado 69 proteínas F-box para CRL1/SCF, 80 proteínas SOCS para CRL2/5, 180 proteínas BTB para CRL3, 90 proteínas DCAF para CRL4A/4B, y una proteína adaptadora, FBXW8, para CRL7 [236]. Con todo, las CRLs consisten en más de 400 componentes que forman las ocho ubiquitina-ligasas E3 dependientes de las cullin-RING.

En general, la mayoría de proteínas de vida corta son sustratos de CRLs, incluyendo reguladores del ciclo celular, factores de transcripción, moléculas de señalización, y proteínas reguladoras de la transcripción y apoptosis. Dado que los sustratos de las CRLs son varias moléculas clave en diferentes procesos celulares, no es de extrañar que las CRLs y su activación por nedilación jueguen un papel clave en multitud de procesos biológicos. Ello también implica que las CRLs se encuentren anormalmente reguladas en varias enfermedades en humanos y que hayan servido como dianas terapéuticas para el tratamiento de dichas enfermedades [237, 238].

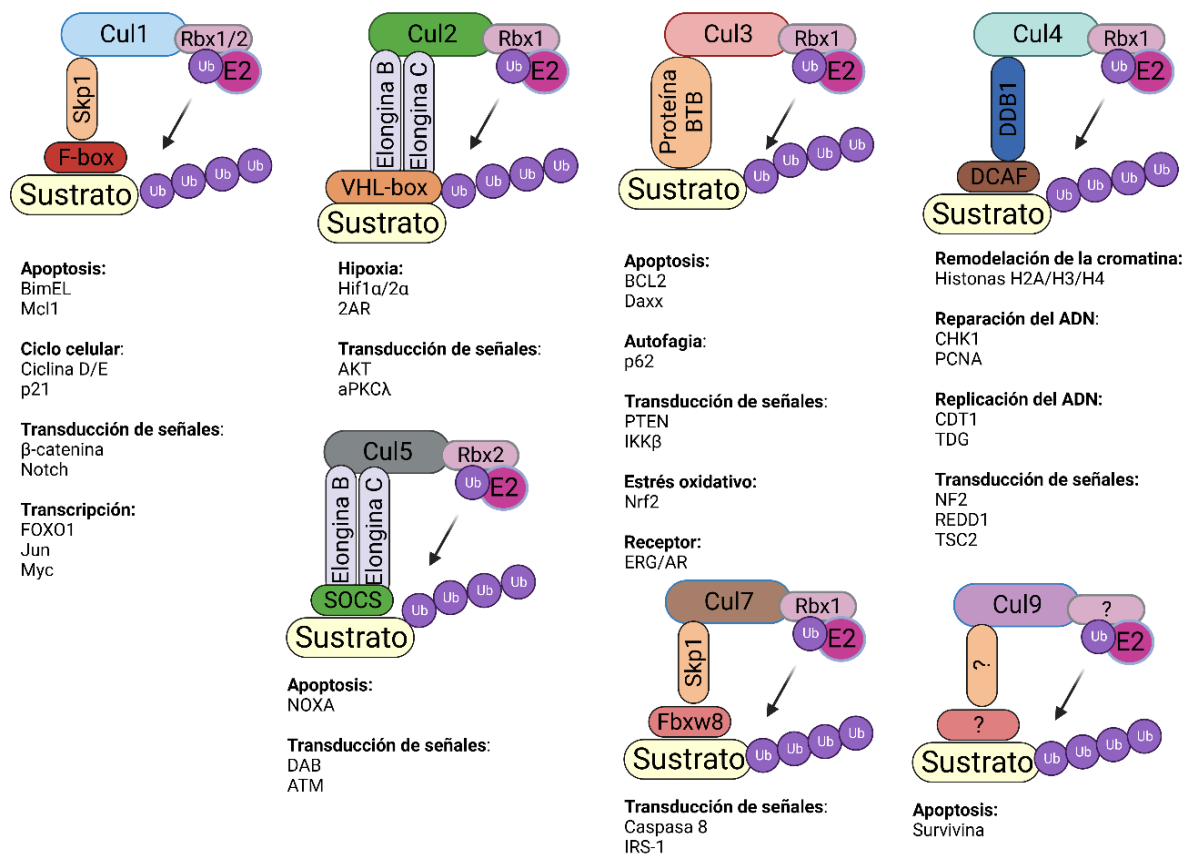


Figura 17. Representación esquemática de la familia de cullin-RING ligasas: componentes y sustratos. Imagen de elaboración propia con Biorender basada en la fig.1.3 de [235].

1.2.2.2 Proteínas reguladas por nedilación

Los sustratos susceptibles de ser nedilados incluyen no solo cullins sino también varias proteínas no cullins, lo que sugiere que la nedilación, además del CRLs, regula varios procesos celulares, entre los cuales se incluye la señalización de receptores tirosina quinasas,

apoptosis, respuesta de daño al ADN y transcripción [239]. Entre esas proteínas susceptibles de ser nediladas se encuentran el gen 3 asociado a cáncer de mama (BCA3, por sus siglas en inglés), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el factor 1α inducible por hipoxia (HIF- 1α), el inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma X (XIAP), la caspasa 7 [240-244] y el factor de transcripción p53, una proteína supresora tumoral [245], cuya nedilación por la ligasa MDM2 (de sus siglas en inglés "*murine doble minute 2*") previene su translocación nuclear [246] y suprime su actividad transcripcional [247] mediante su degradación proteosomal a través de su ubiquitinación. Curiosamente, y como es común con las ligasas de la familia RING, se ha descrito que MDM2 a su vez se autonedila [247]. Consistentemente, la sobreexpresión o inhibición de NAE1 inhibe o potencia la actividad de p53, respectivamente [248]. Por otro lado, el papel de la nedilación en la regulación transcripcional se ha extendido a otros miembros de la familia de p53, de manera que la nedilación de TP73 inhibe la actividad transcripcional debido a su reclusión citoplasmática [247, 249]. Como último ejemplo, también se ha descrito que la nedilación estabiliza al antígeno humano R (HuR) [250, 251], una proteína de unión a ARN que estabiliza los ARNm diana implicados en la desdiferenciación, proliferación y supervivencia celular, todas características bien establecidas del cáncer. Con ello, la estabilización de HuR por su nedilación promueve la supervivencia del carcinoma hepatocelular y las células de cáncer de colon [251, 252].

Ante este contexto de cáncer no es de extrañar que los niveles de enzimas catalíticas de la nedilación (NAE1, NEDD8, UBE2M/UBE2F) se encuentren significativamente incrementados en varios tipos de cánceres humanos, incluyendo cáncer de pulmón, hepatocarcinoma, glioblastoma y cáncer de mama [237, 238, 253, 254], lo cual ha hecho de la nedilación una diana atractiva para terapias oncológicas. Esto ha propiciado el desarrollo del fármaco MLN4924 (también conocido como Pevonedistat), un potente y selectivo inhibidor de NAE1 descubierto en 2009 [255]. El MLN4924 forma un aducto con NEDD8, inhibiendo la actividad enzimática de NAE1 [256]. Se ha descrito que el MLN4924 ejerce significativos efectos anticancerígenos, principalmente desencadenando apoptosis celular, senescencia y autofagia [238, 253, 257, 258]. En contraste, y en un contexto más fisiológico, la inhibición farmacológica, mediante MLN4924, de la nedilación de PPAR γ reduce la adipogénesis y la formación de gotas lipídicas en el tejido adiposo [259-262].

Por otro lado, la nedilación se ha implicado en diferentes aspectos de la fisiología del hígado, como la β -oxidación [263] o la señalización de la insulina [264] y en la fisiopatología, de manera que la nedilación se encuentra incrementada en etapas tempranas del hígado graso asociado con el metabolismo (MAFLD) mediante la disminución de la oxidación de ácidos grasos [259], en la fibrosis hepática avanzada y carcinoma hepatocelular [265-267], y en colangiocarcinoma [237, 268]. Sin embargo, pese a todo, todavía se desconoce en gran medida si la nedilación regula el metabolismo energético y cómo lo hace.

Cabe mencionar, además, que, excepto por las cullins nediladas, los mecanismos regulatorios y funciones fisiológicas de los sustratos no-cullin todavía se están comenzando a esclarecer en la actualidad y que se están llevado a cabo varios ensayos de proteómica para identificar los sustratos de NEDD8 [269-271].

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

Dado que la gluconeogénesis está estrechamente regulada en múltiples niveles, como la secreción hormonal, la transcripción de genes y las PTMs, y dado que la nedilación es una PTM de la cual hasta ahora su papel fisiológico sigue siendo mayoritariamente desconocido, en la presente tesis estudiamos si la nedilación está regulada por el estado nutricional. Al ser así, nos preguntamos si su inhibición tiene algún efecto en la producción hepática de glucosa, y si esta inhibición tiene algún efecto beneficioso en la alteración de los niveles de glucosa en patologías donde estos se encuentren alterados, como es el caso de la diabetes tipo 2.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

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

- Estudiar la regulación de los niveles de NAE1 y NEDD8 en el hígado por el estado nutricional.
- Estudiar el papel de la nedilación en la gluconeogénesis hepática.
- Identificar proteínas nediladas que cambien su expresión durante la restricción calórica.
- Estudiar el papel de la nedilación en la regulación o control de la actividad de la enzima PCK1.

METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

4.1 Animales de experimentación

Todos los procedimientos realizados en los animales fueron realizados bajo la aprobación del Comité Ético de la Universidad de Santiago de Compostela, bajo la responsabilidad del profesor Rubén Nogueiras Pozo, y registrados con el número de procedimiento 15010/2017/007 (anexo 1) y bajo el cumplimiento del Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero. Por tanto, dicho procedimiento se ha realizado bajo el amparo del marco legislativo vigente: Directiva 2010/63/UE del Parlamento y Consejo Europeo del 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos; traspuesto a la norma española con el Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Además, considerando las implicaciones éticas asociadas al uso de animales con fines científicos, los diseños experimentales se realizaron teniendo en cuenta el principio de las tres erres (reducción, refinamiento y reemplazo), por tanto intentando utilizar el menor número de animales posible, que los procedimientos fuesen lo menos dolorosos posible para ellos, y utilizando modelos *in vitro* siempre que fuese una alternativa.

Los diferentes modelos animales utilizados en esta tesis fueron mantenidos en el animalario CEBEGA, en Santiago de Compostela, en condiciones libres de patógenos (SPF), mantenidos en salas con temperatura regulada en torno a 22°C y con ciclos de luz oscuridad de 12h (08.00 horas - 20.00 horas), y con un periodo de aclimatación en las instalaciones de mínimo de 7 días previos a cualquiera procedimiento.

3.1.1. Modelos animales.

En esta tesis doctoral se han empleado indistintamente machos o hembras de las siguientes cepas:

- Ratones *wild type* (WT) C57BL/6J suministrados por el Centro de Investigación Animal de Galicia (CEBEGA).
- Ratones con el gen *Pck1* flanqueado por secuencias *LoxP* (*background* genético agouti y C57BL/6J).

- Ratones que expresan el gen de la recombinasa Cre bajo la expresión del promotor de la albúmina y los *enhancers* de la α -fetoproteína (transgen AlfpCre), configuración que potencia la transcripción de la albúmina [272].
- Ratones heterocigotos de NAE1 (*background* C57BL/6J) proporcionados por el laboratorio de la Dr.Martínez-Chantar, del CIC bioGUNE [273].
- Ratones bioNEDD8 (*background* C57BL/6J) con NEDD8 biotinizado, proporcionados por el laboratorio de la Dr.Martínez-Chantar, del CIC bioGUNE.
- Ratones BKS.Cg-Dock7m $+/+$ Leprdb/J (*db/db*), procedentes de la casa comercial The Jackson Laboratory (ref. 000642).

Durante todo ese tiempo, los animales fueron mantenidos en condiciones de acceso libre a dieta estándar (61,3% carbohidratos, 25,2% proteínas y 13,5% grasas) y a agua, excepto en los procedimientos experimentos en los que se especifique otra condición. Para verificar el correcto bienestar de los animales, estos fueron monitorizados periódicamente mediante un seguimiento controlado de masa corporal e ingesta, además de valorar su correcto aspecto físico y conductual, y acostumbrarlos al manejo por el personal del laboratorio para reducir en todo lo posible el estrés generado durante los experimentos llevados a cabo.

La estabulación de los animales fue colectiva en todos los experimentos, a excepción de las restricciones calóricas y tras las cirugías, donde en esos casos permanecieron individualizados. El número de animales utilizado en cada experimento está indicado en su correspondiente pie de figura. Para todos los experimentos se utilizó una mezcla de ratones tanto machos como hembras dentro de cada grupo experimental, excepto en una única ocasión en la que figura indicado que se utilizaron solamente hembras.

Los animales fueron sacrificados y los tejidos recolectados rápidamente se introdujeron en hielo seco para evitar su degradación. Los tejidos y los sueros sanguíneos fueron mantenidos a -80°C hasta que fueron analizados.

4.2 Procedimientos en animales

3.2.1 Monitorización de la ingesta y el peso corporal.

La determinación de la masa corporal y la ingesta se realizó mediante una balanza de precisión una vez a la semana, siempre el mismo día de la semana. Dado que los animales se mantuvieron en grupo en una misma caja, el cálculo de la ingesta se realizó mediante el promedio en función del número de individuos de cada caja.

4.2.1 Estudio del efecto del estado nutricional en los niveles de nedilación

Para estudiar el efecto del estado nutricional en los niveles hepáticos de los marcadores de nedilación (NAE1, NEDD8 y cullins nediladas), los ratones WT fueron alimentados *ad libitum* con dieta estándar, sometidos a ayuno durante 24 h, o sometidos a ayuno durante 24 h y después realimentados con dieta estándar durante 24 h más.

4.2.2 Estudio del efecto de la glucosa en los niveles de nedilación

Para estudiar el efecto de la glucosa sobre los niveles hepáticos de los marcadores de nedilación (NAE1, NEDD8 y cullins nediladas), los ratones WT fueron alimentados *ad libitum* con dieta estándar, sometidos a ayuno durante 24 h, o sometidos a ayuno durante 24 h y después realimentados únicamente con azúcar (AB Azucarera Iberia S.L) durante 24 h más.

4.2.3 Ayuno de 24 horas

Para estudiar el papel de la nedilación en la producción de glucosa durante el ayuno, los ratones fueron sometidos a un ayuno de 24 horas desde las 08.30 horas hasta las 08.30 horas del día siguiente. Se les pesó y se les midieron los niveles de glucemia con un glucómetro antes y después del ayuno.

4.2.4 Restricción calórica

Para la realización del ensayo de restricción calórica, los animales fueron individualizados los 5 días previos al comienzo del ensayo, con acceso *ad libitum* a dieta estándar previamente pesada. Durante esos días de aclimatación, se monitorizó la ingesta para determinar la cantidad de comida consumida diariamente por cada ratón. Tras eso, los ratones fueron divididos aleatoriamente en dos grupos, de los cuales uno de ellos continuó cinco días más

con dieta *ad libitum*, mientras que los ratones del otro grupo fueron sometidos a una restricción del 60% de su ingesta [274]. Cada día a las 17.30 horas se les pesó y midió sus niveles de glucemia y, a las 18:00 horas se alimentó a cada uno de estos ratones sometidos a restricción calórica con la cantidad equivalente al 40% de su ingesta diaria durante la semana de aclimatación. Finalmente, los ratones fueron sacrificados a las 17:30 horas (antes de ser alimentados) del cuarto día de restricción calórica y el suero sanguíneo y el hígado fueron recogidos para su análisis.

4.2.5 Inyección intraperitoneal

La inyección intraperitoneal (ip) consiste en la administración de sustancias en la cavidad peritoneal, que es el espacio que rodea los órganos vitales. La inyección se realiza en el cuadrante inferior derecho o izquierdo del abdomen del animal, sujetando a este en posición decúbito supina y ligeramente inclinado hacia abajo para desplazar las vísceras hacia abajo y no perforarlas. La aguja BD Microlance, 25G 5/8" 0.5x16 mm, BD Medical Surgical Systems), acoplada a una jeringa (1 ml BD sliptip syringe, bulk, non-sterile, BD Medical Surgical Systems), se introduce en un ángulo de 45° hasta un punto donde no se note resistencia.

4.2.6 Administración de hormonas

4.2.6.1 Administración de leptina

Para estudiar el efecto de la leptina en la regulación de los niveles de proteínas de los marcadores de nedilación (NAE1, NEDD8 y cullins nediladas) en el hígado, ratones WT fueron tratados con salino como vehículo, o con leptina recombinante (Sigma Aldrich, ref. L4146) en una dosis de 0.5 mg/kg cada 12 horas durante 3 días, administrada por vía ip [275].

4.2.6.2 Administración de glucagón

Los ratones, mantenidos previamente en ayuno durante la noche, fueron tratados con salino o con glucagón 200 µg/kg (Sigma-Aldrich, ref. G1774) por vía ip. Transcurridos 30 minutos tras la inyección, se midieron los niveles de glucosa en sangre [198] con un glucómetro (Glucocard, Arkray, EEUU).

4.2.6.3 Administración de adrenalina

Los ratones, mantenidos previamente en ayuno durante la noche, fueron tratados con salino o con L-adrenalina a una dosis de 100 µg/kg (ThermoFisher, ref. L04911) por vía ip. La dosis se escogió tras la realización de un ensayo de dosis respuesta, donde se seleccionó la dosis más baja capaz de elevar los niveles de glucosa en sangre (datos no mostrados). Los niveles de glucemia se midieron con un glucómetro a los 15, 30, 45 y 60 minutos tras la administración de la hormona.

4.2.6.4 Administración de cortisol

Los ratones, mantenidos previamente en ayuno durante la noche, fueron tratados con salino o con succinato sódico de hidrocortisona a una dosis de 20 mg/kg (Santa Cruz Biotechnology, ref. sc-250130) por vía ip. La dosis se escogió tras la realización de un ensayo de dosis respuesta, donde se seleccionó la dosis más baja capaz de elevar los niveles de glucosa en sangre (datos no mostrados). Los niveles de glucemia se midieron con un glucómetro a los 15, 30, 45 y 60 minutos tras la administración de la hormona.

4.2.6.5 Administración de insulina

Tras un ayuno de 6 horas, los ratones fueron tratados con salino o con insulina (Actrapid, Novo Nordisk) a una dosis de 0.35 U/kg por vía ip. Los niveles de glucosa en sangre fueron medidos con un glucómetro a los 10 y a los 20 minutos tras su administración.

4.2.7 Tests de tolerancia

4.2.7.1 Test de tolerancia a piruvato

Para conocer la capacidad gluconeogénica de los diferentes grupos experimentales de ratones, se realizó un test de tolerancia a piruvato (PTT, *pyruvate tolerance test*), que es un sustrato potenciador de la gluconeogénesis [276]. Tras un ayuno nocturno de 12 horas, se midieron los niveles de glucemia basales y se realizó la administración de piruvato (Sigma-Aldrich, ref. P2256) por vía ip a una dosis de 1.25 g/kg. Se midieron los niveles de glucosa a los 20, 40, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección. Con los datos obtenidos se construyó una curva, de la cual se calculó el área bajo la curva (AUC) de los distintos grupos experimentales.

4.2.7.2 Test de tolerancia a glucosa

Para conocer la capacidad de tolerancia a la glucosa de los diferentes grupos experimentales de ratones, se realizó un test de tolerancia a glucosa (GTT, *glucose tolerance test*) (Sigma-Aldrich, ref. G8270). Tras un ayuno nocturno de 12 horas, se midieron los niveles de glucemia basales y se realizó la administración de D-glucosa (2 g/kg) por vía ip [277]. Se midieron los niveles de glucosa a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección. Con los datos obtenidos se construyó una curva, de la cual se calculó el área bajo la curva (AUC) de los distintos grupos experimentales.

4.2.7.3 Test de tolerancia a insulina

Para conocer la sensibilidad a insulina de los diferentes grupos experimentales de ratones, se realizó un test de tolerancia a insulina (ITT, *insulin tolerance test*) (Actrapid, Novo Nordisk). Tras un ayuno diurno de 6 horas que normaliza la glucemia y la insulinemia a niveles basales independientes del tiempo transcurrido desde la última comida, se midieron los niveles de glucemia basales y se realizó la administración de insulina (0.35 U/kg) por vía ip. Se midieron los niveles de glucosa a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección. Con los datos obtenidos se construyó una curva, de la cual se calculó el área bajo la curva (AUC) de los distintos grupos experimentales.

4.2.7.4 Test de tolerancia a glicerol

Para conocer la capacidad de los diferentes grupos experimentales para producir glucosa a partir de glicerol, se realizó un test de tolerancia a glicerol (GlyTT, *glycerol tolerance test*), que es un precursor y, por tanto, potenciador de la gluconeogénesis. Tras un ayuno nocturno de 12 horas se realizó la administración de glicerol (1 g/kg) por vía ip [278]. Se midieron los niveles de glucosa a los 20, 40, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección. Con los datos obtenidos se construyó una curva, de la cual se calculó el área bajo la curva (AUC) de los distintos grupos experimentales.

4.2.8 Tratamiento con MLN4924

Para comprobar el efecto que tiene el bloqueo de la nedilación, se administró MLN4924 (MedChemExpress, New Jersey, EEUU, ref. HY-70062), también llamado pevonedistat, un conocido inhibidor de NAE1 [255], a los ratones a una dosis de 60 mg/kg por vía subcutánea

3 días antes del experimento. 2-Hidroxipropyl- β -ciclodextrina (Sigma, #H107) fue utilizada como vehículo.

4.2.9 Inyección en la vena de la cola

La inyección en la vena lateral de la cola del ratón (TVI, *tail vein injection*) es el método más común y eficiente de administrar vectores virales en el hígado. La infección en el hígado aumenta con la elección del AAV (virus adenoasociado) serotipo 8 como vector, pues posee una alta afinidad por infectar hepatocitos.

Los ratones se inmovilizaron en un cepo (TV-150-STD, Bioseb, Francia) que deja libre la cola. Antes de administrar las sustancias, es necesario dilatar la vena mediante la exposición a una lámpara térmica durante unos 5-10 segundos. Cuando la vena esté dilatada, se procede desinfección con etanol 70% y, una vez desinfectada la zona, se procede a la administración de 100 μ l de la sustancia, de manera casi paralela al vaso sanguíneo. Para comprobar si estamos accediendo a la vena de forma correcta, basta con comprobar si aparece sangre al aspirar, o bien, no apreciar ninguna resistencia al presionar el émbolo de la aguja al inyectar. Una vez inoculada la sustancia, se retira la aguja despacio, y se presiona la zona hasta detener la hemorragia.

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

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

Virus	Casa comercial y referencia	Dosis (UV/ml)	Vehículo
AAV8-DIO-shNAE1	Vector Builder (ref. VB191026-1075pqj)	10^{10}	Suero fisiológico
AAV8-DIO-shNEDD8	Vector Builder (ref. VB191025-5729jaz)	10^{10}	Suero fisiológico
AAV8-DIO-NAE1	Vector Builder (ref. VB191025-5576yay)	10^{10}	Suero fisiológico
AAV-DIO-EGFP	Vector Builder (ref. VB010000-9487ngd)	10^{10}	Suero fisiológico
AAV8-Cre-GFP	Tebubio (#189SL100835)	10^{10}	Suero fisiológico

AAV8-GFP	Signagen Laboratories (ref. SL100,833)	10 ¹⁰	Suero fisiológico
AAV8-PCK1 WT	Origene (ref. RC204758)	10 ¹⁰	Suero fisiológico
AAV8-K278R-K342R-K387R-PCK1	Vector Builder (ref. VB210921-1406frv)	10 ¹⁰	Suero fisiológico

4.2.10 Determinación de la producción hepática de glucosa

4.2.10.1 Cirugía para la canulación de la vena yugular

Para la determinación de la producción hepática de glucosa (HGP), previamente es necesario la implantación de un catéter en la vena yugular, para tener un punto de acceso vascular para la infusión de glucosa tritiada. La implantación del catéter se realiza como se describe: 7 días antes del ensayo, se anestesia al ratón con una mezcla de ketamina (80 mg/kg)/xilacina (5 mg/kg) vía ip combinado con una mezcla de isoflurano y oxígeno inhalado durante todo el procedimiento. A continuación, se rasuran las zonas de las incisiones, se desinfectan con clorhexidina (Galeno Especialidades Veterinarias S.L., España), y se coloca al animal en posición decúbito supino, en una zona de trabajo aséptica, y en dirección rostral hacia el investigador. Después se le administra antibiótico (Baytril, 10 mg/kg), y antiinflamatorios (Metacam, dosis 5 mg/kg), ambos por vía subcutánea.

La cirugía comienza con la realización de una pequeña incisión en la zona derecha del cuello, unos 5 mm por encima del músculo pectoral. A continuación, se aísla la vena yugular con cuidado y se coloca y cierra una ligadura de seda 7/0 (Mersilk Ethicon, ref. W817) en el extremo. Se coloca otra ligadura, esta vez de forma holgada, en el extremo caudal de la vena expuesta. Se realiza una pequeña incisión con un ángulo de 30° por encima de la ligadura cefálica y rápidamente se inserta 1 mm el catéter (Instech Laboratories, ref. C20PU-MJV2011) previamente relleno con salino heparinizado a una concentración de 25 U/mL. Se cierra la ligadura caudal alrededor del catéter y se comprueba que la sangre fluye a través de este mediante el aspirado con una jeringa con salino heparinizado conectada al catéter. Se desconecta la jeringa del catéter y se cierra con un plug (Instech Laboratories, ref. SP25/12). A continuación, se coloca al ratón en posición decúbito prono, y se le realiza una pequeña incisión en la zona intraescapular tras haber desinfectado la zona con clorhexidina. Se atraviesa subcutáneamente hacia el lado ventral del animal, donde se localiza el extremo libre

del catéter unido a un plug. Este pasa subcutáneamente hacia el lado dorsal, donde se conecta a un botón de acceso vascular (Instech Laboratories, ref. VAB62BS/25). Por último, se suturan las incisiones con seda 5/0 (Mersilk Ethicon, ref. W500H) y se comprueba el flujo sanguíneo a través del botón dorsal mediante el uso de una jeringa heparinizada con 200 U/ml de heparina conectadas a un inyector PinPort (Instech Laboratories, ref. PNP3M). Durante todo el procedimiento de cirugía, los ratones siguen una monitorización del pulso, saturación de oxígeno y temperatura mediante el sistema de monitorización de PhysioSuite (Kent Scientific, Alemania).

Solamente los ratones que hayan recuperado al menos 90% de su peso corporal tras 7 días de recuperación serán incluidos en los grupos experimentales. Los animales se someterán a un ayuno de 24 horas o a una restricción calórica antes del inicio de la prueba, momento en el cual se colocan en jaulas de libre movimiento conectados mediante un botón de acceso vascular en el dorso del animal, tal como se describe en el protocolo de Ayala y colaboradores [279]. De esta manera, los animales permanecen libres, conscientes y sin ningún tipo de manipulación durante todo el tiempo que dure la prueba.

4.2.10.2 *Infusión con glucosa tritiada*

Dado que los animales estaban en restricción calórica o en ayuno 24h, no fue necesario someterlos a ayuno el día de la perfusión. Durante la perfusión, los ratones recibieron una infusión de [3-3H]-glucosa (0.05 $\mu\text{Ci}/\text{min}$) (ref. NET331C005MC, Perkin Elmer, EEUU) durante 2h. A los 110 y a los 120 minutos, se midieron los niveles de glucemia con un glucómetro y se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola (25 μl) en un tubo colector con EDTA (ref. 16.444.100, Microvette, Sarstedt AG & Co HG, Alemania). Las muestras de sangre fueron tratadas con 50 μl de 0.3N ZnSO_4 y 50 μl de 0.3N $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y después centrifugadas a 9000 RCFs durante 10 minutos. Tras ese tiempo, se recogió el sobrenadante y se pipetearon 10 μl por duplicado en tubos de centelleo (Pico Prias 6 mL, ref. 6000192, Perkin Elmer, EEUU). Estos se dejan evaporar toda la noche en una campana de extracción de gases y, al día siguiente, se añaden 100 μl de agua destilada y 3 mL de líquido de centelleo (Pico-Fluor Plus, ref. 6013699, Perkin Elmer, EEUU). Por último, se leyó la radiactividad en los tubos en un contador de centelleo líquido Tri-Carb 2810 TR (Científica Andina, Perú). Matemáticamente, el cálculo se basa en la premisa de que el tritio se incorpora a la glucosa

durante la gluconeogénesis, y la liberación de agua tritiada cuando se deja evaporar refleja la tasa de producción de glucosa endógena (Ra o HGP, por sus siglas en inglés). Y por tanto, el Ra se puede calcular dividiendo la actividad de la muestra entre la concentración específica del isótopo, esto es, la actividad del isótopo por unidad de masa.

4.2.11 Análisis histológico del tejido hepático.

En la realización de esta tesis, se realizaron tinciones histológicas para estudiar el posible efecto de la manipulación de la nedilación en el hígado. Las muestras de hígado se recogen en cestillas y se embeben en formalina (Bio-Optica, ref. 65-30001) durante el sacrificio. Tras 24 h, se cambia la formalina por etanol 70%.

4.2.11.1 Hematoxilina/eosina

Para realizar esta tinción, el tejido previamente fijado con formalina se incluye en parafina para ser seccionado en un micrótopo. Los cortes de parafina se tratan con xilol para eliminar los excesos de la misma. A continuación, los cortes se pasan por un proceso de rehidratación, consistente en alcoholes de concentración decreciente (100, 95 y 70°). Tras un lavado con H₂O destilada, se sumergen en hematoxilina (Bio Óptica) durante 10 minutos, se lavan e inmediatamente de pasar por un alcohol ácido. Tras el lavado, se sumergen 30 segundos en eosina (Bio Óptica). Para deshidratar la muestra, los cortes se pasan por los mismos alcoholes en graduación creciente y, antes de montar, se dejan sumergidos 10 minutos en xilol. Los portaobjetos se montan en medio de montaje acuoso. Esta técnica nos permite visualizar la estructura general del tejido y, dado que la hematoxilina es de naturaleza catiónica (básica), tiñe de azul las estructuras basófilas (ácidas) como los núcleos celulares; y la eosina, que es de naturaleza ácida, tiñe de rosa las estructuras de naturaleza básica, como el citoplasma.

4.2.11.2 Inmunohistoquímica

Esta técnica nos permite detectar la presencia y localización de determinadas proteínas en el propio tejido. En el desarrollo de este proyecto de investigación, se utilizó la inmunohistoquímica para comprobar la reducción en los niveles de NAE1 y NEDD8 en los modelos animales donde se silenciaban estos genes. Para ello, las muestras fijadas en parafina fueron desparafinadas, hidratadas, pretratadas en *buffer* THE PTLINK pH9 y bloqueadas con

peroxidasa 3% durante 10 minutos. A continuación, las secciones fueron incubadas toda la noche con el anticuerpo primario (NAE1: Cell Signaling, ref.14321S; NEDD8: Abcam, ref. ab81264) a temperatura ambiente y a una concentración 1:100. Al día siguiente, se incubó las secciones con el anticuerpo secundario (EnVision, DAKO) 30 minutos a temperatura ambiente para, finalmente incubar 1 minuto con el revelador 3,3'-diaminobenzidina (DAB), que es sustrato de la peroxidasa que va conjugada al anticuerpo secundario y, en presencia de peróxido de hidrógeno, se produce una reacción química que resulta en la formación de un precipitado insoluble de color marrón en el lugar donde se encuentra el antígeno de interés. Tras eso, se contratiñe con hematoxilina de Mayer durante 10 minutos, se deshidrata y se monta en portaobjetos. El precipitado marrón es visualizado bajo el microscopio.

Una vez obtenidas las tinciones, se observaron y fotografiaron los cortes histológicos con un microscopio óptico BX51 equipado con una cámara digital DP70 (Olympus), utilizando los objetivos de 10, 20 y 40 aumentos. Se analizaron al menos 8 animales por grupo experimental, y se tomaron 3 fotografías por muestra.

4.2.12 Sacrificio, recogida de tejidos y muestras.

Al final de los experimentos, los animales fueron sacrificados por decapitación. Se recogieron muestras de sangre del tronco y se mantuvieron a 4°C hasta que pudieron ser centrifugadas durante 15 minutos a 6000 RCF. Luego de ser centrifugadas, se recogió el suero y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis molecular.

Las muestras de hígado fueron obtenidas como porciones procedentes del lóbulo lateral izquierdo y fueron rápidamente congeladas en hielo seco y almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis molecular. Para análisis histológicos, se introdujo una pequeña muestra de hígado embebida en formaldehído 4% (Bio-Optica, ref. 65-30001) para su posterior inclusión en parafina.

4.3 Cultivos celulares

La línea celular de hepatocito de ratón AML12 (*Alfa Mouse Liver 12*) fue obtenida de ATCC (*American Type Culture Collection*, Virginia, EEUU; ref. CRL-2254). Estas presentan morfología epitelial y fueron obtenidas a partir de hepatocitos de un ratón de tres meses de edad (cepa CD1, línea MT42) transgénico para TGF α humano. Por microscopía electrónica, estas células exhiben características típicas de hepatocitos, como peroxisomas y estructuras

tipo canalículos biliares. Además, estas células mantienen la capacidad de expresar albúmina, α -1-antitripsina y transferrina.

Estas células crecen en medio de cultivo DMEM: F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU, ref. 11330-032) suplementado con 0,005 mg/ml de insulina, 0,005 mg/ml de transferrina, 5 ng/ml de selenio (ITS; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU, ref. 12097549) y 40 ng/ml de dexametasona (Sigma Aldrich, EEUU, ref. D2915-100MG), 10% de suero bovino fetal y 1% de solución penicilina-estreptomicina (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU, ref. 15070-063). Las células se mantuvieron en una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C y se evaluaron de forma rutinaria para detectar micoplasma. En la rutina de mantenimiento de la línea celular en cultivo, las células se cultivaron en placas de 56,7 cm² (Thermo Fisher Scientific, EEUU, ref. 150464;150350), y cuando alcanzaron una confluencia en torno al 80%, se les retiró el medio, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) y se incubaron con tripsina-EDTA 0,25% (Thermo Fisher Scientific, EEUU, ref. 25200072). Se subcultivaron en una ratio 1:10 y el medio se renovó cada 2-3 días. Para todos los experimentos, se sembraron $2,5 \times 10^6$ en un plato de seis pocillos (9,6 cm² cada pocillo).

4.3.1 Tratamientos celulares

4.3.1.1 Transfecciones

Para el estudio de los efectos de la nedilación en el metabolismo hepático, utilizamos dos aproximaciones: sobreexpresión del gen PCK1 WT o mutante, y el silenciamiento con siRNAs (*small interfering RNA*) de NAE1, NEDD8 y PCK1.

4.3.1.1.1 Silenciamiento de NAE1, NEDD8 y PCK1 en la línea celular AML12

Las células se transfectaron con ARN de pequeña interferencia (siRNA) específico contra NAE1 (Dharmacon, ref. 8883), NEDD8 (Dharmacon, Colorado, EEUU, ref. 4738), o PCK1 (Dharmacon, Colorado, EEUU, ref. L-006796-00-0005). Como control negativo, se utilizó siRNA no dirigido (Dharmacon, Colorado, EEUU, ref. D-001810-10-05). La transfección se realizó utilizando el reactivo Dharmafect 1 (Dharmacon, Colorado, EEUU, ref. t-2001-03) siguiendo el protocolo: 50 pmol de siRNA diluidos en 200 μ l de optiMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU, ref. 31985-070) se mezcló con 6,5 μ l de Dharmafect

1 diluido en 193,5 µl de optiMEM. Se añadió la mezcla a cada pocillo, y se completó con medio DMEM:F12 completo hasta un volumen final de 1,5 ml. Tras 48 horas después de la transfección, se recogió el medio, para el kit de producción de glucosa, o las células para extracción de proteínas o para el kit de actividad PCK1.

4.3.1.1.2 *Sobreexpresión de PCK1 en la línea celular AML12*

Para regular positivamente la expresión de PCK1, las células se transfectaron con un plásmido que codifica para PCK1 WT (Origene, Maryland, EEUU, ref. RC204758), o PCK1 mutado: PCK1K387R (Vector Builder, Chicago, EEUU, ref. VB210901-1404whn) y PCK1K278R-K342R-K387R (Vector Builder, Chicago, EEUU, ref. VB210921-1406frv). Se utilizó Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Thermofisher Scientific, EEUU, ref. 11668-019) para transfectar las células siguiendo el siguiente protocolo: 4 µl de Lipofectamine 2000 diluidos en 150 µl de Opti-MEM mezclado con 2,5 µg de ADN diluido en 150 µl de Opti-MEM. Esta mezcla se incubó en un volumen final de 1,5 ml de medio DMEM:F12 completo durante 24 horas. Tras ese tiempo, se recogió el medio, para el kit de producción de glucosa, o las células para extracción de proteínas o para el kit de actividad de PCK1.

4.3.1.2 *Estudio del efecto del estado nutricional*

En todos los experimentos en los que las células AML12 fueron sometidas a ayuno durante 6 horas, con el medio de ayuno Krebs-Henseleit-HEPES (KHH), compuesto según lo indicado en la tabla 2. El KHH constituye un medio de ayuno muy relevante para el estudio de la gluconeogénesis [280], y no contiene nutrientes ni hormonas.

Tabla 2. Composición del medio de ayuno KHH.

Compuesto	Concentración
NaCl	120 mmol/L
KCl	4.7 mmol/L
CaCl ₂	2.5 mmol/L
MgSO ₄	1.2 mmol/L
KH ₂ PO ₄	1.2 mmol/L
NaHCO ₃	25 mmol/L
HEPES pH 7.4	25 mmol/L

Para estudiar la regulación de NAE1 por la glucosa *in vitro*, se incubó a las células en medio KHH, en presencia o ausencia de glucosa (*D-glucose*, Sigma Aldrich, EEUU, ref. G8270) 1 mM durante 6 horas.

4.3.1.3 Tratamiento con MLN4924

Para estudiar el efecto del bloqueo de la nedilación *in vitro*, se utilizó MLN4924 (MedChemExpress, New Jersey, EEUU, ref. HY-70062), también llamado Pevonedistat, un conocido inhibidor de NAE1 [255]. Se utilizó una dosis de 10 μ M durante 24h.

4.3.1.4 Medición de la glucosa en el medio.

Para evaluar la producción hepática de glucosa *in vitro*, las células fueron incubadas en medio KHH suplementado con lactato 20 mM y piruvato 2 mM, para potenciar la gluconeogénesis [69, 281]. Las células se mantuvieron 6 horas en dicho medio para realizar los ensayos donde se inhibió el PCK1 endógeno; y donde se recuperó la expresión con un PCK1 WT o con un PCK1 mutando en un (K387) o en tres (K278R-K342R-K387R) residuos de lisina, y donde se inhibió la nedilación con MLN4924.

La cantidad de glucosa producida por los hepatocitos y liberada al medio se cuantificó utilizando el *High Sensitivity Glucose Assay Kit* (Sigma Aldrich, EEUU, ref. MAK181-1KT). Se trata de un kit fluorimétrico muy sensible, capaz de detectar cantidades de glucosa en un rango de 20-100 pmol/pocillo. En la realización de estos ensayos, se añadió 1 ml de medio de KHH + piruvato + lactato a cada pocillo de una placa de 6 pocillos, donde las células se sembraron siguiendo el proceso habitual. La adición de 1 ml de medio, en lugar del 1.5 ml habitual, facilita la concentración de la glucosa producida por las células hepáticas, y su posterior determinación. Posteriormente, se realiza el protocolo siguiendo las instrucciones del fabricante, cargando 50 μ l de medio por muestra, y por duplicado, en una placa de 96 pocillos, para su posterior análisis. La concentración de glucosa de cada muestra se determina mediante un ensayo enzimático acoplado, que da como resultado un producto fluorimétrico ($\lambda_{ex} = 535/\lambda_{em} = 587$ nm) proporcional a la glucosa presente. Finalmente, los resultados se normalizan por la cantidad de proteína del lisado celular.

4.3.1.5 Determinación de la actividad enzimática de PCK1.

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

4.4 Muestras de hígado de pacientes.

Las muestras de hígado de pacientes se obtuvieron de pacientes con obesidad mórbida sometidos a cirugía bariátrica (n=60) en la Clínica Universidad de Navarra. Se definió la obesidad como IMC (índice de masa corporal) ≥ 30 kg/m² y un porcentaje de grasa corporal $\geq 35\%$. El IMC se calculó como el peso en kilogramos dividido por la altura al cuadrado en metros, y el porcentaje de grasa corporal se estimó por el método de la pletismografía por desplazamiento de aire (Bod-Pod®, Life Measurements, Massachusetts, EEUU).

Los pacientes con obesidad fueron clasificados en dos grupos, normoglucémicos (NG) o diabéticos tipo 2 (DT2), siguiendo el criterio del Comité de Expertos en Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes [282]. Los criterios de inclusión abarcaron una evaluación diagnóstica completa, que incluyó un examen físico, investigación en el laboratorio, ecografía por ultrasonido y biopsia hepática consistente con el diagnóstico de enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) por un patólogo experto, siguiendo los criterios de Kleiner y Brunt [283]. Los criterios de exclusión fueron: a) consumo de alcohol excesivo (≥ 20 gramos para mujeres y ≥ 30 gramos para hombres); b) la presencia del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B o la presencia de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C en pacientes con ausencia de antecedentes de vacunación; c) uso de drogas relacionadas con la EHGNA, donde se incluyen la amiodarona, valproato, tamoxifeno,

metotrexato, corticosteroides o antiretrovirales; d) evidencia de otras enfermedades hepáticas específicas, como la hepatitis autoinmune, hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, o la deficiencia de α -1 antitripsina. Los pacientes con diabetes tipo 2 no estaban en tratamiento con insulina u otros fármacos que pudiesen influir en los niveles endógenos de insulina. Cabe destacar que los pacientes con diabetes tipo 2 no presentaban un diagnóstico de diabetes superior a los 3 años previos (menos de 2-3 años de diagnóstico, e incluso diagnóstico *de novo*, como se evidencia por sus anamnesis y determinaciones bioquímicas).

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

Todo el proceso de investigación con muestras de pacientes humanos se llevó a cabo con conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki, revisada en 2013, y aprobada por el Comité Ético del Hospital responsable de la investigación (protocolo 2021.005) (anexo 2). Se obtuvo el consentimiento por escrito de todos los participantes (anexo 3).

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

El cálculo del índice HOMA-IR (del inglés "*Homeostasis Model Assessment*") se realizó siguiendo el modelo desarrollado en 1985 por Matthews y colaboradores [284], en el que a partir de los valores de glucosa e insulina en ayunas se pueden realizar las estimaciones de resistencia a insulina y función de las células β .

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \text{Insulinemia en ayunas (mU/mL)} \times \frac{\text{Glucemia en ayunas (mmol/L)}}{22,5}$$

4.5 Análisis molecular

4.5.1 Análisis de la expresión proteica mediante *Western Blot*.

4.5.1.1 Extracción de proteínas totales y preparación de las muestras.

Una vez realizado el correspondiente ensayo, en el caso de cultivos celulares, se realizaron dos lavados con PBS y se le añadió a cada pocillo un volumen de tampón de lisis (tabla 3) que cubriese la superficie (aproximadamente 120 μ L). A continuación, se desprendieron las células de la superficie del pocillo con un raspador (Falcon, ref.353085) y se recogió la suspensión en un tubo de polipropileno de 1,5 mL. En el caso de muestras de hígado conservadas a -80 °C, se obtuvo una pequeña porción para su procesamiento. Las muestras deben mantenerse en hielo durante todo el proceso, para evitar la degradación de las proteínas. El tejido y el tampón de lisis se colocaron junto con una bolita de acero en un tubo de polipropileno de 2 ml, y se homogenizaron en el *Tissue lyser* durante 4 minutos a una frecuencia de 25 agitaciones por segundo. El tampón de lisis facilita, junto con la homogenización mecánica, la rotura del tejido y los componentes celulares, disolviéndose las proteínas del tejido en el mismo.

Tabla 3. Composición del tampón de lisis disuelto en agua destilada.

Compuesto	Referencia y casa comercial	Concentración
Tris-HCl ph 7.5	T6066, MERCK	50 mM
EGTA	E3889, MERCK	1 mM
EDTA	E9884, MERCK	1 mM
Triton X-100	X100, MERCK	1% vol/vol
Ortovanadato sódico	S6508, MERCK	1 mM
Fluoruro sódico	S7920, MERCK	50 mM
Pirofosfato sódico	221368, MERCK	5 mM
Sacarosa	84097, MERCK	0.27 mM
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	P7626, MERCK	1 mM
Cocktail inhibidor proteasas (ROCHE)	11836145001, ROCHE	1 pastilla/50mL

A continuación, se centrifugaron las muestras a 12000 RCF a 4 °C durante 10 minutos en el caso de extractos celulares, o 25 minutos en el caso de extractos de hígado, en una centrífuga

(Eppendorf 5415R). El sobrenadante (extracto proteico) se traspasó a un nuevo tubo, descartando el precipitado (restos celulares) y la capa superior de grasa.

4.5.1.2 Cuantificación de los extractos proteicos.

Para cuantificar la cantidad de proteína contenida en el extracto, realizamos un método colorimétrico con la solución Bradford (Bio-rad *Protein Assay Kit*). Este método se basa en el cambio de color del colorante *Coomasie brilliant blue G-250* en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. El característico color marrón de este compuesto se vuelve azul en presencia de proteínas.

Se preparó una curva patrón de seroalbúmina bovina con diluciones seriadas a partir de la máxima concentración (1 mg/mL). Se cargaron 5 μ l (en el caso de extractos celulares) o 10 μ l (en el caso de extractos de hígados previamente diluidos 1:70 en agua destilada) de las muestras por duplicado y 10 μ L de las diluciones seriadas de BSA también por duplicado, en una placa multipocillo (Deltalab, España, ref. 900011). A cada uno de los pocillos se les añadió 250 μ L de reactivo Bradford (dilución 1:5) y se midió la absorbancia a 550 nm en el espectrofotómetro (Multiskan GO, Thermo Scientific, Massachusetts, EEUU) tras ser previamente incubados a 37 °C durante 5 minutos.

4.5.1.3 Preparación de las muestras para electroforesis en SDS-PAGE.

Tras la cuantificación, se prepararon las muestras junto con el tampón de carga (tampón de Laemmli, tabla 4). Este tampón permite dotar a todas las proteínas de carga negativa en proporción a su tamaño, gracias al dodecil-sulfato sódico (SDS) y además permite su desnaturalización gracias al β -mercaptoetanol, el cual elimina los puentes disulfuro. Todas las muestras deben tener la misma concentración final para que en el volumen de carga en la electroforesis (16 μ L) haya 8 μ g de proteína. Tras añadir el tampón de carga las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos para su completa desnaturalización.

Tabla 4. Composición del tampón de Laemmli disuelto en agua destilada.

Compuesto	Referencia y casa comercial	Concentración
Tris-HCl pH 6.7		250 mM
Glicerol	G5516, MERCK	50% vol/vol
Dodecilsulfato sódico (SDS)	L4509, MERCK	10% peso/vol
β -mercaptoetanol	M3148, MERCK	5% vol/vol
Azul de bromofenol	8122, MERCK	0.0005% peso/vol

4.5.1.4 Electroforesis SDS-PAGE.

Esta técnica consiste en la separación de las proteínas, de carga negativa, por su peso molecular. Se incluyen las muestras en un gel de acrilamida-bisacrilamida y, al aplicarle corriente eléctrica, las proteínas migran a través del gel hacia el polo positivo de la corriente. El gel está formado por dos fracciones:

- Gel concentrador: se localiza en la parte superior sobre el que se incluye un peine para formar los pocillos donde se cargarán las muestras (tabla 5).
- Gel separador: permite la separación de las proteínas. La concentración de acrilamida-bisacrilamida determinará el tamaño del poro de la malla formada por el gel, y por tanto el grado de separación de las proteínas según su tamaño (tabla 6).

Tabla 5. Composición del gel SDS-PAGE concentrador.

Compuesto	Referencia y casa comercial	Volumen (mL)		
		8%	10%	15%
H2O destilada		11.5	9.9	1.5
30% Acrilamida/Bis 29:1	1610156, Bio-Rad	6.7	8.3	5
Tris-HCl 1 M pH 8.8		6.3	6.3	3.3
Dodecilsulfato sódico (SDS) 10%	L4509, MERCK	0.25	0.25	0.1
Amonio persulfato (APS) 10%	A3678, MERCK	0.25	0.25	0.1
Tetrametil-etilendiamina (TEMED)	T9281, MERCK	0.015	0.01	0.01

Tabla 6. Composición del gel SDS-PAGE separador a porcentajes 8, 10 y 15.

Compuesto	Referencia y casa comercial	Volumen (mL)
H ₂ O destilada		4.1
30% Acrilamida/Bis 29:1	1610156, Bio-Rad	1
Tris-HCl 1 M pH 6.8		0.75
Dodecilsulfato sódico (SDS) 10%	L4509, MERCK	0.06
Amonio persulfato (APS) 10%	A3678, MERCK	0.06
Tetrametil-etilendiamina (TEMED)	T9281, MERCK	0.006

Los geles, colocados en un equipo Mini-PROTEAN Tetra Cell (165-8004, Bio-Rad) se sumergieron en *buffer* de electroforesis, y se cargaron 16 µl de cada muestra en los pocillos del gel. En el primer pocillo de todos los geles se cargó el marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Standards-Dual Color*, Bio-Rad, ref. 161-0374). Las condiciones de electroforesis fueron: voltaje constante de 120 V aplicados con un equipo *PowerPac HC High Current Power Supply* (Bio-Rad, ref. 164-5052) durante 1-2 horas. La composición del *buffer* de electroforesis (en H₂O destilada) se encuentra en la tabla 7.

Tabla 7. Composición del tampón de electroforesis disuelto en agua destilada.

Compuesto	Referencia y casa comercial	Cantidad
Tris-HCl	T6066, MERCK	200 mM
Glicina	G7126, MERCK	20 mM
Dodecilsulfato sódico (SDS)	L4509, MERCK	1% peso/vol

4.5.2 Transferencia semi-húmeda.

Una vez que haya terminado la electroforesis, el siguiente paso es la transferencia a un soporte sólido, para lo cual utilizamos membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,2 µM (BioRad, ref. 1620177). Un paso previo es la activación de las membranas, sumergiéndolas en metanol (Carlo Erba, ref. 414816), agua destilada y, por último, en tampón de transferencia (tabla 8). A continuación, se realiza el montaje, de manera que el gel quede en contacto con la membrana y con una esponja húmeda (Extra Thick Blot Paper,

BioRad, ref. 1703960) a cada lado en un equipo *Trans-blot Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad, ref. 170-3940). Se conecta la unidad de transferencia a una fuente de alimentación (BioRad) a un amperaje 0,8 mA/ cm² aplicados con un equipo *PowerPac HC High Current Power Supply* durante 1 hora y 40 minutos.

Tabla 8. Composición del tampón de transferencia disuelto en agua destilada.

Compuesto	Referencia y casa comercial	Cantidad
Tris-HCl	T6066, MERCK	40 mM
Glicina	G7126, MERCK	40 mM
Dodecilsulfato sódico (SDS)	L4509, MERCK	0.36% peso/vol
Metanol	414816, Carlo Erba Reagents	20% vol/vol

4.5.2.1 Inmunodetección de proteínas.

4.5.2.1.1 Bloqueo.

Tras la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF, éstas se incubaron en una solución 5% (m/v) BSA en buffer de lavado TBS-T en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. La composición del *buffer* de lavado TBS-T es la siguiente (en H₂O destilada) se describe en la tabla 9.

Tabla 9. Composición del tampón de lavado de membranas disuelto en agua destilada.

Compuesto	Referencia y casa comercial	Cantidad
Tris-HCl		20 mM
NaCl		146 mM
Tween-20	P9416, MERCK	0,1% vol/vol

Con el bloqueo, la albúmina en solución se une a todos aquellos lugares de la membrana que no estén ya ocupados por las transferidas desde el gel, disminuyendo el ruido de fondo y los falsos positivos.

4.5.2.1.2 Incubación con anticuerpo primario.

El siguiente paso fue incubar las membranas con el anticuerpo específico contra la proteína de estudio (tabla 10). El anticuerpo se diluyó según las recomendaciones de la casa comercial (1:500 o 1:1000) en BSA al 3% y se dejó incubando en agitación durante toda la noche a 4 °C (o una hora a temperatura ambiente si se trataba de una proteína constitutiva). Tras la incubación se realizaron 3 lavados con TBS-T para eliminar los restos de anticuerpo primario que no se hubiesen unido.

Tabla 10. Lista de anticuerpos utilizados en esta tesis.

Proteína diana	Casa comercial (referencia)	Reactividad de especie	Dilución
NEDD8	Abcam (ab81264)	Monoclonal conejo	1:1000
Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa 1 (PCK1)	Abcam (ab70358)	Policlonal conejo	1:1000
Enzima activadora de NEDD8 (NAE1)	Cell Signaling (143215)	Monoclonal conejo	1:1000
Glucosa 6-Fosfatasa (G6Pase)	Abcam (ab93857)	Monoclonal conejo	1:1000
Piruvato Carboxilasa (PC)	Abcam (EPR7366)	Monoclonal conejo	1:1000
Cullin-2	Santa Cruz (sc-166506)	Mouse monoclonal	1:1000
Gliceraldehideo 3- fosfato Deshidrogenasa (GAPDH)	Merck (CB1001)	Mouse monoclonal	1:5000
UBE1	Cell Signaling (4891)	Policlonal conejo	1:1000
α -Tubulina	Sigma (T5168)	Monoclonal ratón	1:5000
β -Actina	Sigma (A5316)	Monoclonal ratón	1:5000
Secundario conejo policlonal anti-ratón	DAKO (P0260)		1:5000
Secundario cabra policlonal anti-conejo	DAKO (P0448)		1:5000

4.5.2.1.3 Incubación con anticuerpo secundario.

Para detectar la presencia de la proteína y amplificar la señal del anticuerpo primario, al día siguiente, las membranas fueron lavadas con buffer de lavado TBS-T, tres veces durante 5 minutos. Entonces se incubaron las membranas con una solución 3% (m/v) BSA en buffer de lavado TBS-T que contiene el anticuerpo secundario específico (Tabla 9) para el anticuerpo primario utilizado, a una concentración 1:5.000, en agitación y a temperatura

ambiente durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios utilizados están asociados a la enzima peroxidasa.

4.5.2.1.4 *Detección por quimioluminiscencia.*

Para detectar el anticuerpo secundario se incubaron las membranas con una mezcla 1:1 de sustrato de la peroxidasa y potenciador de quimioluminiscencia (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*, Thermo Scientific, ref.32106). Inmediatamente después, para detectar la reacción que tiene lugar, se colocaron las membranas en un cassette de autorradiografía (*Hypercassette*, Amersham Biosciences).

El revelado tuvo lugar en una sala oscura en donde, para la visualización, se utilizaron películas radiográficas Fujifilm (*FujiMedical X-Ray Fil Super RX*, Fujifilm Corporation, ref. 47410 19289). Estas hojas de revelado se introdujeron en el cassette de autorradiografía sobre las membranas y se dejó exponer la señal quimioluminiscente durante unos minutos, en función de la proteína.

Posteriormente se retiró la película y se sumergió en una solución reveladora (dilución 1:10) (*Developer/Replenisher*, Agfa-Gevaert Group, ref. G150) hasta que se visualizó la señal buscada, en cuyo momento se sumergió la película en el líquido fijador (dilución 1:10) (*Manual Fixing Bath*, Agfa-Gevaert Group, ref. G354) durante unos segundos con el fin de fijar la señal.

4.5.2.2 *Cuantificación de la densidad óptica de las bandas.*

Las imágenes de las películas fotográficas fueron digitalizadas con un escáner de alta resolución (resolución 400-800 ppp, CanonScan 9900F, Canon). Para determinar la cantidad relativa de proteína en cada muestra, se utilizó el programa Image J 1.6.0 (ImageJ 1.40g, National Institutes of Health). El estudio cuantitativo se realizó corrigiendo la densidad óptica de las señales de inmunodetección por la señal de fondo de cada placa; estos valores se relativizaron con respecto al control constitutivo (GAPDH) de cada membrana.

4.5.3 **Detección de hormonas en suero.**

Los niveles de adrenalina (Cusabio Technology LLC, Houston, EEUU, ref. CSB-E08679m-96T), cortisol (Enzo Life Sciences, Nueva York, EEUU, ref. ADI-900-097), glucagón (Mercodia, Upsala, Suecia, ref.10-1281-01), e insulina (Merck, Darmstadt, Alemania, ref.

EZRMI) se llevó a cabo mediante kits de ELISAS comerciales siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

4.5.4 Detección de metabolitos en suero.

La detección en suero de aminoácidos totales (Abbeexa, Cambridge, R.U., ref. 298965) y L-alanina (Abcam, Cambridge, R.U., ref. 83394), y acetil-CoA (Abcam, Cambridge, R.U., ref. ab87546) en hígado y suero de ratones sometidos a restricción calórica del 60% o a ayuno 24 h, se llevó a cabo mediante kits comerciales específicos siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

4.5.5 Immunoprecipitación de PCK1.

Los extractos (preparados a partir de 1 mg de proteína) se examinaron mediante inmunotransferencia. Para el ensayo de inmunoprecipitación, los extractos de hígado se incubaron con 1 µg de anticuerpo específico de PCK1 (Abcam, Cambridge, R.U., ref. ab70358) acoplado a proteína G-Sefarosa (Merck, Darmstadt, Alemania, ref. P3296). Después de la incubación durante la noche a 4°C con agitación, las proteínas capturadas se centrifugaron a 10.000 g, se recogieron los sobrenadantes y las perlas se lavaron cuatro veces en tampón de lisis (tabla 3). Las perlas se calentaron durante 5 min a 95 °C en 10 µl de tampón de muestra. Los extractos y los inmunoprecipitados se examinaron mediante electroforesis SDS-PAGE y se transfirieron con anticuerpos contra PCK1 (Abcam, Cambridge, R.U., ref. ab70358) y NEDD8 (Abcam, Cambridge, R.U., ref. ab81264). La membrana se incubó primero con el anticuerpo primario anti-NEDD8 y luego se realizó un procedimiento de extracción de *stripping* basado en β-mercaptoetanol donde se incubó la membrana 30 minutos a 50 °C en agitación (tabla 11) (Merck, Darmstadt, Alemania, ref. M3140) para verificar el PCK1 total inmunoprecipitado.

Tabla 11. Composición del tampón de *stripping* para un volumen final de 50 mL.

Compuesto	Referencia y casa comercial	Volumen (mL)
Tris-HCl pH 6.8		3.125
Dodecilsulfato sódico (SDS) 10%	L4509, MERCK	10
β-mercaptoetanol	M3148, MERCK	0.35

4.5.6 Modelado de proteínas.

Las estructuras de PCK1 y NEDD8 de la especie *Mus musculus* se obtuvieron con el algoritmo de predicción AlphaFold [285]. Todos los modelos de proteínas nediladas se construyeron utilizando la proteína WT como plantilla con UCSF Chimera y los parámetros de enlace isopeptídico se obtuvieron mediante cálculos RHF/6-31G* utilizando GAMESS-US. La matriz de Hesse en coordenadas cartesianas se analizó mediante el método Seminario, utilizando el módulo CartHess2FC de AMBER. Las simulaciones de dinámica molecular (MD) se realizaron con el software OpenMM [286] en una plataforma CUDA con campo de fuerza AMBER ff19SB, malla de partículas Ewald para interacciones electrostáticas de largo alcance con un límite de suma de Ewald de 10 Å y restricción de la longitud de todos los enlaces que involucran un átomo de hidrógeno. Cada sistema se solvató con moléculas de agua modelo de agua rígida (OPC) de 4 puntos y 3 cargas óptimas y se neutralizó con contraiones de cloro y sodio de acuerdo con la carga total de la proteína. En primer lugar, cada sistema se sometió a 2500 pasos de minimización de energía a 298 K. Se utilizó un termostato Langevin para controlar la temperatura con un coeficiente de fricción de 1 ps⁻¹ y un tamaño de paso de 0,002 ps. Para evaluar los movimientos de residuos y átomos, cada sistema se sometió a una simulación MD de 250 ns y se guardaron instantáneas de las trayectorias cada 1 ps. Finalmente, el análisis de trayectoria se realizó con el módulo CPPTRAJ de AMBER [229]. Las representaciones gráficas y análisis adicionales se realizaron con OriginPro 2019b y gráficos moleculares con UCSF ChimeraX.

4.5.7 Cuantificación de proteína por SWATH-MS (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra) en experimentos de pull-down.

El análisis se realizó como lo describió anteriormente nuestro grupo [287]. Brevemente, el método utilizado incluye: creación de la biblioteca espectral, cuantificación relativa mediante adquisición SWATH, análisis de datos SWATH, análisis espectrométrico de masas mediante LC-MSMS de inmunoprecipitación de PCK1, determinación del sitio de nedilación, y análisis de datos proteómicos. Los datos de proteómica de espectrometría de masas se han depositado en Consorcio ProteomeXchange a través del repositorio de socios PRIDE con el identificador de conjunto de datos PXD043054.

4.5.8 Determinación del sitio de nedilación.

Los archivos sin procesar adquiridos utilizando un método DDA se analizaron con el software PEAKS 8 Studio (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canadá) utilizando una base de datos Uniprot de mouse. La tolerancia de masa del péptido se ajustó a 10 ppm y 0,01 Da para MS/MS. Las modificaciones variables incluidas fueron las siguientes: oxidación de M, carbamidometilación de C y Glygly de K (nedilación de cisteínas) como se describió anteriormente [262, 288, 289]. Para la identificación de péptidos de alta confianza se utilizó una FDR (tasa de descubrimiento falso) del 1 % y un mínimo de 2 péptidos clasificados para el filtrado de péptidos. El análisis funcional se realizó mediante el software de acceso abierto FunRich (herramienta de análisis de enriquecimiento funcional) para el enriquecimiento funcional y el análisis de redes de interacción (<http://funrich.org/index.html>). Para las estadísticas, FunRich utiliza pruebas hipergeométricas, BH y Bonferroni.

4.6 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en los experimentos fueron analizados mediante el programa estadístico *Prism Software Version 6.0* para Windows 10 (*GraphPad Software*, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com). Los datos aparecen expresados como media $\pm$ error estándar de la media. El tamaño muestral de cada grupo experimental aparece detallado en los pies de figura del apartado Resultados. Se excluyeron las muestras y/o animales cuyo valor se desviaba más de 2 veces la desviación estándar (SEM). En todos los análisis, se consideraron significativos (*) los resultados con una $p < 0,05$; muy significativos (**) con una $p < 0,01$ y extremadamente significativos (***) con $p < 0,001$.

Antes de realizar el análisis estadístico, se realizó un test de normalidad para cada serie de datos, donde se utilizó el test Shapiro-Wilks cuando $n \geq 7$ y el test de Kolmogorov-Smirnov cuando $n < 6$. En base a lo obtenido en este test, se aplicaron tests paramétricos (distribución normal) o no paramétricos:

- ❖ Prueba T de student. Compara las medias de dos poblaciones independientes asumiendo que siguen una distribución normal. En un contraste de hipótesis bilateral (2 colas), se estudia la desigualdad entre las medias, siendo la región crítica del estadístico ambas regiones correspondientes a la cola inferior y superior de la distribución. En un contraste

unilateral (1 cola), la desigualdad en la hipótesis señala una sola dirección. A lo largo de esta tesis se utilizó el t-test de dos colas.

- ❖ ANOVA. Se utilizó el test el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si había diferencia entre las medias de tres o más grupos experimentales asumiendo una distribución normal. En caso de aceptar la hipótesis alternativa que indica que sí hay diferencias entre las medias, se realizó un test post-hoc de Bonferroni para comprobar qué medias son las que causaron la significancia.
- ❖ Test Mann-Whitney. Permite comparar la media de dos poblaciones que no siguen una distribución normal.
- ❖ Test Krustal-Wallis. Fue la prueba utilizada para realizar comparaciones entre múltiples poblaciones que no siguen una distribución normal. Posteriormente se aplicó el test de Dunn para determinar entre qué grupos existían diferencias significativas.

En los estudios con pacientes humanos, se evaluó la relación lineal entre las variables niveles de proteína de NAE1 y NEDD8 y niveles de glucosa en ayunas, así como entre niveles de proteínas de NAE1 y NEDD8 y con el parámetro OGTT (niveles de glucosa durante test de tolerancia a la glucosa oral) en los estudios de humanos, mediante el test de correlación de Pearson, ya que los datos mostraron una distribución normal.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 La nedilación hepática se activa durante la privación de nutrientes y es necesaria para mantener los niveles de glucosa en sangre.

5.1.1 La nedilación hepática está regulada por la disponibilidad nutricional.

Dado el papel clave que desempeña el hígado en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, nos cuestionamos si la nedilación podría estar involucrada en la adaptación de la producción de glucosa a la disponibilidad de nutrientes.

Para estudiar si los niveles de proteína de los marcadores de nedilación en el hígado se regulan por el estado nutricional, sometimos a nuestros ratones *wild type* (WT) a un ayuno de 24 horas, con una posterior realimentación *ad libitum* de otras 24 horas. Los animales del grupo control permanecieron con acceso *ad libitum* a dieta estándar durante todo el proceso experimental.

Los ratones que estuvieron en ayunas durante 24 h mostraron niveles elevados de proteína de NAE1, NEDD8 y cullins nediladas hepáticas. Es de destacar que estos niveles inducidos por el ayuno disminuyeron después de la realimentación (Figura 18A). Por el contrario, la enzima ubiquitina E1 (UBE1), que aumenta la nedilación global después de condiciones de estrés [288, 290], no cambió con el ayuno/realimentación (Figura 18B).

El siguiente propósito fue identificar qué señal o componente del estado nutricional es el responsable de la regulación de los niveles hepáticos de los marcadores de nedilación. Y dado que la glucosa circulante se ve altamente afectada por la ingesta de energía, quisimos estudiar si los niveles de glucosa circulante podrían ser los responsables de la regulación de los niveles hepáticos de marcadores de nedilación. Para ello, ayunamos a los ratones durante 24 h, y, la mitad de ellos fueron alimentados con azúcar mediante la ingesta de azucarillos. La ingesta de azucarillos durante el ayuno permite que los animales mantengan unos niveles de glucemia similares a los de los ratones alimentados *ad libitum*, mientras experimentan una pérdida de peso característica del estado de ayuno [291]. Los ratones en ayunas alimentados con azúcar perdieron la misma cantidad de peso que el grupo en ayunas (control) (Figura 18C), sin embargo, sus niveles de glucosa en sangre fueron similares a los de los ratones alimentados *ad libitum* (Figura 18D). Sorprendentemente, observamos que los aumentos inducidos por el

ayuno en los niveles de proteína hepática de NAE1, NEDD8 y cullins nediladas se redujeron en el grupo alimentado con azúcar (Figura 18E).

A continuación estudiamos los efectos de la leptina, cuyos niveles están estrechamente regulados por el estado nutricional (el exceso calórico produce hiperleptinemia, mientras que el déficit calórico induce hipoleptinemia) [292]. Para ello, los ratones WT sometidos a ayuno recibieron la administración de leptina. La elevación inducida por el ayuno de los niveles de proteína de NAE1, NEDD8 y cullins nediladas se mitigó cuando los ratones en ayunas fueron tratados con leptina (Figura 18F). En consonancia con esto, los ratones que carecen del receptor de leptina (ratones *db/db*) mostraron niveles elevados de NEDD8 y cullins nediladas (Figura 18G).

Además, investigamos el efecto de una restricción calórica (RC) alimentando a los ratones sólo con el 40% de su ingesta diaria de alimentos. Descubrimos que los niveles de NAE1 y cullins nediladas, pero no de UBE1, aumentaron significativamente en comparación con los ratones alimentados *ad libitum* (Figura 18H y Figura 18I).

En general, estos datos sugirieron que los niveles de nedilación hepática aumentaron por la deficiencia de nutrientes a través de un mecanismo dependiente del receptor de leptina.

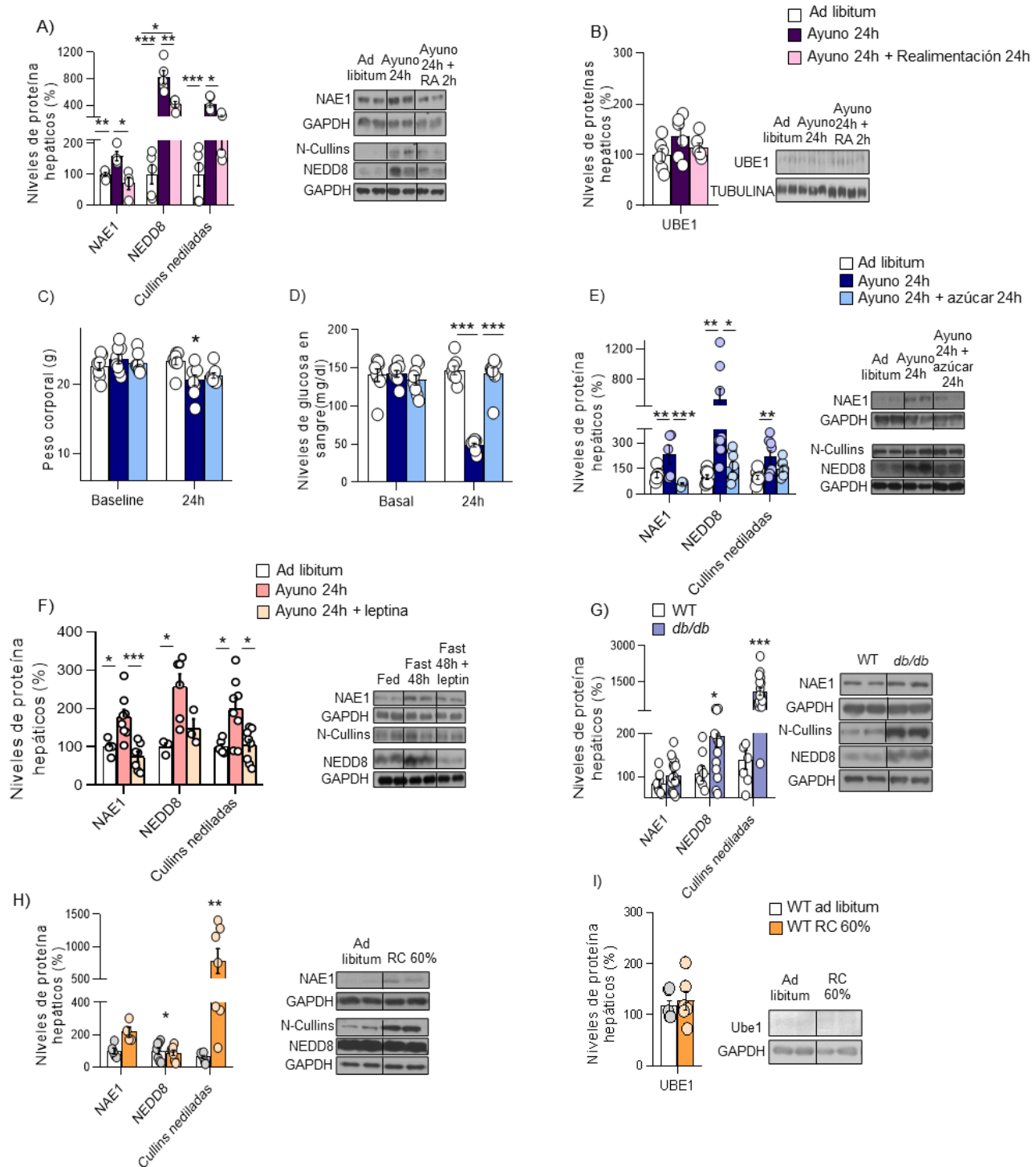


Figura 18. La nedilación se activa durante la privación de nutrientes y es necesaria para mantener los niveles de glucosa en sangre. (A) Niveles de proteína hepática de NAE1, NEDD8 y cullins nediladas después de i) alimentación ad libitum (como control), ii) ayuno de 24 h; o iii) ayuno de 24 h más realimentación durante 24 h (n = 4-5 por grupo). (B) Niveles de proteína UBE1 en el hígado de ratones WT alimentados ad libitum, en ayunas durante 24 h o realimentados durante 24 h después de 24 h de inanición (n = 6 por grupo). (C) Peso corporal y (D) niveles de glucosa en sangre en ratones WT alimentados ad libitum, en ayunas durante 24 h o realimentados con azúcar (n = 6-8 por grupo). Niveles de proteína

hepática de NAE1, NEDD8 y cullins nediladas en las siguientes condiciones: (E) después de i) alimentación ad libitum, ii) ayuno de 24 h; o iii) ayuno de 24 h seguido de una realimentación con azúcar (n = 5 u 8 por grupo). (F) después de i) alimentación ad libitum, ii) ayuno de 24 h; o iii) ayuno de 24 h seguido de leptina i.p. (n = 5-8 por grupo); (G) ratones wild type y db/db; y (H) después de i) alimentación ad libitum; o ii) restricción calórica (RC) (n = 8-18 por grupo). (I) Niveles de proteína UBE1 en el hígado de ratones WT alimentados ad libitum o sometidos a una restricción calórica del 60% (n=6 por grupo). La expresión de GAPDH sirvió como control de carga y los valores fueron normalizados con el grupo control al 100%. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM; dos colas. Prueba t no pareada (G-I) y ANOVA unidireccional seguida de prueba post hoc de Bonferroni (A-F): *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001.

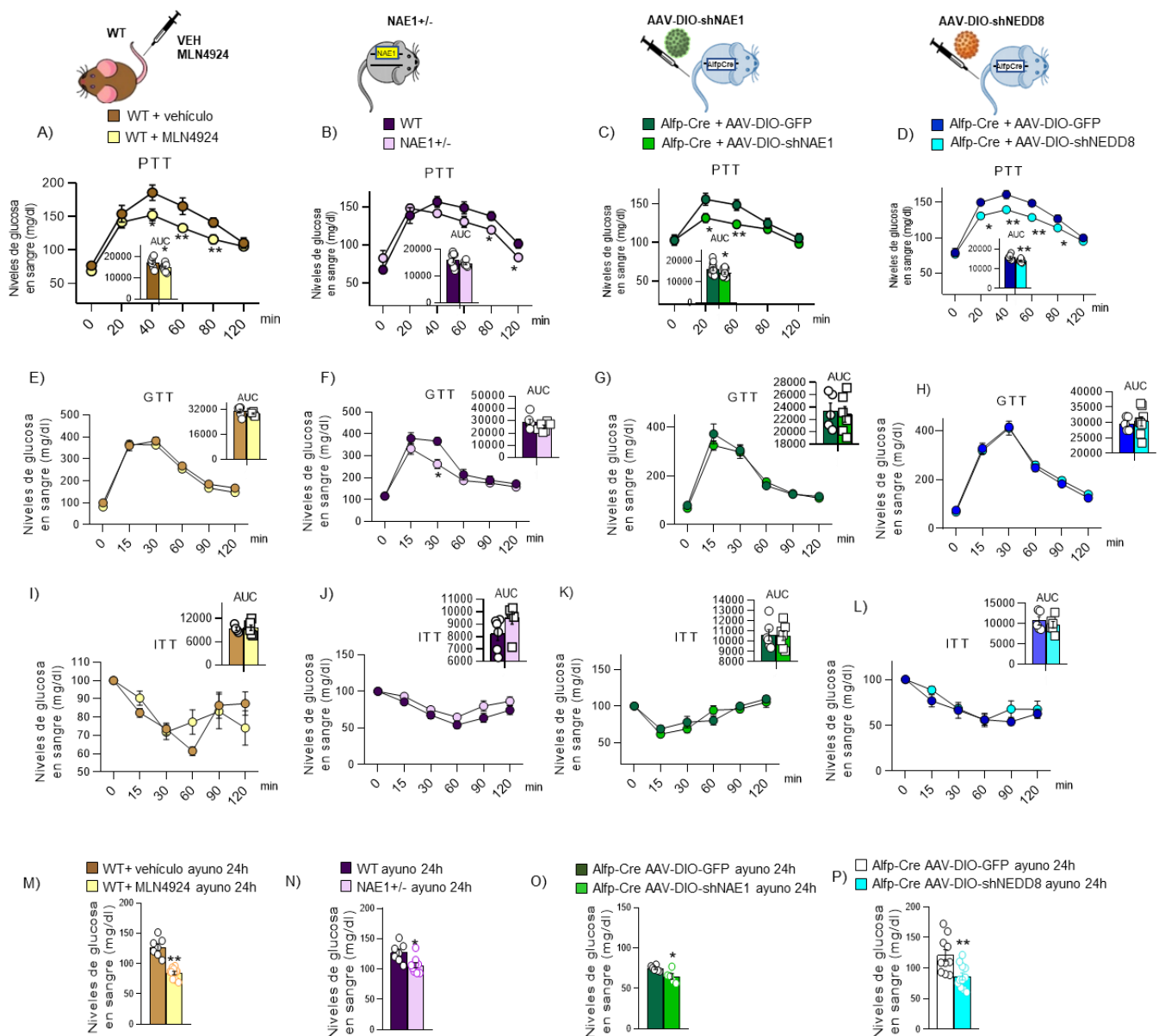
5.1.2 La inhibición de la nedilación hepática reduce la producción de glucosa.

A continuación, nuestro objetivo fue dilucidar el papel fisiológico de la nedilación hepática en el metabolismo de la glucosa. Para ello, utilizamos cuatro modelos de deterioro de la nedilación en ratones: i) inhibición farmacológica utilizando MLN4924, un inhibidor específico de NAE1; ii) ratones heterocigotos Nae1 (NAE1+/-); iii) ratones con una eliminación específica del hígado mediada por shRNA dependiente de Cre de NAE1 (AAV-DIO-shNAE1); y iv) ratones con una eliminación específica del hígado de NEDD8 mediada por shRNA dependiente de Cre (AAV-DIOshNEDD8).

Cada uno de los cuatro modelos animales se dejó en ayunas durante la noche y luego se sometió a una prueba de tolerancia al piruvato (PTT), donde la administración de piruvato estimula agudamente la producción de glucosa por el hígado (HGP). Los cuatro modelos animales de nedilación hepática alterada mostraron niveles de glucosa más bajos en comparación con los ratones control, lo que refleja directamente una alteración en la capacidad gluconeogénica, ya que los depósitos de glucógeno se agotan después de un ayuno nocturno [69] (Figuras 19A-D), sin diferencias en la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina (Figuras 19E-L).

Dados nuestros resultados que muestran niveles bajos de glucosa en sangre durante un PTT cuando se inhibe la nedilación hepática, para estudiar más a fondo el papel específico de la nedilación en la gluconeogénesis hepática y para evitar la contribución de la glucogenolisis al HGP como factor de confusión, en todos nuestros diseños experimentales adicionales, los ratones estuvieron en ayunas durante 24 horas o sometido a una restricción calórica del 60% durante 4 días, condiciones fisiológicas donde los depósitos de glucógeno hepático se agotan.

Después de un ayuno de 24 h, los ratones en todos los modelos mostraron niveles reducidos de glucosa en sangre (Figuras 19M-P). Igualmente, cuando se sometió a RC, ninguno de estos modelos pudo mantener la glucosa en sangre como lo hicieron los ratones control (Figuras 19Q-T), a pesar de mostrar un curso similar de pérdida de peso durante la RC (Figura 19U-X). Consistentemente, en ayunas (Figura 19Y) y restricción calórica (Figura 19Z), los ratones con eliminación hepática de NAE1 mostraron una reducción de la producción hepática de glucosa en comparación con los ratones control hermanos de camada.



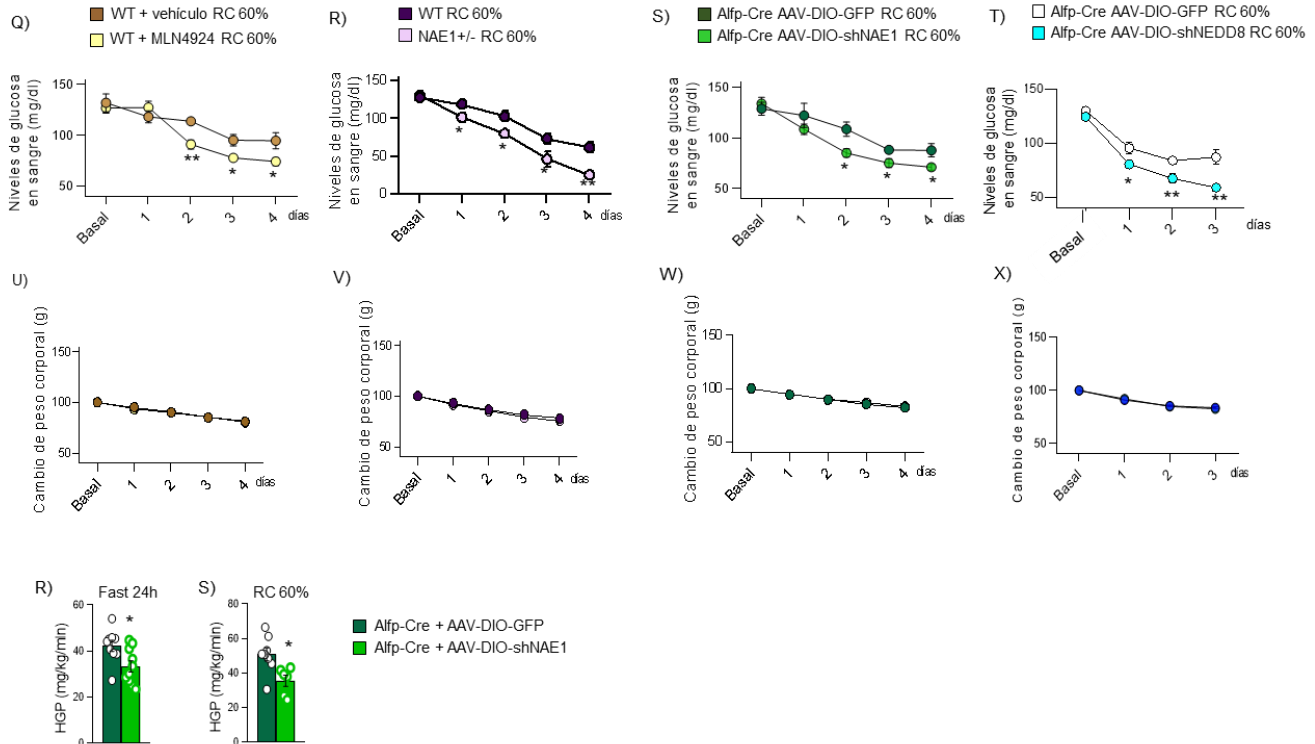


Figura 19. La nedilación es necesaria para mantener los niveles de glucosa en sangre y no afecta a la tolerancia a glucosa o a la sensibilidad a insulina. (A-D), prueba de tolerancia al piruvato (PTT), (E-H) prueba de tolerancia a glucosa (GTT), y (I-L) prueba de tolerancia a insulina (ITT) de (i) ratones wild type (WT) tratados con vehículo o el inhibidor de NAE1 MLN4924, (ii) ratones NAE1+/- o sus hermanos de camada de control, (iii) ratones Alfp-Cre+/- inyectados con AAV-DIO que expresan GFP o shNAE1 y (iv) ratones Alfp-Cre+/- inyectados con AAV-DIO que expresan GFP o shNEDD8. (M-P), niveles de glucosa en sangre después de un ayuno de 24 h para (M) ratones WT tratados con vehículo o MLN4924, (N) ratones NAE1+/- y sus hermanos de camada como control, (O) ratones Alfp-Cre+/- inyectados con AAVDIO que expresa GFP o shNAE1 y (P) Ratones Alfp-Cre+/- inyectados con AAVDIO que expresan GFP o shNEDD8. (Q-T), niveles de glucosa en sangre y (U-X) cambio de peso corporal de ratones sometidos a RC del 60% para (Q, I) ratones WT tratados con vehículo o MLN4924, (R, V) ratones NAE1+/- o sus hermanos de camada de control, (S, W) ratones Alfp-Cre+/- inyectados con AAV-DIO que expresan GFP o shNAE1 y (T, X) ratones Alfp-Cre+/- inyectados con AAV-DIO que expresan GFP o shNEDD8. (R-S) Producción hepática de glucosa (HGP) en ratones Alfp-Cre+/- inyectados con AAV-DIO que expresan GFP o shNAE1 (Y) sometidos a RC del 60% o a (Z) ayuno durante 24h; n = 5–15 por grupo. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. Prueba t no pareada de dos colas: *P < 0,05, y **P < 0,01.

5.1.3 La inhibición de la nedilación hepática reduce la producción de glucosa de manera independiente del sexo.

También estudiamos la nedilación en el hígado de ratones hembra, encontrando un aumento similar en los niveles de proteína NAE1 en ayunas (Figura 20A). Los ratones hembra con una eliminación de NAE1 mediada por shRNA (AAV DIO-shNAE1) mostraron una respuesta similar a la de los ratones macho, ya que los niveles de glucosa en sangre después 24 h de ayuno y el aumento de los niveles de glucosa durante una prueba de tolerancia al piruvato (PTT) fueron más bajos que en los ratones control, pero no después de la

administración de glicerol (GlyTT) (Figura 20B-D), el cual es un sustrato gluconeogénico que se incorpora a la vía gluconeogénica en pasos posteriores a PCK1.

En conjunto, estos hallazgos demuestran que la nedilación juega un papel importante en el mantenimiento de la producción de glucosa por el hígado de forma independiente del sexo.

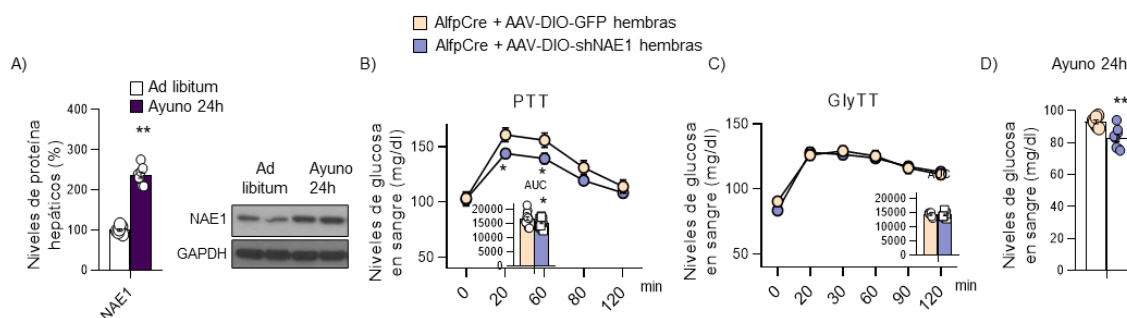


Figura 20. La nedilación también es necesaria para mantener los niveles de glucosa en sangre en hembras. (A) Niveles de proteína de NAE1 en el hígado de ratones hembra wild type sometidos a ayuno durante 24h. (n=7-10 por grupo). (B) Prueba de tolerancia al piruvato (PTT), (C) Prueba de tolerancia al glicerol (GlyTT) y (D) niveles de glucosa en ayunas después de 24 h en ratones hembra Alfp-Cre+/- inyectados con AAV-DIO-GFP o AAV-DIO-shNAE1 (n=6-18 por grupo). La expresión de GAPDH sirvió como control de carga y los valores de control se normalizaron al 100%. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM; Prueba t no pareada de dos colas: *P<0,05, Y **P<0,01.

5.1.4 La inhibición de la nedilación hepática no modifica los niveles de proteínas de enzimas gluconeogénicas o acetil-CoA.

Dado que la inhibición de la nedilación en el hígado disminuyó la capacidad gluconeogénica, medimos la expresión de enzimas gluconeogénicas clave y acetil-CoA en el hígado de dos modelos animales de deterioro de la nedilación: i) inhibición farmacológica usando MLN4924; y ii) ratones con una eliminación de NAE1 mediada por shRNA. Sometimos a estos ratones a 24 horas de ayuno y restricción calórica, y, como era de esperar, los niveles de proteína de piruvato carboxilasa (PC), glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (PCK1) aumentaron en el hígado de los ratones en ayunas y sometidos a restricción calórica (Figura 21A, B, G, H). Sin embargo, no hubo diferencias entre los ratones tratados con vehículo y MLN4924 o entre los ratones control y ratones shNAE1 (Figura 21A-H). De manera similar, no se detectaron diferencias en los niveles hepáticos de acetil CoA después de la inhibición de la nedilación (Figura 21A, B, G, H).

Mantener la homeostasis de la glucosa requiere una respuesta contrarreguladora eficiente de la ingesta/producción de glucosa. Por lo tanto, también medimos los niveles circulantes de hormonas implicadas en la respuesta contrarreguladora de la glucosa, esto es, adrenalina, glucagón y corticosterona, en los modelos descritos anteriormente. No se encontraron cambios entre los ratones de control y aquellos animales donde se atenuó la nedilación (Figura 21C, D, I, J). Los niveles de insulina se redujeron en ratones tratados con shNAE1 en ayunas (Figura 21D), sin cambios en los otros modelos experimentales (Figura 21C, I, J).

Todo ello sugiere que la inhibición de la nedilación hepática no modifica los niveles de hormonas contrarreguladoras.

Finalmente, también se midió el contenido de alanina y los niveles de aminoácidos totales en el hígado, así como los niveles de aminoácidos séricos, en los dos modelos animales de atenuación de la nedilación descritos anteriormente, sometidos a 24 horas de ayuno o a restricción calórica (Figuras 21E, F, K, L). Estas mediciones no detectaron diferencias en el contenido hepático de alanina o aminoácidos totales y los niveles plasmáticos de aminoácidos totales entre los dos modelos animales sometidos a ayuno 24h y a restricción calórica, excepto para los ratones tratados con MLN4924 y los ratones donde NAE1 se silenció en el hígado y se ayunaron durante 24 horas, donde se encontraron niveles más altos de aminoácidos en el hígado (Figuras 21E y F). Como los aminoácidos son importantes sustratos gluconeogénicos durante el ayuno y la restricción calórica, estos resultados indican que la reducción de la producción de glucosa cuando se altera la nedilación hepática no depende de la disponibilidad de aminoácidos.

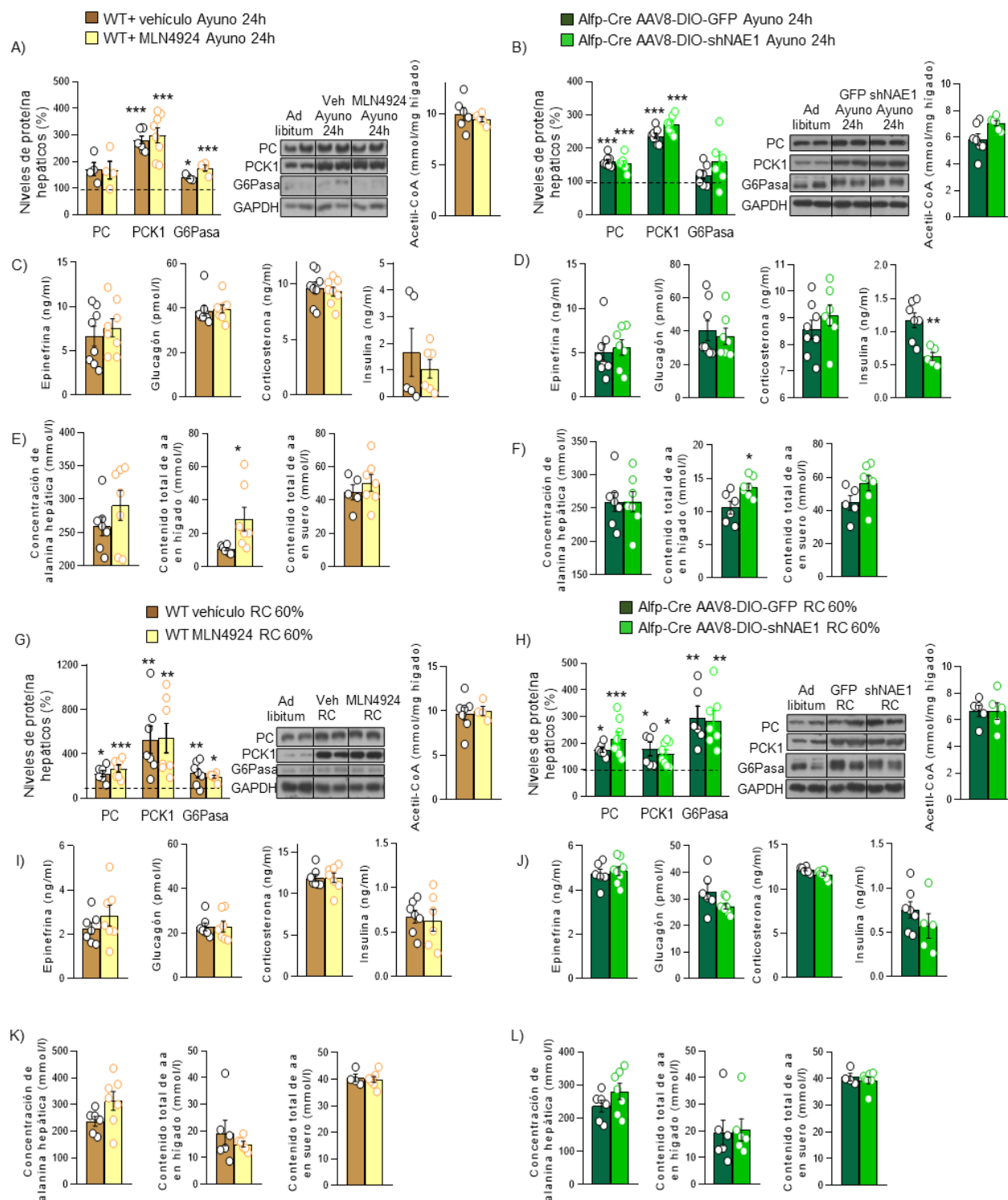


Figura 21. La inhibición de la nedilación hepática no afecta los niveles circulantes de hormonas contrarreguladoras de la glucosa. Niveles de proteína hepática de piruvato carboxilasa (PC), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (PCK1) y glucosa 6-fosfata (G6Pasa) y niveles de acetil-CoA en el hígado; niveles séricos de epinefrina, glucagón, corticosterona e insulina; y contenido de alanina hepática y aminoácidos séricos e hepáticos en ratones WT después de la administración de vehículo o MLN4924 y luego (A, C, E) en ayunas durante 24 h, o (G, I, K) sometidos a restricción calórica; y en ratones

Alfp Cre+/- inyectados con AAV-DIO-GFP o AAV-dioshNAE1 sometidos a (B, D, F) ayuno de 24 h y (H, J, L) restricción calórica. n = 4-8 animales por grupo. La expresión de GAPDH sirvió como control de carga y los valores de control se normalizaron al 100%. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM; ANOVA unidireccional seguido de la prueba post hoc de Bonferroni (paneles izquierdos A, B, G y H) y la prueba t no pareada de dos colas (A-L): *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001.

5.2 La nedilación hepática regula la acción de las hormonas contrarreguladoras.

Dado que nuestros resultados indican que la gluconeogénesis se altera cuando se inhibe la nedilación hepática, queríamos estudiar en detalle si la nedilación estaba involucrada en la respuesta contrarreguladora de la glucosa.

Para resolver esto, tratamos nuestros cuatro modelos de nedilación alterada con glucagón, adrenalina o glucocorticoides, hormonas que estimulan la gluconeogénesis. En ratones normales, esta administración provocó las acciones hiperglucémicas esperadas (Figura 22), con niveles regulados al alza de NAE1 y NEDD8 y cullins nediladas en el hígado (Figuras 23B, D, F). Por el contrario, la deficiencia de nedilación atenuó significativamente los efectos hiperglucémicos del tratamiento hormonal en cada uno de los cuatro modelos (Figura 22). Por tanto, la nedilación media la acción de las hormonas contrarreguladoras de la glucosa y es necesaria para la producción de glucosa hepática.

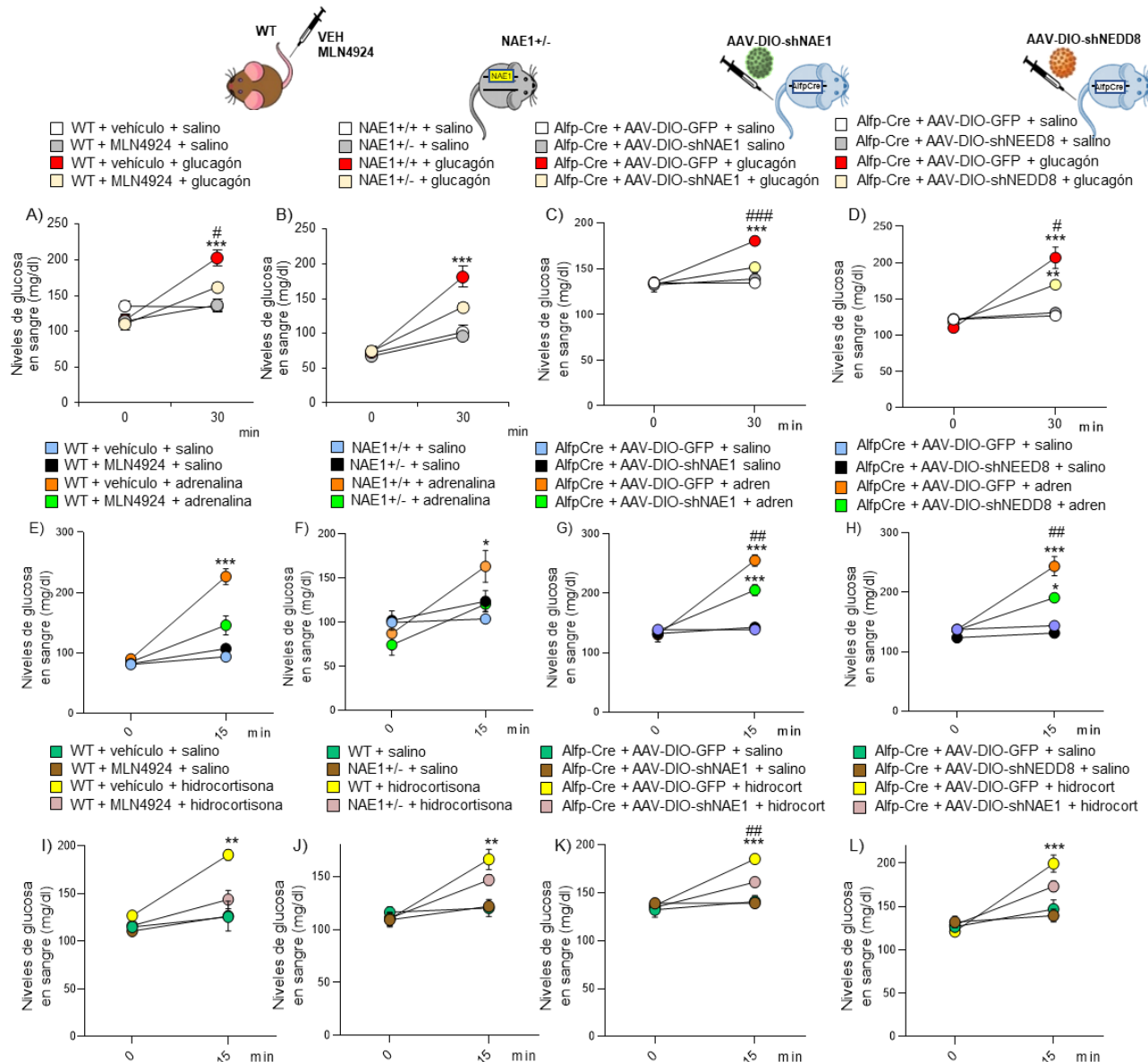


Figura 22. La nedilación es necesaria para la acción gluconeogénica de las hormonas contrarreguladoras. (A – D), Glucosa en sangre después de la administración intraperitoneal (ip) de solución salina o glucagón ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) para (A) ratones WT tratados con vehículo o MLN4924, (B) NAE1^{+/+} ratones o sus compañeros de camada como control, (C) ratones Alfp-Cre^{+/+} inyectados con AAV-DIO que expresan GFP o shNAE1 y (D) ratones Alfp-Cre^{+/+} inyectados con AAV-DIO que expresan GFP o shNEDD8. (E – H), Niveles de glucosa en sangre después de la administración i.p. administración de solución salina o adrenalina ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) para (E) ratones WT tratados con vehículo o MLN4924, (F) NAE1^{+/+} y sus compañeros de camada de control, (G) ratones Alfp-Cre^{+/+} inyectados con AAVDIO que expresa GFP o shNAE1 y (H) ratones Alfp-Cre^{+/+} inyectados con AAVDIO que expresa GFP o shNEDD8. (I – L), glucosa en sangre después de la administración i.p. administración de solución salina o hidrocortisona (20 mg kg^{-1}) para (I) ratones WT tratados con vehículo o MLN4924, (J) ratones NAE1^{+/+} o sus compañeros de camada de control, (K) ratones Alfp-Cre^{+/+} inyectados con AAV-DIO que expresa GFP o shNAE1 y (L) ratones Alfp-Cre^{+/+} inyectados con AAV-DIO que expresa cualquiera de los dos GFP o shNEDD8; $n = 3-10$ por grupo. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM; ANOVA unidireccional seguido de prueba post hoc de Bonferroni: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$. # denota diferencias entre los diferentes grupos de animales tratados con la misma hormona glucorreguladora.

Los niveles de enzimas gluconeogénicas y acetil-CoA fueron similares en ratones cuya nedilación fue inhibida farmacológicamente y en ratones con una desactivación de NAE1 mediada por shRNA tratados con glucagón, adrenalina o glucocorticoides (Figura 23I-T), excepto en los ratones tratados con adrenalina y MLN4924 que mostraron niveles más bajos de acetil-CoA (Figura 23N). Esto sugiere que, en general, la nedilación no regula los niveles de proteínas de las enzimas gluconeogénicas ni la disponibilidad de acetil-CoA.

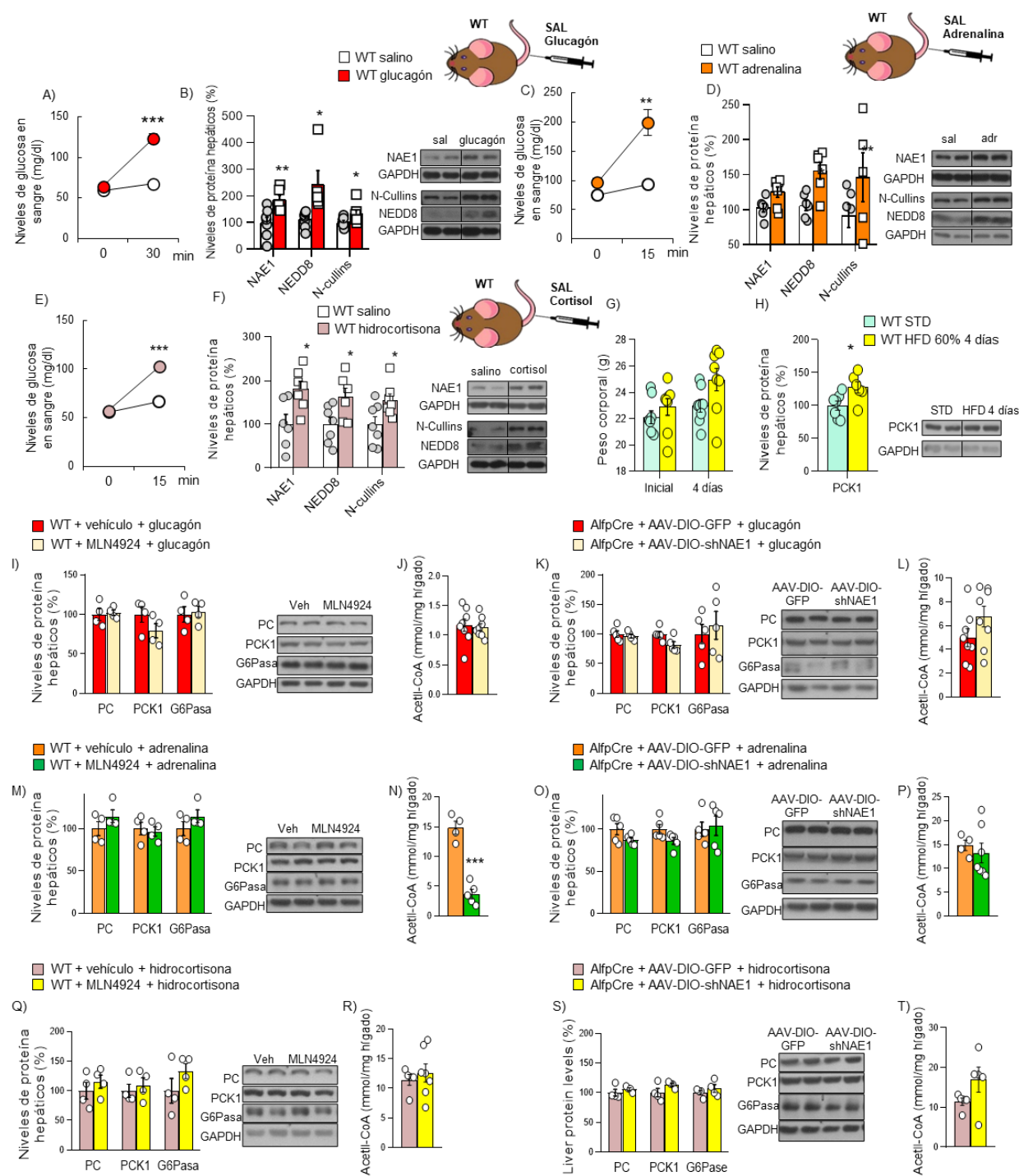


Figura 23. Las hormonas contrarreguladoras de la glucosa inducen la nedilación en el hígado. Ratones WT tratados con solución salina o glucagón (A) para niveles de glucosa en sangre; (B) niveles de proteína hepática de NAE1, NEDD8 y cullins nedilados. Ratones WT tratados con salino o adrenalina (C) niveles de glucosa; (D) niveles de proteína hepática de NAE1, NEDD8 y cullins nediladas. Ratones WT tratados con salino o hidrocortisona (E) niveles de glucosa en sangre; (F) niveles de proteína hepática de NAE1, NEDD8 y cullins nediladas. (G) Peso corporal y (H) niveles de proteína PCK1 en ratones WT alimentados con STD o HFD al 60% durante 4 días. Niveles de proteína de (I) piruvato carboxilasa (PC), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (PCK1) y glucosa 6- niveles de proteína hepática de fosfatasa (G6Pase), y niveles

séricos de (J) acetil-CoA en ratones WT tratados con vehículo o MLN4924 y luego con salino o glucagón (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$). (K) Niveles de proteína hepática PC, PCK1 y G6Pasa y (L) niveles séricos de acetil-CoA en ratones Alfp-Cre inyectados con AAV-DIO-GFP o AAV-DIO-shNAE1 y luego con salino o glucagón (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$). (M) Niveles de proteína hepática PC, PCK1 y G6Pasa y (N) niveles séricos de acetil-CoA en ratones WT tratados con vehículo o MLN4924 y luego con salino o adrenalina (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). (O) niveles de proteína hepática PC, PCK1 y G6Pasa y (P) niveles séricos de acetil-CoA en Alfp-Ratones Cre inyectados con AAV-DIO-GFP o AAV-DIO-shNAE1 y luego con salino o adrenalina (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). (Q) Niveles de proteína hepática de PC, PCK1 y G6Pasa y (R) niveles séricos de acetil-CoA en ratones WT vehículo tratado o MLN4924 y luego con salino o hidrocortisona (20 mg kg^{-1}). (S) Niveles de proteína hepática de PC, PCK1 y G6Pasa y (T) niveles séricos de acetil-CoA en ratones Alfp-Cre inyectados con AAV-DIOGFP o AAV-DIO-shNAE1 y luego con salino o hidrocortisona (20 mg kg^{-1}). n = 4-12 animales por grupo. La expresión de GAPDH sirvió como control de carga y los valores de control se normalizaron al 100%. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM; Prueba t no pareada de dos colas: *P<0,05, **P<0,01 y ***P<0,001.

5.3 La nedilación hepática está asociada con la resistencia a la insulina.

5.3.1 La inhibición de la nedilación reduce la hiperglucemia inducida por una dieta alta en grasas.

A continuación, evaluamos si la inhibición de la nedilación podría disminuir la resistencia a la insulina. La insulina inhibe la producción de glucosa en el hígado, y esta acción se usa ampliamente para medir la función de la insulina hepática [293]. Para esto, alimentamos a ratones con una dieta alta en grasas (HFD) por un corto plazo (4 días), lo que empeoró la sensibilidad a la insulina hepática y estimuló la producción de glucosa hepática sin producir cambios significativos en el peso corporal, (Figura 23G-H) [294, 295]. Nuestros resultados mostraron que los ratones en las cuatro condiciones de inhibición de la nedilación mostraron niveles reducidos de glucosa durante el PTT después de 4 días con HFD (Figuras 24A–D). Estos resultados indicaron que el bloqueo de la nedilación mejoró la gluconeogénesis inducida por HFD.

A continuación, realizamos un experimento de ganancia de función sobreexpresando NAE1 (AAV-DIO-NAE1) en el hígado (ratones livNAE1). Estos ratones mantuvieron el mismo peso que los ratones de control, pero mostraron una mayor capacidad para convertir piruvato en glucosa sin cambios en la tolerancia a la glucosa o la sensibilidad a la insulina en comparación con los ratones de control (Figura 24E-J). Además, los ratones livNAE1 también mostraron niveles de glucosa más altos que los ratones de control durante el ayuno de 24 h (Figura 24K) y después del tratamiento agudo con insulina (Figura 24L), lo que sugiere que la activación de la nedilación en el hígado favorece la producción de glucosa hepática e impide las acciones hipoglucemiantes de la insulina.

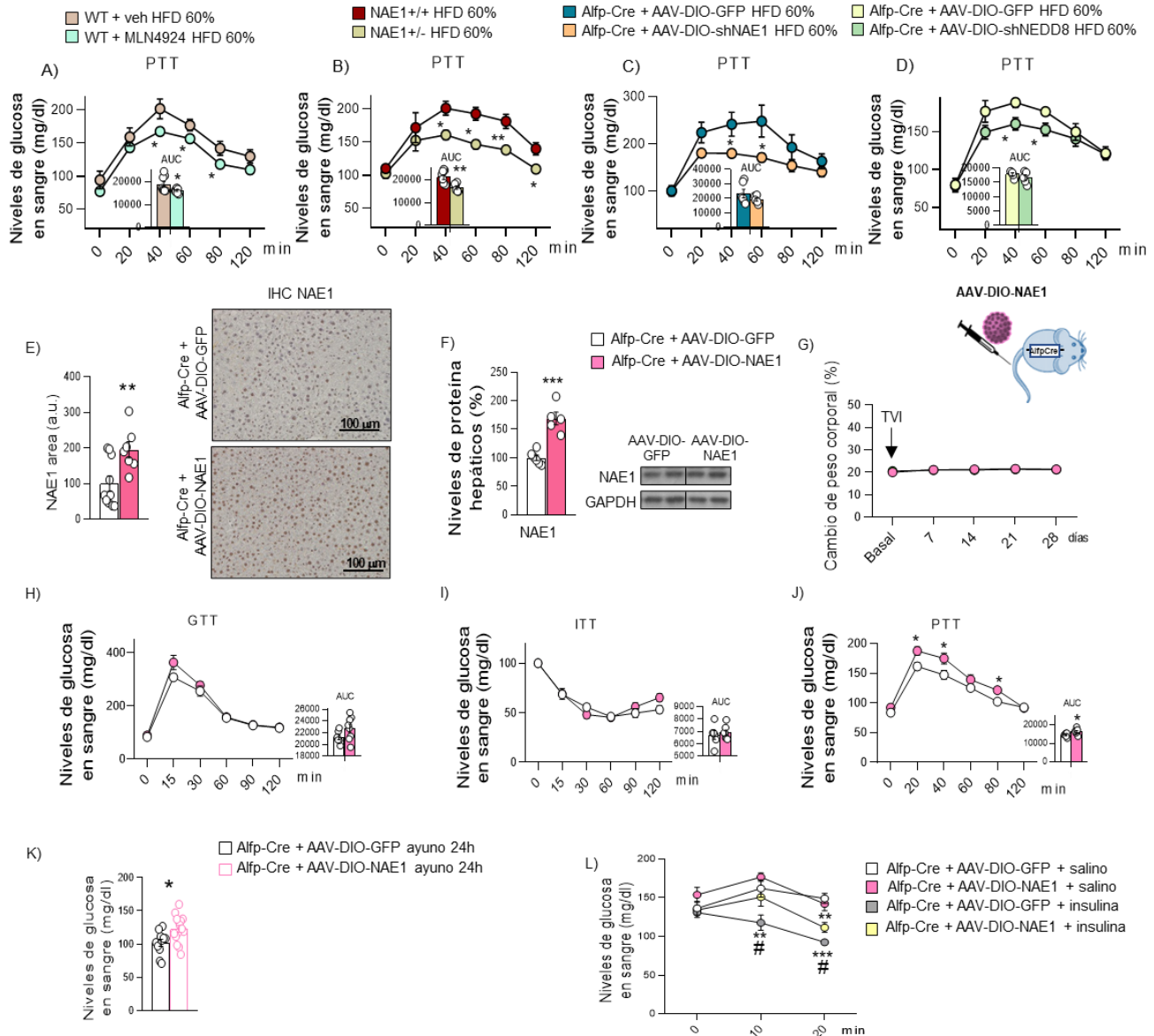


Figura 24. La inhibición de la nedilación reduce los niveles de glucemia inducidos por una dieta alta en grasas. (A – D) Prueba de tolerancia al piruvato (PTT) de ratones alimentados con un HFD (60%) durante 4 días, para (A) ratones WT tratados con vehículo o MLN4924, (B) ratones NAE1^{+/+} o sus compañeros de camada de control, (C) Ratones Alfp-Cre^{+/-} inyectados con AAV-DIO que expresan GFP o shNAE1 y (D) Ratones Alfp-Cre^{+/-} inyectados con AAV-DIO que expresan GFP o shNEDD8. Niveles de proteína NAE1 detectados por inmunohistoquímica (E) y Western blot (F) en ratones Alfp-Cre^{+/-} inyectados con AAV-DIO-GFP o AAV-DIO-NAE1 para sobreexpresar NAE1. Evolución del peso corporal (G), GTT (H), ITT (I), PTT (J) para ratones Alfp-Cre^{+/-} inyectados con AAV-DIO que expresa GFP o NAE1. Niveles de glucosa en sangre (K) después de un ayuno de 24 h para ratones Alfp-Cre^{+/-} inyectados con AAV-DIO que expresa GFP o NAE1. (L) Niveles de glucosa en sangre en ratones Alfp-Cre^{+/-} inyectados con AAV-DIO que expresa GFP o NAE1 y tratados con solución salina o insulina (0,35 U kg⁻¹); n = 5-15 por grupo. La expresión de GAPDH sirvió como control de carga y los valores de control se normalizaron al 100%. Los datos se presentan como media ± SEM; Prueba t no pareada de dos colas (A-K) y ANOVA unidireccional seguida de prueba post hoc de Bonferroni (L): *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001. # denota diferencias entre grupos de animales tratados con insulina.

5.3.2 La nedilación hepática está aumentada en el hígado de personas con diabetes tipo 2.

En muchas personas con diabetes, la supresión de la producción de glucosa hepática dependiente de la insulina no ocurre de manera adecuada, lo que contribuye a la hiperglucemia en los estados de ayuno y posprandial [12]. Por tanto, evaluamos los niveles de nedilación en el hígado de adultos (hombres y mujeres) con obesidad y normoglucemia (NG) o diabetes tipo 2 (DT2) (Tabla 12).

Tabla 12. Características antropométricas, bioquímicas y clínicas de pacientes obesos con normoglucemia (NG) y diabetes tipo 2 (DT2). IMC, índice de masa corporal; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; AST, aspartato transaminasa; ALT, alanina transaminasa.

	NG	DT2
n	30	30
Edad (años, media $\pm$ SD)	44 $\pm$ 10	50 $\pm$ 9*
Género (M / H)	15 / 15	15 / 15
Peso (kg $\pm$ SD)	116.9 $\pm$ 25.5	117.6 $\pm$ 23.8
IMC	41.2 $\pm$ 6.6	41.9 $\pm$ 7.1
LDL (mg/dl $\pm$ SD)	118 $\pm$ 29	113 $\pm$ 38
HDL (mg/dl $\pm$ SD)	53 $\pm$ 17	45 $\pm$ 14
Triglicéridos (mg/dl $\pm$ SD)	105 $\pm$ 53.6	144 $\pm$ 70*
Colesterol (mg/dl $\pm$ SD)	191 $\pm$ 34	190 $\pm$ 43
Colesterol LDL (mg/dl $\pm$ SD)	118 $\pm$ 29	113 $\pm$ 38
Colesterol HDL (mg/dl $\pm$ SD)	53 $\pm$ 17	45 $\pm$ 14
AST (U/L $\pm$ SD)	19 $\pm$ 6	20 $\pm$ 7
ALT (U/L $\pm$ SD)	25 $\pm$ 12	26 $\pm$ 11
Glucosa (mg/dl $\pm$ SD)	92 $\pm$ 6	144 $\pm$ 55***
OGTT (mg/dl $\pm$ SD)	110 $\pm$ 24	212 $\pm$ 54***
HOMA	4.32 $\pm$ 2.96	7.75 $\pm$ 5.41**
Insulina (mU/ml)	18.6 $\pm$ 12.1	32 $\pm$ 57.1
A1c (%)	5.7 $\pm$ 0.6	8.4 $\pm$ 1.8 **

Nuestros datos mostraron niveles de proteína más altos de NAE1, NEDD8 y cullins nediladas en el hígado de personas del subgrupo con obesidad y diabetes tipo 2 versus niveles en personas con obesidad y normoglucemia (Figura 25A), así como una correlación positiva de los niveles de proteína de NAE1 y NEDD8. con niveles de glucosa en ayunas y la prueba de tolerancia a la glucosa oral (Figuras 25B-C). Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que los cambios en la nedilación hepática están asociados con la hiperglucemia en personas con obesidad y diabetes tipo 2. Cuando se analizaron por sexo, nuestros datos mostraron que los niveles de proteína de NAE1 en el hígado aumentaron por igual en mujeres y hombres con obesidad y diabetes tipo 2 en comparación con mujeres y hombres obesos con obesidad y normoglucemia (Figura 25D-E). Siguiendo una tendencia similar, los niveles de proteína de cullins nediladas y NEDD8 se elevaron en ambos sexos (Figura 25D-E).

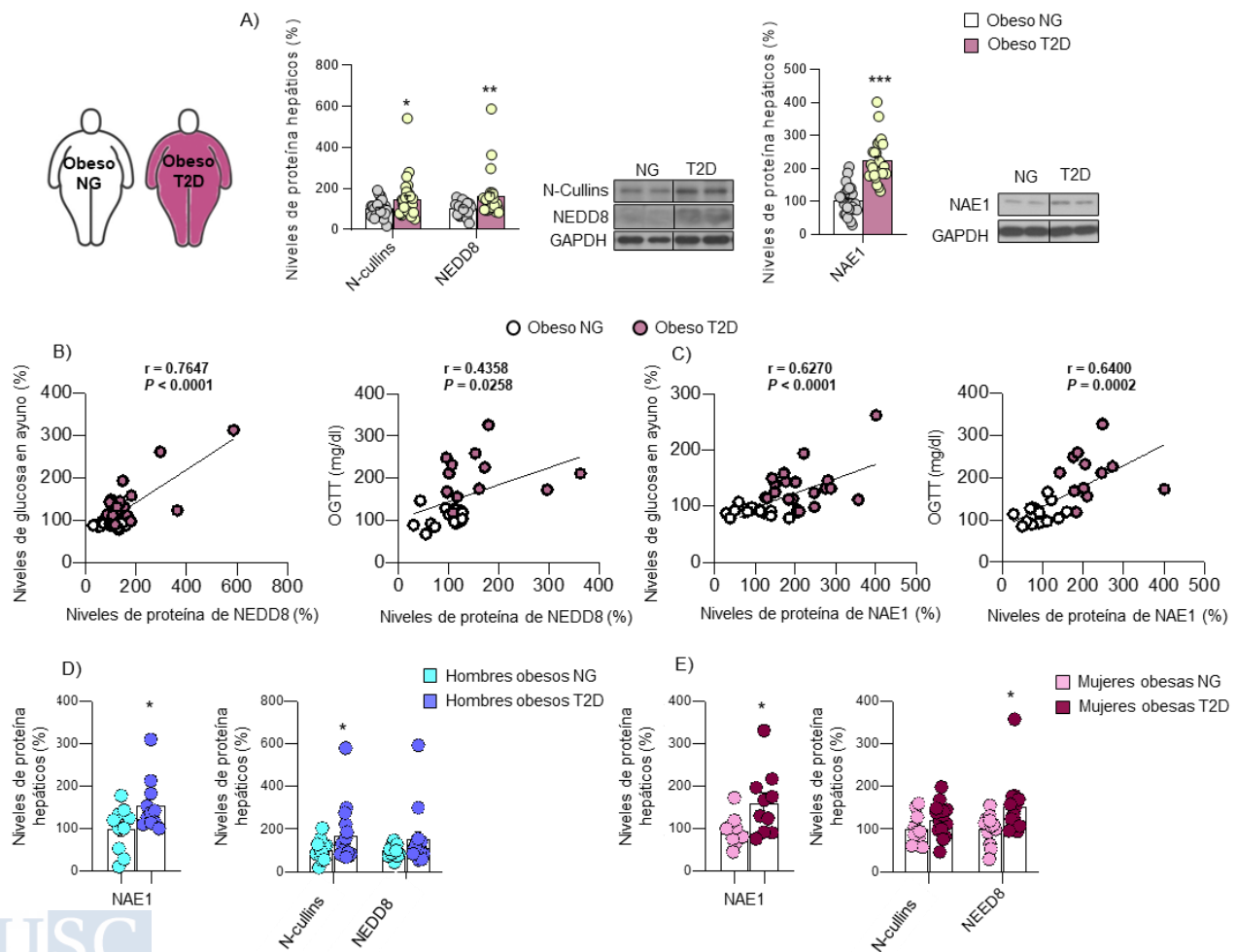


Figura 25. La nedilación está elevada en el hígado de personas con diabetes tipo 2. (A) Niveles de proteína de cullins nediladas, NEDD8 libre y NAE1 en adultos con obesidad que fueron subclasificados como normoglucémicos (NG) o diabéticos tipo 2 (DT2) (n = 30 por grupo). (B, C) Correlaciones entre los niveles de proteína de NEDD8 y NAE1 y los niveles de glucosa en ayuno (mg dl⁻¹) o con los niveles de glucosa durante la prueba de tolerancia oral a glucosa (OGTT) (mg dl⁻¹). (D-E) Niveles de proteína de cullins nediladas, NEDD8 libre y NAE1 en (D) hombres y (E) mujeres con obesidad que fueron subclasificados como normoglucémicos (NG) o diabéticos tipo 2 (DT2). La expresión de GAPDH sirvió como control de carga y los valores se normalizaron con respecto al grupo control al 100%. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM; Prueba t no pareada de dos colas: *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001.

5.4 PCK1 se nedila ante la deficiencia de nutrientes y esta PTM es necesaria para su actividad gluconeogénica.

5.4.1 PCK1 aumenta su nedilación en ayuno y en restricción calórica.

Para dilucidar cómo la nedilación afecta el metabolismo de la glucosa, a continuación delineamos el panorama de las proteínas nediladas en condiciones en las que la gluconeogénesis se ve estimulada. Para esto, generamos ratones transgénicos en los que NEDD8 se encuentra marcado con biotina (bionedd8) (Figura 26A-B) y los sometimos a restricción calórica durante 4 días o a una dieta ad libitum como control, donde mostraron pesos corporales y niveles de glucosa similares a los de ratones WT (Figura 26C). Luego, realizamos experimentos de inmunoprecipitación de biotina para aislar el proteoma hepático nedilado en los diferentes subgrupos. El análisis por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS) utilizando un enfoque SWATH-MS identificó un total de 1211 proteínas. Estas 1211 proteínas incluyeron las proteínas presentes en las fracciones eluidas (210 proteínas, que representan el 17,3%) y en las fracciones de flujo (FT) (Figura 26E). Entre las 210 proteínas nediladas, no todas cambiaron sus niveles de nedilación tras la privación de nutrientes, sino que solo 61 proteínas mostraron niveles de nedilación significativamente diferenciales después de la restricción calórica. Como control positivo para la inmunoprecipitación de proteínas nediladas con biotina, NEDD8 se enriqueció solo en la fracción de eluido (pero no en las fracciones de input o de flujo) (Figura 26D). El análisis de enriquecimiento funcional de estas 61 proteínas diferencialmente nediladas mostró que la gluconeogénesis estaba sobrerrepresentada (Figura 26F), y que la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (PCK1), la enzima limitante clave de la gluconeogénesis, estaba presente entre ellas. En consecuencia, encontramos que PCK1 estaba enriquecido en los ratones en RC en comparación con los ratones control alimentados ad libitum. Para corroborar estos resultados, inmunoprecipitamos PCK1 del hígado de los ratones en RC y de

los ratones tras ayuno 24 h. Estos experimentos revelaron que NEDD8 coprecipitó en niveles más altos con PCK1 en ambas condiciones de deficiencia de nutrientes que en condiciones ad libitum (Figura 26G-H). Además, también inmunoprecipitamos PCK1 del hígado de ratones en RC y de ratones tras ayuno 24 horas tratados con vehículo o MLN4924. Estos experimentos revelaron que la señal PCK1-NEDD8 fue notablemente abolida por el tratamiento con MLN4924 (Figura 26I). De acuerdo con nuestros resultados que muestran que PCK1 se anula tras la privación de nutrientes, también detectamos una interacción física y directa por coinmunoprecipitación entre PCK1 y NAE1 en estas condiciones, lo que indica que PCK1 y NAE1 están más asociados en estas condiciones (Figura 26J). Como control positivo, también hemos inmunoprecipitado Cullin2, una proteína cuya nedilación ha sido descrita ampliamente, en el hígado de ratones en RC y en el hígado de ratones tras ayuno de 24 h. Encontramos un marcado aumento en la intensidad de la banda de NEDD8 en Cullin2 tras la privación de nutrientes (Figura 26L), pero más ligero en relación con el observado cuando se inmunoprecipita PCK1, lo que indica que en estas condiciones fisiológicas, la nedilación se dirige a sustratos específicos (como PCK1).

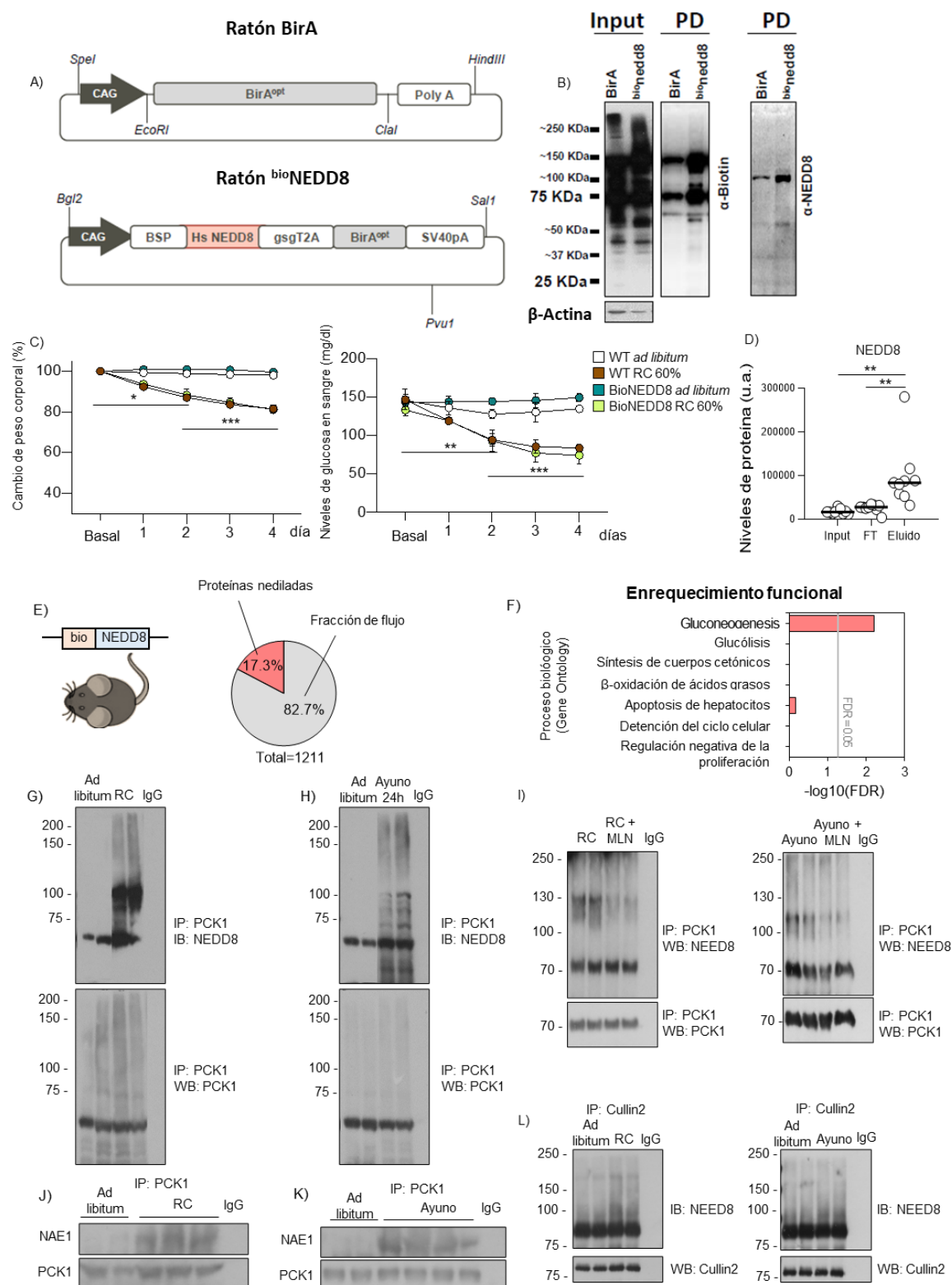


Figura 26. Los ratones ^{bio}NEDD8 responden normalmente al ayuno y a la restricción calórica. (A) Caracterización de los ratones bionedilados (BioNEDD8). Representación esquemática de las construcciones transgénicas para ratones ^{bio}Nedd8 y birA. Ambos transgenes contienen el promotor CAG (CMV, β actina y globina), el marco de lectura abierto y la señal de poliadenilación de SV40. Los sitios de restricción utilizados para la inserción de constructos y la escisión de

transgenes y los cebadores de PCR utilizados para el genotipado se indican en los materiales y sección de métodos. El ratón BirA de control expresa únicamente la enzima bacteriana BirA, mientras que los ratones bioNedd8 expresan un único polipéptido que codifica un péptido nedilado etiquetado fusionado con BirA. En los ratones BioNEDD8, la enzima BirA media la biotilación de NEDD8 con la etiqueta que acepta biotina. Luego, el NEDD8 biotinilado se incorpora a los conjugados. (B) Análisis de transferencia Western de biotina y NEDD8 que muestra un aumento de la mancha en los ratones bioNEDD8 en relación con birA, tanto de entrada como de descenso (PD). (C) Cambio de peso corporal y niveles de glucosa en sangre en ratones WT y ratones BioNEDD8 alimentados *ad libitum* o sometidos a una restricción calórica del 60% durante 4 días. $n = 4-5$ animales por grupo. (D) Niveles de NEDD8 en las fracciones de entrada, flujo y elución del IP. (E) Gráfico circular que muestra el porcentaje de proteínas nediladas de las proteínas hepáticas totales identificadas en ratones bionedd8, según lo determinado por proteómica LC-MS/MS ($n = 4$ o 5). (F) Análisis de enriquecimiento funcional PANTHER de proteínas nediladas en el hígado. Nedilación de PCK1 durante una restricción calórica de 4 días (del 60%) (G) o ayuno de 24 h (H), como lo muestra la inmunotransferencia después de la inmunoprecipitación de PCK1. (I) Niveles de proteínas PCK1 y NEDD8 tras la inmunoprecipitación de PCK1 en ratones WT tras la administración de vehículo o MLN4924 y sometidos a restricción calórica (RC) y ayuno de 24 h. (J-K) Niveles de proteína PCK1 y NAE1 después de la inmunoprecipitación de PCK1, y niveles de proteína NAE1 relativizados a PCK1 inmunoprecipitada, de hígados de ratones alimentados *ad libitum* o sometidos a una restricción calórica de 4 días (del 60%) (J) o 24 -h ayuno (K). (L) Niveles de proteínas NEDD8 y Cullin2 después de la inmunoprecipitación de cullin2 en ratones WT sometidos a restricción calórica (RC) y ayuno de 24 h. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM; ANOVA unidireccional seguido de la prueba post hoc de Bonferroni * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$.

5.4.2 PCK1 está nedilado en tres lisinas después de restricción calórica y ayuno.

El análisis STRING del interactoma funcional después de la inmunoprecipitación de PCK1 comprendió 1631 proteínas en la condición de ayuno de 24 h y 1142 en la condición RC, con 968 de ellas comunes a ambas condiciones. Además, tanto en RC como en ayuno 24h, aparecen un grupo de proteínas implicadas en nedilación (indicadas en rojo; Figura 27A). Para identificar sitios de modificación en PCK1 que potencialmente podrían ser sitios de nedilación, primero inmunoprecipitamos PCK1 del hígado de ratones alimentados *ad libitum* o sometidos a ayuno y luego realizamos análisis LC-MS/MS. El análisis realizado por el software PEAKS de los espectros peptídicos de PCK1 reveló que tres lisinas PCK1 estaban potencialmente nediladas en condiciones de ayuno: K278, K342 y K387 (Figura 27B). Para determinar cómo la nedilación podría afectar la actividad de PCK1, analizamos sus efectos sobre la estructura, prestando especial atención a los residuos nedilados. Para obtener información sobre las consecuencias estructurales y dinámicas de la nedilación de PCK1, realizamos simulaciones de dinámica molecular de PCK1 en diferentes condiciones: i) no nedilada, ii) mononedilada, iii) binedilada o iv) trinedilada (Figura 27D). Los tres residuos de lisina se distribuyen por la superficie de la enzima y todos eran accesibles al disolvente (Figura 27E). El análisis de trayectoria reveló que la nedilación de PCK1 afectó principalmente a las fluctuaciones atómicas y a la posición de los bucles 95-118 y 460-470, que rodean la cavidad enzimática y el centro catalítico. La mononedilación en K387 indujo

la mayor perturbación de la hendidura enzimática, abriéndola y permitiendo la entrada de Mn^{2+} en el centro catalítico de PCK1, un paso crítico para la actividad de esta enzima (Figuras 27C-27E). Es de destacar que K387 es la lisina más conservada a lo largo de la evolución de las tres lisinas y está presente en todas las secuencias de PCK1 que analizamos, en una amplia gama de especies, desde micobacterias hasta mamíferos (Figura 28A). El hecho de que se mantenga tan conservada a lo largo de la evolución deja entrever su importancia biológica.

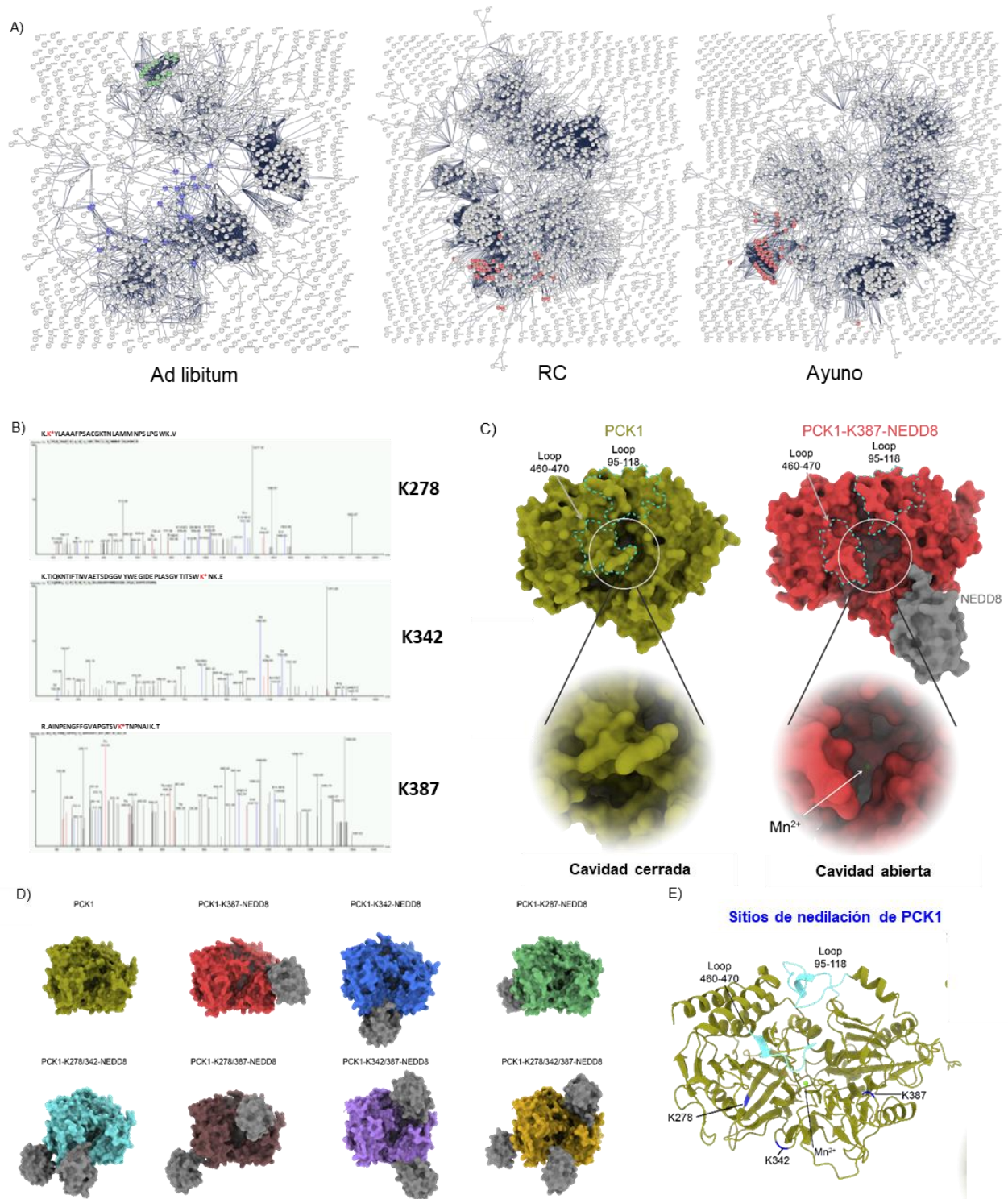


Figura 27. PCK1 está nedilada en tres lisinas después de la restricción calórica y el ayuno y esta modificación altera su estructura. (A) Análisis de asociación funcional para la inmunoprecipitación de PCK1 en condiciones de alimentación ad libitum, restricción calórica (RC) y ayuno. Los círculos rojos muestran proteínas relacionadas con la nedilación. (B) PCK1 inmunoprecipitado se sometió a análisis de espectrometría de masas. Se muestran posibles sitios modificados. K*, modificado con GG. (C) Estructuras promedio de PCK1 (izquierda, oliva) y PCK1-K387-NEDD8 (derecha, rojo) después

de una simulación de dinámica molecular. La nedilación de PCK1 altera la dinámica y la conformación de los bucles 95–118 y 460–470 (líneas discontinuas cian). Vista en profundidad de la abertura de la grieta de la proteína tras la nedilación de PCK1 que hace que el ion Mn^{2+} sea accesible al sustrato. (D) Superficies promedio de PCK1 nedilada después de simulación de dinámica molecular. Las estructuras están alineadas con respecto al módulo PKC1 en una orientación que permite visualizar hasta tres moléculas de NEDD8 por PCK1. (E) Representación en cinta de la estructura PCK1 de *M. musculus* con sitios de nedilación identificados coloreados en azul oscuro. Los bucles 95–118 y 460–470 están resaltados en cian, y el ion Mn^{2+} , en verde claro.

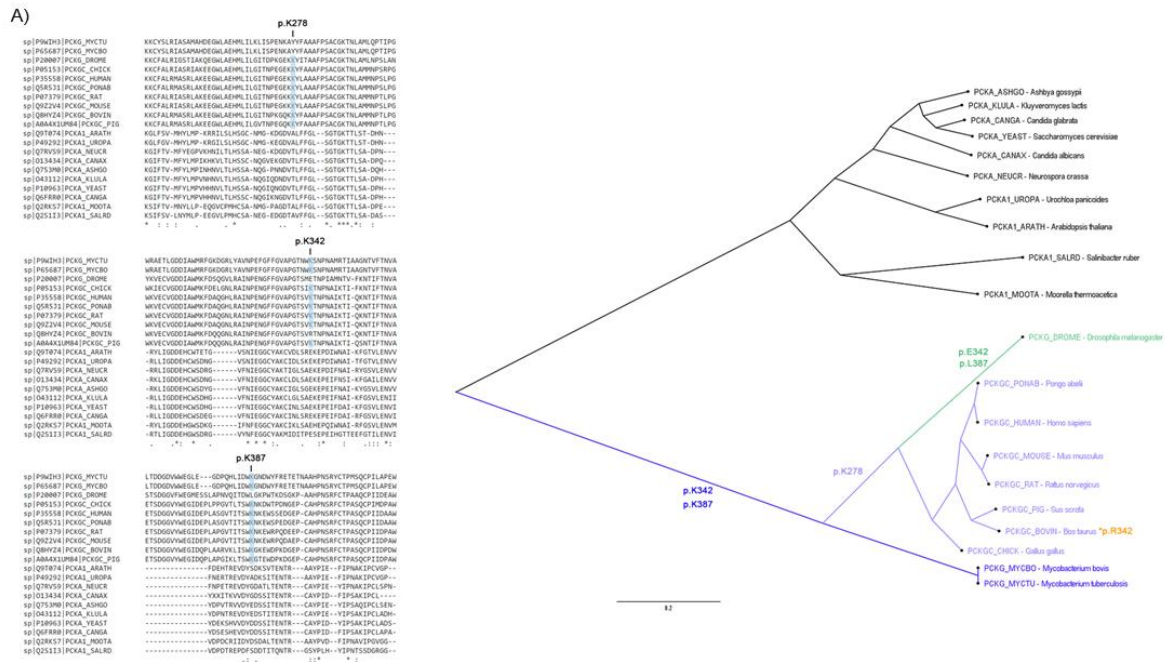


Figura 28. Filogenesia de las tres lisinas de PCK1 que pueden ser nediladas. (A) Alineamiento de secuencia múltiple CLUSTAL de las regiones que flanquean los residuos K278, K342 y K387 y el árbol filogenético de la proteína PCK1. Se indican los puntos de la evolución donde aparecen por primera vez las lisinas.

5.4.3 La nedilación de PCK1 en sus residuos K278, K342 y K387 es necesaria para su actividad gluconeogénica *in vitro*.

Finalmente, para comprender mejor las consecuencias funcionales de la nedilación de PCK1, silenciamos NAE1 y NEDD8 y luego incubamos los hepatocitos en un medio sin nutrientes (para crear una condición de ayuno *in vitro*). Las células en ayunas tenían una mayor actividad de PCK1; por el contrario, la inhibición de NAE1 y NEDD8 bloqueó la actividad de PCK1 inducida por el ayuno, con niveles concomitantes de glucosa más bajos en el medio (Figura 29A-C y Figura 30A-C). Estos resultados también se corroboraron *in vivo*: la inhibición de NAE1 en el hígado disminuyó la actividad de PCK1 en ratones en restricción

calórica (Figura 29D). En línea con estos hallazgos, y al igual que con la proteómica y el modelado, encontramos que mutar los tres residuos de lisina de PCK1 al mismo tiempo (p. ej., K278, K342 y K387) o K387 no alteró los niveles de proteína de PCK1, pero redujo su actividad y los niveles de glucosa en el medio (Figura 30D-F). Consistentemente, la actividad y la producción de glucosa podían restaurarse en hepatocitos ayunados e inhibidos por PCK1 al sobreexpresar PCK1 *wild type* pero no al sobreexpresar el triple mutante de PCK1 o el mutante único de PCK1, K387R (Figura 30D-F), lo que resalta la relevancia de la nedilación en estos residuos de lisina para la actividad enzimática de PCK1 y, por tanto, de sus funciones gluconeogénicas.

Es importante destacar que los niveles de proteína de PCK1 se elevaron de manera similar en los mutantes y de PCK1 *wild type* (Figura 30F), lo que respalda que la nedilación de PCK1, y no sus niveles de proteína total, son los que modulan su actividad.

Dado que otras modificaciones además de la nedilación pueden modificar estas lisinas e incluso otros residuos potenciales de PCK1 podrían nedilarse y no detectarse, repetimos los experimentos tratando nuestros diferentes grupos experimentales *in vitro* con MLN4924, para estudiar cualquier posible efecto aditivo o sinérgico, lo cual es crítico especialmente en ausencia de ensayos que evalúen la nedilación de los mutantes PCK1. Como tal, los hepatocitos se trataron con vehículo o MLN4924 en condiciones de depleción de nutrientes (medio KHH durante 6 horas). Los resultados indicaron que, como se esperaba, el silenciamiento de PCK1 redujo los niveles de proteína y la actividad de PCK1 y la liberación de glucosa en el medio. El rescate de PCK1-WT restauró los niveles de proteína y la actividad de PCK1 y aumentó la secreción de glucosa en el medio (Figura 30G-I). Sin embargo, el tratamiento con MLN4924 disminuyó la actividad de PCK1-WT, impidiendo la liberación de glucosa al medio (sin cambios en los niveles de proteína PCK1) (Figura 30G-I). Siguiendo el mismo procedimiento experimental, los hepatocitos que expresan el PCK1 mutante triple o el PCK1 mutante único (K387R) también se trataron con vehículo o MLN4924. Los resultados indican que el mutante triple o el mutante único PCK1 (K387R) no pudieron restaurar la actividad de PCK1 o los niveles de glucosa y, por lo tanto, MLN4924 no causó ningún efecto (Figura 30J-O). Estos hallazgos indican que las mutaciones en tres residuos de lisina de PCK1 al mismo tiempo (K278, K342 y K387) son relevantes para mantener la

capacidad gluconeogénica de PCK1, y que si PCK1 está nedilada en otros residuos diferentes a K278, K342 y K387, no están involucrados o no son esenciales para la actividad gluconeogénica de PCK1, ya que el tratamiento con MLN4924 en siPCK1 + pPCK1 K278R-K342R-K387R no tuvo un efecto aditivo o sinérgico, es decir, MLN4924 no redujo aún más la producción de glucosa o la actividad de PCK1 en esas células.

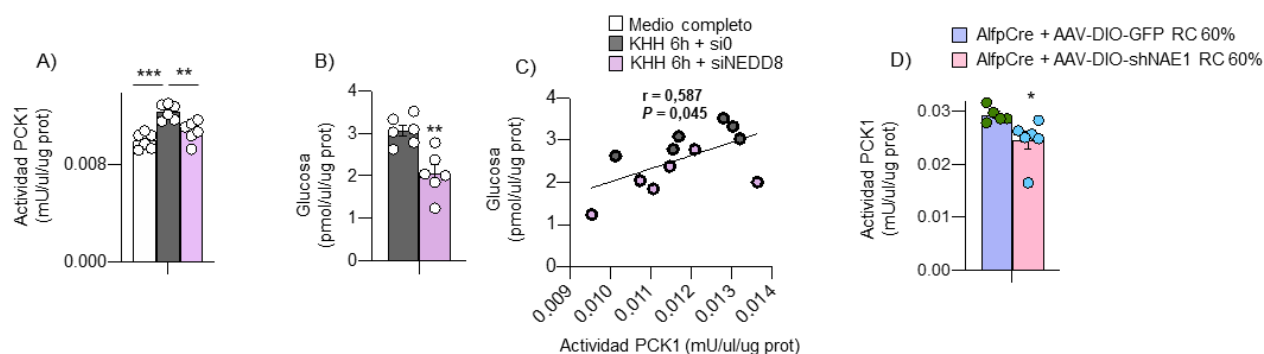
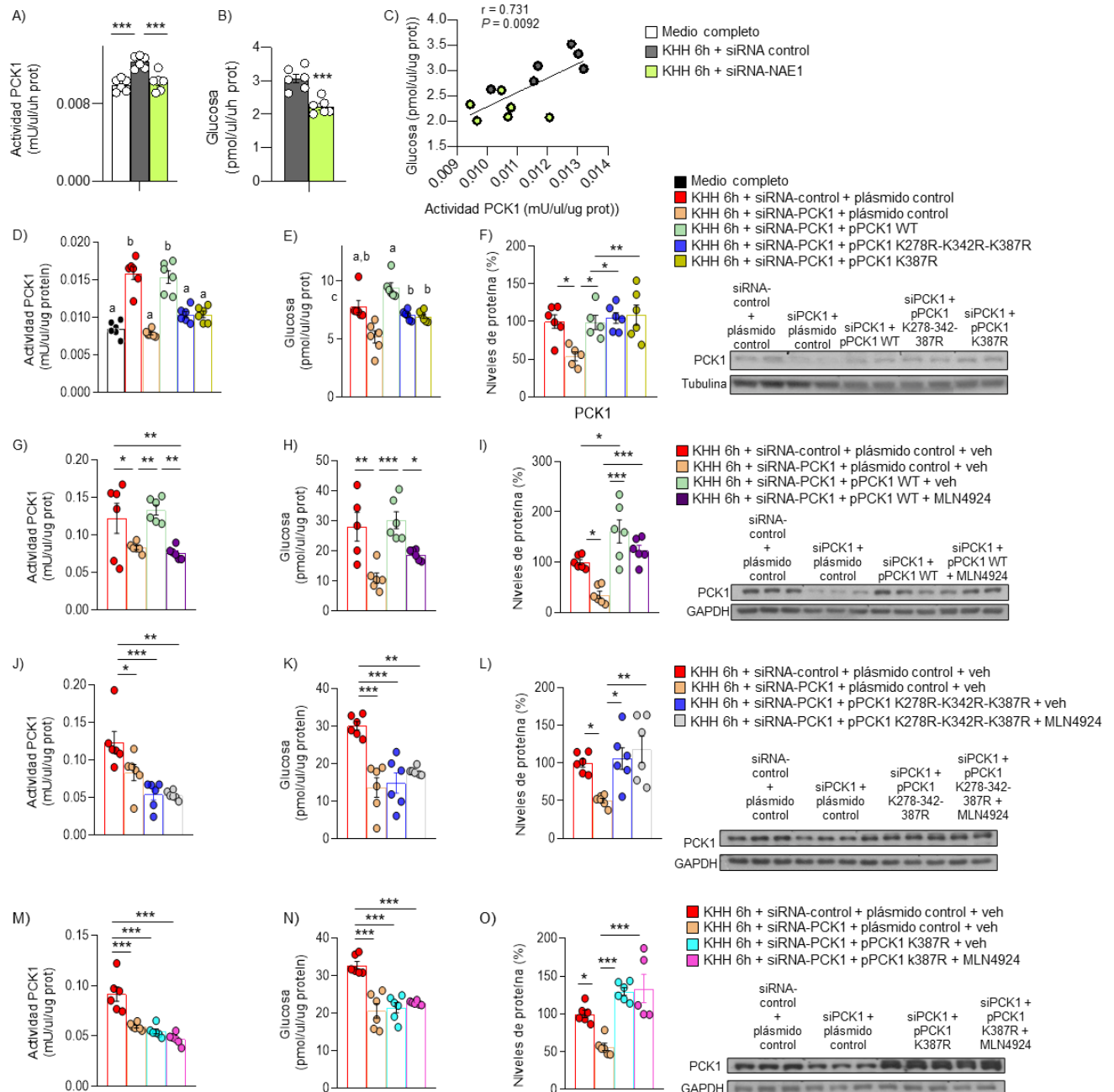


Figura 29. La actividad de PCK1 y la concomitante producción de glucosa se ven reducidas al inhibir la nedilación.

(A) Actividad de PCK1 y (b) producción de glucosa en células AML12 transfectadas con siRNA vacío o siRNA NEDD8 y 48 h más tarde mantenidas en medio completo o KHH durante 6 h. (C) También se muestra la correlación entre la producción de glucosa y la actividad de PCK1 en estas células. (D) Actividad de PCK1 en el hígado de ratones Alfp-Cre +/- inyectados con AAV-DIO que expresa GFP o shNAE1. $n = 5-6$ por grupo. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM; prueba t no pareada de dos colas (C y E) o ANOVA unidireccional seguida de prueba post hoc de Bonferroni (B): * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$.



5.4.4 La nedilación de PCK1 en sus residuos K278, K342 y K387 es la responsable de la producción hepática de glucosa *in vivo*.

Para demostrar la relevancia *in vivo* de PCK1 nedilado en los tres residuos descritos anteriormente, silenciámos PCK1 en el hígado de ratones adultos inyectando un virus AAV-Cre en la vena de la cola de ratones PCK1 loxP (PCK1 LKO). Luego, en estos ratones inyectamos AAV-DIOPCK1wt para rescatar la expresión de PCK1 hepático de tipo salvaje o un virus AAV-DIO-PCK1mut para sobreexpresar el triple mutante PCK1 (K278R-K342R-K387R) en el hígado. La delección de PCK1 en el hígado de ratones adultos redujo los niveles de glucosa tras la administración de piruvato mientras que el rescate de PCK1 de tipo salvaje normalizó los niveles de glucosa durante el PTT, sin cambios en la tolerancia a la glucosa o la sensibilidad a la insulina (Figura 31A-D). Luego sometimos a estos ratones a un ayuno durante 24 horas y descubrimos que el rescate de PCK1 de tipo salvaje mostraba niveles más altos de glucosa y producción de glucosa hepática (HGP) que los ratones PCK1 KO hepático (Figura 31E). Sin embargo, la expresión hepática del triple mutante PCK1 en ratones en los que PCK1 fue previamente inactivado (Figura 31F), no normalizó los niveles de glucosa durante la PTT sin cambios en GTT e ITT (Fig. 31G-I). Para corroborar aún más nuestros resultados, también sometimos a nuestros ratones a una prueba de tolerancia al glicerol, ya que el glicerol evita la actividad de PCK1, ya que se incorpora a la vía gluconeogénica en pasos posteriores. Como se muestra en la Figura 20C y en la Figura 31J, no hubo diferencias en la producción de glucosa después de la administración de glicerol entre los diferentes grupos, lo que destaca que la capacidad gluconeogénica de estos ratones se altera específicamente por la actividad de PCK1. Finalmente, cuando se sometieron a un ayuno de 24 horas, los ratones que expresaban el triple mutante PCK1 no pudieron aumentar la glucemia o la producción de glucosa hepática, mostrando niveles de glucosa en sangre similares a los de los ratones PCK1 KO hepáticos (Figura 31K).

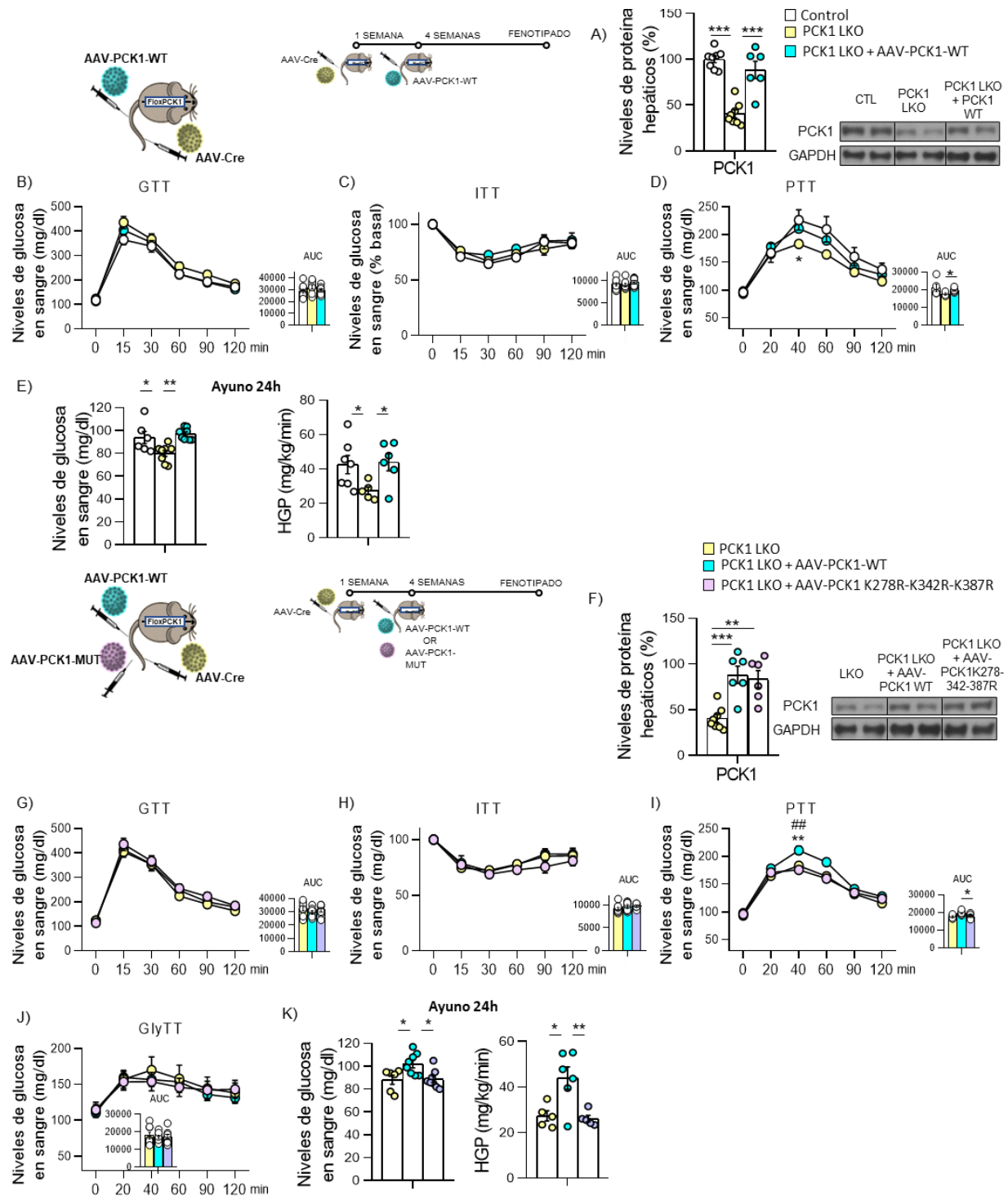


Figura 31. La nedilación de PCK1 es necesaria para su función gluconeogénica *in vivo*. (A) Niveles de proteína PCK1, (B) prueba de tolerancia a la glucosa (GTT), (C) prueba de tolerancia a la insulina (ITT), (D) prueba de tolerancia al piruvato (PTT), (E) niveles de glucosa en sangre durante ayuno de 24 horas y producción de glucosa hepática (HGP) en ratones control, ratones que carecen de PCK1 en el hígado (PCK1 LKO) (ratones PCK1 loxP inyectados con AAV-Cre en la vena de la cola) y PCK1 LKO inyectados con AAVPCK1 *wild type* (WT). (F) Niveles de proteína PCK1, (G) GTT, (H) ITT, (I) PTT, (J) prueba de tolerancia al glicerol (GlyTT), (K) niveles de glucosa en sangre durante ayuno de 24 horas y producción

de glucosa hepática en ratones de control, PCK1 LKO y PCK1 LKO inyectado con triple mutante AAV-PCK1 (n = 5-10 animales por grupo). La expresión de GAPDH sirvió como control de carga y los valores de control se normalizaron al 100%. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM; ANOVA unidireccional seguido de prueba post hoc de Bonferroni: *P < 0,05 y ***P < 0,001. # Denota diferencias entre los ratones PCK1 LKO + AAV-PCK1 WT y PCK1 LKO + AAV-PCK1-K278R-K342R-K387R.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Pese a que en los últimos años se haya comenzado a vislumbrar el papel de la nedilación en contextos más fisiológicos dejando de lado su directa asociación a contextos más patológicos o de cáncer, todavía se desconoce en gran medida si la nedilación regula el metabolismo energético y cómo lo hace. Por lo tanto, para el desarrollo de esta tesis nos centramos en el metabolismo de la glucosa y demostramos que NEDD8 y las enzimas de nedilación se encuentran sobreexpresadas en el hígado en situaciones de privación de nutrientes y cuando se administran hormonas contrarreguladoras (glucagón, adrenalina y glucocorticoides). Además, demostramos que el metabolismo de la glucosa se altera en gran medida después del bloqueo de la nedilación mediante ensayos farmacológicos y genéticos, ya que los ratones tratados con MLN4924 y ratones donde se silencia NAE1 y NEDD8 específicamente en los hepatocitos muestran una capacidad gluconeogénica defectuosa. Por el contrario, los niveles de nedilación se encuentran incrementados en situaciones de resistencia a insulina, y la sobreexpresión de NAE1 provoca la atenuación de la capacidad de la insulina para suprimir la gluconeogénesis hepática. Concretamente, nuestros hallazgos muestran que la nedilación de la fosfoenolpiruvato carboxilasa 1 (PCK1) en tres residuos clave de lisina desempeña un papel fisiológico en la homeostasis de la glucosa, tanto al regular la síntesis de glucosa en condiciones de deficiencia de nutrientes como al ser un mecanismo común compartido por hormonas contrarreguladoras en la respuesta contrarreguladora para aumentar la disponibilidad de glucosa.

Más en profundidad, la gluconeogénesis es el mecanismo más importante de producción hepática de glucosa, ya que permite un aporte continuo de glucosa a los tejidos periféricos cuando las reservas de glucógeno se han agotado y el ayuno persiste o cuando la demanda energética es muy alta, momento en el cual el organismo requiere una fuente constante de glucosa para alimentar órganos vitales como el cerebro y los glóbulos rojos. La reacción limitante, y, por tanto, el que es considerado el mayor punto de control de la gluconeogénesis es la conversión de oxalacetato en fosfoenolpiruvato por la enzima PCK1 [296, 297], un paso crucial en la síntesis de glucosa a partir de sustratos como lactato, glicerol y aminoácidos.

Parte de esta afirmación se basa en experimentos en hepatocitos aislados tratados con

inhibidores farmacológicos de la actividad de PCK1, los cuales concluyeron que PCK1 es la enzima que controla la velocidad de la gluconeogénesis [296].

El hecho de que PCK1 sea el punto de control más importante de la gluconeogénesis, ha impulsado numerosas investigaciones acerca de los mecanismos que controlan la expresión del gen de *Pck1* [181, 298]. Estos estudios han revelado que la regulación de la transcripción de *Pck1* tiene lugar entre -1500 pb y +1 pb del promotor, y que este contiene sitios de unión para factores de transcripción directamente relacionados con la homeostasis glucídica, como CREB [299], C/EBP α [300] y FoXO1 [301], que actúan en respuesta a cambios en los niveles circulantes de insulina, adrenalina, glucagón y glucocorticoides [297]. Por su parte, PCK2-m no se regula a nivel transcripcional, mostrando una expresión constitutiva en humanos, roedores y aves [167]. Un estudio anterior demostró que la PCK1 citosólica no controla únicamente la gluconeogénesis hepática, y una reducción del 90% en el contenido de PCK1 citosólico mostró solo una reducción del 40% en el flujo gluconeogénico [176]. Sin embargo, es importante resaltar que este estudio previo inactivó el gen en etapas embrionarias, y por tanto, podrían haberse desarrollado mecanismos compensatorios que se hubiesen hecho cargo de la función gluconeogénica.

El hecho de que sea PCK1, y no otra enzima, quien constituya el principal punto de regulación de la gluconeogénesis se explica por varios motivos. En primer lugar, PCK1 vincula el ciclo de Krebs con la gluconeogénesis, ya que tiene un efecto cataplerótico muy importante, permitiendo que el aumento de los niveles de oxalacetato que se da durante el ciclo de Krebs en situaciones de gluconeogénesis estimulada, como durante el ayuno, se transforme en fosfoenolpiruvato. Además, esta reacción es irreversible en situaciones normales, lo que contribuye a la unidireccionalidad de la vía, de manera que es PCK1 quien determina si la célula dirige los sustratos hacia gluconeogénesis o hacia la glucólisis. En segundo lugar, PCK1 está fuertemente regulada por hormonas como el glucagón [297, 302] y la insulina [107, 108], y esta regulación hormonal le permite al organismo ajustar la producción de glucosa según las demandas energéticas y las concentraciones de glucosa en sangre, de manera que la gluconeogénesis se active cuando los niveles de glucosa son bajos y se inhiba cuando los niveles de glucosa son suficiente. Además, la corta vida media de su ARNm (30 minutos) permite un rápido control hormonal de la gluconeogénesis. En tercer

lugar, PCK1 es una enzima específica de tejido y se encuentra principalmente en tejidos gluconeogénicos, como el hígado y los riñones. La expresión específica de PCK1 en estos tejidos es coherente con su función central en la regulación de la gluconeogénesis. Por último, PCK1 tiene un papel crucial en la gliceroneogénesis, produciendo glicerol-3-fosfato que sirve como precursor para la esterificación de ácidos grasos en triglicéridos [167], y como precursor para la síntesis de glucosa *de novo*, lo cual, junto con su capacidad de utilizar aminoácidos y lactato, es fundamental para mantener la homeostasis de la glucosa en situaciones de ayuno [303] o alta demanda energética [304-306].

Reflejo de la relevancia de PCK1 en el contexto de la gluconeogénesis es que su sobreexpresión en el hígado de ratones provoca una producción excesiva de glucosa [172], y su carencia en ratones *knockout* específico de hígado hace que sean incapaces de eliminar el oxaloacetato del ciclo de Krebs, lo que conduce a desarrollar hígado graso, además de desarrollar lipodistrofia debido a la pérdida de gliceroneogénesis y la consiguiente disminución en la reesterificación de ácidos grasos [307, 308]. En contraste, Franckhauser y colaboradores describieron cómo la sobreexpresión de PCK1-c en el tejido adiposo provoca que los ratones sean obesos y euglicémicos con una sensibilidad normal a la insulina [309]. Esa obesidad es el resultado de una mayor gliceroneogénesis y reesterificación de ácidos grasos junto con una disminución de los niveles circulantes de ácidos grasos [167, 175, 177, 309].

En cuanto a la regulación de PCK1, trabajos anteriores han indicado que la actividad y estabilidad de PCK1 estaban reguladas a nivel postraducciona mediante acetilación, fosforilación y ubiquitinación en respuesta al aporte de energía celular [326-329]. En ese contexto, PCK1 fue acetilada en su lisina K91 localizada en el sitio activo, por la acetiltransferasa p300 en condiciones de niveles altos de glucosa, aumentando la capacidad de PCK1 para realizar la reacción anaplerótica, convirtiendo el fosfoenolpiruvato en oxaloacetato. En el caso opuesto, con un aporte de energía bajo, SIRT1 desacetila PCK1 y restaura completamente la capacidad gluconeogénica de la enzima [326]. De esta manera, la acetilación bajo altas concentraciones de glucosa desencadena la actividad anaplerótica de PCK1 y la desacetilación mediada por SIRT1 promueve la cataplerosis [326]. En otro estudio posterior, fue descrito que PCK1 es capaz de autoacetilarse a sí misma utilizando el acetil-

CoA de manera independiente de p300, en su lisina K244 localizada en el interior de su sitio activo [327]. Por otro lado, también ha sido descrita la regulación postraducciona de PCK1 a través de su fosforilación por GSK3 β afecta a la eficiencia con la que SIRT1 desacetila a PCK1, disminuyendo su acetilación y aumentando la ubiquitinación y degradación. La fosforilación de la Ser90 adyacente a Lys91 es crítica para su estabilidad de PCK1, estimulando la desacetilación de PCK1 dependiente de SIRT1 en condiciones de baja disponibilidad de energía [326]. Curiosamente, se ha descrito la ubiquitinación *in vivo* de varias lisinas de PCK1 [330], incluida la Lys91 y otras como Lys71 o Lys124 que también pueden ser acetiladas [331, 332], lo cual pone de manifiesto un mecanismo competitivo entre la acetilación y la ubiquitinación.

En conjunto, estudios anteriores junto con los resultados actuales indican que diferentes modificaciones postraduccionales de PCK1 juegan un papel clave en el control de su actividad. Sin embargo, en cualquiera de esos casos, en ninguno de ellos se había descrito que esas alteraciones en la actividad de PCK1 se tradujese en una alteración en su capacidad gluconeogénica y, por ende, tampoco en su repercusión en los niveles de glucosa en sangre. Con todo, el hecho de que PCK1 necesite estar nedilado para llevar a cabo su actividad gluconeogénica, independientemente de sus niveles de proteína, tal como se describe en esta tesis, es un hallazgo trascendental que permite esclarecer un tanto más la compleja y estrecha regulación de este gen y la actividad de su proteína.

En cuanto a las modificaciones postraduccionales, estas son importantes reguladores de las funciones celulares, y su falta resulta en diferentes enfermedades humanas. La proteína expresada en células precursora neurales regulada negativamente durante el desarrollo 8 (NEDD8) es una proteína pequeña con un patrón de expresión amplio en tejidos adultos. La nedilación es la conjugación covalente reversible de NEDD8 con un residuo de lisina de la proteína sustrato que modifica las proteínas. La función mejor caracterizada de NEDD8 es la activación de la familia cullin-RING de ubiquitina-ligasas E3 (CRL) [310, 311]. Sin embargo, muchas otras proteínas han sido asociadas o modificadas por NEDD8, incluidas p53 y MDM2, EGFR, entre otras [239, 310, 312]. De este modo, la nedilación, además de las CRL, regula muchos procesos biológicos.

En el hígado, la nedilación se ha asociado a varias enfermedades como el hígado graso no alcohólico, reduciendo la oxidación de los ácidos grasos [259], la fibrosis hepática avanzada, el carcinoma hepatocelular [265-267] y en el colangiocarcinoma [268]. Sin embargo, en los últimos años se ha comenzado a elucidar una función más fisiológica, como lo es, por ejemplo, la adipogénesis [261].

Ante todo este contexto de la relevancia de que sea PCK1 el principal punto de control de un proceso tan importante para la supervivencia como lo es la gluconeogénesis, y sus otras implicaciones metabólicas relacionadas, se pone de manifiesto la importancia de la investigación realizada en esta tesis, en la cual señalamos por primera vez a la nedilación como modificación postraducciona crucial para que esta proteína pueda llevar a cabo su actividad enzimática.

Nuestros hallazgos indican que la nedilación hepática no sólo está regulada positivamente por el daño hepático, sino también por el estado energético. Si bien la deficiencia de energía (es decir, el ayuno o la restricción calórica) aumentó la nedilación, sus niveles se revirtieron cuando se restauraron los requisitos energéticos (realimentación). La regulación de los niveles de nedilación por la disponibilidad de nutrientes estaba funcionalmente vinculada a su papel en la producción de glucosa en el hígado. Por ejemplo, la inhibición farmacológica y genética de la nedilación en ratones redujo significativamente la capacidad gluconeogénica de los animales. Estos resultados están de acuerdo con un trabajo reciente en el que se indica que la inhibición de la nedilación atenuó la hiperglucemia en ratones obesos [264]. Aunque nuestros resultados apuntan también a un papel importante de la nedilación en la modulación de los niveles de glucosa, el mecanismo que hemos identificado es totalmente diferente. Mientras que en el estudio anterior, la inhibición de la nedilación mejoró la señalización de la insulina hepática al retrasar el recambio del sustrato del receptor de insulina (IRS) mediado por CRL, lo que resultó en una hiperglucemia reducida [264], en nuestra investigación señalamos que la nedilación de un sustrato específico, PCK1, en tres residuos de lisina (K278, K342 y K387) desempeña un papel clave en la gluconeogénesis hepática.

Investigaciones recientes han destacado la importancia de PCK1 en la fisiopatología de enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 y la obesidad. La comprensión de los mecanismos de regulación de esta enzima podría ofrecer nuevas perspectivas para el

desarrollo de terapias dirigidas a estas condiciones. Con respecto a la expresión de PCK1 en la diabetes tipo 2, la literatura existente muestra datos diferentes, ya que algunos han demostrado que no había relación entre la hiperglucemia en ayunas y la expresión de la proteína PCK1 [313], mientras que otros detectaron una mayor expresión de PCK1 en ratones diabéticos [314, 315]. En línea con esto, para averiguar si la sobreexpresión de PCK1 en el hígado provoca hiperglucemia y diabetes tipo 2, Valera y colaboradores generaron ratones transgénicos que sobreexpresaban PCK1-c en el hígado [172]. Estos ratones eran hiperglucémicos e hiperinsulinémicos, y tenían una disminución del contenido de glucógeno hepático y de los niveles de ARNm de GLUT-4 en el músculo, todo lo cual sugiere resistencia a la insulina. Esta idea ha sido respaldada por estudios de clamp euglucémicos-hiperinsulinémicos, en los que la sobreexpresión de PCK1 provocó un aumento del HGP y la disminución de la capacidad de la insulina para suprimir la gluconeogénesis [316]. Por otro lado, en 2003, Duplus y colaboradores describieron una población de pacientes obesos con diabetes tipo 2 con un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en las posiciones -1097 y -967 pb del promotor de PCK1 que se correlacionaba con los niveles de glucosa en sangre [317]. El caso opuesto fue ilustrado por Perales y colaboradores [318], quienes utilizaron el silenciamiento del ARN de PCK1 para suprimir la expresión de PCK1 en ratones diabéticos, lo que resultó en la moderación de la hiperglucemia. En conjunto, estos estudios establecen a PCK1 como gen posiblemente implicado en el desarrollo de la diabetes, y, el hecho de que esta proteína necesite estar nedilada, como se explica a lo largo de esta tesis, para que su actividad gluconeogénica sea plena, abre las puertas para nuevas vías de investigación con la nedilación de PCK1 como diana para el tratamiento de la diabetes tipo 2.

Ciertamente, la regulación de la función de PCK1 es bastante compleja y los variados fenotipos experimentales en ratones han sido ampliamente discutidos [167]. Aunque nuestros resultados identifican la nedilación de PCK1 como un nuevo mecanismo para regular la homeostasis de la glucosa en roedores, una limitación del presente trabajo es que no investigamos si las mutaciones descritas en los sitios nedilados de PCK1 también son relevantes en humanos y si estas mutaciones están relacionadas con la diabetes tipo 2 humana. Más estudios genéticos en personas con diabetes tipo 2 debería dilucidar estos aspectos. De hecho, nuestro trabajo no excluye que otras proteínas también puedan ser nediladas en ayuno o restricción calórica. En realidad, nuestro enfoque proteómico detectó

más proteínas que estaban nediladas en esas condiciones. Por lo tanto, será necesaria más investigación para dilucidar el papel funcional en la gluconeogénesis de otras proteínas nediladas.

Tomando todos nuestros resultados en conjunto, en la presente tesis se describe un nuevo papel de la nedilación en la regulación de la homeostasis de la glucosa, tanto en condiciones fisiológicas como patofisiológicas, involucrándose en el desarrollo de la diabetes tipo 2 en humanos. De este modo, PCK1 y su regulación emergen como piezas clave en el rompecabezas del metabolismo, desempeñando un papel crucial en la síntesis de glucosa y en la regulación del metabolismo energético. Su estudio continuo ofrece posibilidades para el avance en la comprensión y tratamiento de diversas enfermedades metabólicas. En definitiva, nuestros resultados revelan un nuevo mecanismo que participa en el control preciso de la homeostasis de la glucosa en todo el cuerpo, asociando la respuesta de la nedilación de PCK1 y su actividad gluconeogénica a la disponibilidad de nutrientes.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

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

- Los niveles hepáticos de las principales proteínas implicadas en la nedilación (NAE1 y NEDD8) están fuertemente regulados por el estado nutricional, aumentando durante el ayuno y disminuyendo tras la ingesta.
- La nedilación en el hígado es fundamental para la gluconeogénesis y alteraciones de este proceso provocan una disminución de la producción hepática de glucosa.
- El glucagón, la adrenalina y los glucocorticoides inducen un incremento de la nedilación en el hígado y requieren que PCK1 sea nedilado para inducir sus acciones gluconeogénicas.
- El bloqueo de la nedilación mejora el perfil glucémico en situaciones de resistencia a insulina.
- En el hígado de los pacientes con diabetes tipo 2 se encuentra un incremento en los niveles de proteína de NAE1, NEDD8 y cullins nediladas.
- PCK1 debe nedilarse en sus lisinas K278, K342 y K387 para ejercer su actividad gluconeogénica, y mutaciones en estos residuos provocan una disminución en la actividad enzimática de PCK1 y, por ende, de la producción hepática de glucosa.
- En su conjunto, estos resultados demuestran la identificación de un nuevo mecanismo biológico de gran relevancia en el contexto de la homeostasis metabólica, y más concretamente en el de la glucemia.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Agius, L., *Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism*. Molecular Aspects of Medicine, 2015. **46**: p. 34-45.
2. Bell, G.I., *Molecular biology of mammalian glucose transporters*. Diabetes Care, 1990. **13**(3).
3. Afshar, N., *Computational Modeling of Glucose Uptake in the Enterocyte*. Frontiers in Physiology, 2019. **10**: p. 380.
4. O E Owen, A.P.M., H G Kemp, J M Sullivan, M G Herrera, G F Cahill Jr, *Brain metabolism during fasting*. Journal of Clinical Investigation, 1967. **46**(10).
5. Kahn, S.E., *The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes*. Diabetologia, 2003. **46**(1): p. 3-19.
6. Scheen, A.J., et al., *Glucose metabolism in obese subjects: lessons from OGTT, IVGTT and clamp studies*. International journal of obesity and related metabolic disorders, 1995. **19** (3): p. S14-20.
7. Jung, S.H., et al., *Adapting to insulin resistance in obesity: role of insulin secretion and clearance*. Diabetologia, 2018. **61**(3): p. 681-687.
8. Bojsen-Møller, K.N., et al., *Hepatic Insulin Clearance in Regulation of Systemic Insulin Concentrations-Role of Carbohydrate and Energy Availability*. Diabetes, 2018. **67**(11): p. 2129-2136.
9. Kim, S.H. and G.M. Reaven, *Insulin clearance: an underappreciated modulator of plasma insulin concentration*. Journal of Investigative Medicine, 2016. **64**(7): p. 1162-5.
10. Zhang, X., et al., *Unraveling the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis*. Frontiers in Endocrinology, 2018. **9**: p. 802.
11. Petersen, K.F., et al., *The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(31): p. 12587-94.
12. Magnusson, I., et al., *Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A 13C nuclear magnetic resonance study*. The Journal of Clinical Investigation, 1992. **90**(4): p. 1323-7.
13. Rizza, R.A., *Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy*. Diabetes, 2010. **59**(11): p. 2697-707.
14. Maggio, C.A. and F.X. Pi-Sunyer, *Obesity and type 2 diabetes*. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 2003. **32**(4): p. 805-22, viii.
15. Roden, M. and G.I. Shulman, *The integrative biology of type 2 diabetes*. Nature, 2019. **576**(7785): p. 51-60.
16. Mahajan, A., et al., *Refining the accuracy of validated target identification through coding variant fine-mapping in type 2 diabetes*. Nature Genetics, 2018. **50**(4): p. 559-571.
17. Gerich, J.E., *The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity*. Endocrine Reviews, 1998. **19**(4): p. 491-503.
18. Bellou, V., et al., *Risk factors for type 2 diabetes mellitus: An exposure-wide umbrella review of meta-analyses*. PLoS One, 2018. **13**(3): p. e0194127.
19. Wahl, S., et al., *Epigenome-wide association study of body mass index, and the adverse outcomes of adiposity*. Nature, 2017. **541**(7635): p. 81-86.
20. Barrès, R. and J.R. Zierath, *The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM*. Nature Reviews Endocrinology, 2016. **12**(8): p. 441-51.

21. Galicia-Garcia, U., et al., *Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(17).
22. Felber, J.P., *Significance of the Randle-Mechanism in the etiology of diabetes type II*. Hormone and Metabolic Research, 1990. **22**: p. 11-7.
23. Scheen, A.J., *Insulin resistance syndrome and atherosclerotic cardiovascular disease*. Acta Clinica Belgica, 1996. **51**(2): p. 65-9.
24. Ravussin, E. and S.R. Smith, *Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002. **967**: p. 363-78.
25. Raskin, P., Y. Fujita, and R.H. Unger, *Effect of insulin-glucose infusions on plasma glucagon levels in fasting diabetics and nondiabetics*. Journal of Clinical Investigation, 1975. **56**(5): p. 1132-8.
26. Lewis, G.F., M. Vranic, and A. Giacca, *Glucagon enhances the direct suppressive effect of insulin on hepatic glucose production in humans*. American Physiological Society Journal, 1997. **272**(3 Pt 1): p. E371-8.
27. Peter J Klover, R.A.M., *Hepatocytes: critical for glucose homeostasis*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004. **36**(5).
28. Karnani, M. and D. Burdakov, *Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and comparative physiology., 2011. **300**(1): p. R47-55.
29. Tu, L., et al., *The ventromedial hypothalamic nucleus: watchdog of whole-body glucose homeostasis*. Cell Bioscience, 2022. **12**(1): p. 71.
30. Stanley, S., A. Moheet, and E.R. Seaquist, *Central Mechanisms of Glucose Sensing and Counterregulation in Defense of Hypoglycemia*. Endocrine Reviews, 2019. **40**(3): p. 768-788.
31. Khodai, T. and S.M. Luckman, *Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus Neurons Under the Magnifying Glass*. Endocrinology, 2021. **162**(10).
32. Levin, B.E., A.A. Dunn-Meynell, and V.H. Routh, *Brain glucose sensing and body energy homeostasis: role in obesity and diabetes*. American Physiological Society Journal, 1999. **276**(5): p. R1223-31.
33. Hirschberg, P.R., et al., *Ventromedial hypothalamus glucose-inhibited neurones: A role in glucose and energy homeostasis?* Journal of Neuroendocrinology, 2020. **32**(1): p. e12773.
34. Verberne, A.J., A. Sabetghadam, and W.S. Korim, *Neural pathways that control the glucose counterregulatory response*. Frontiers in Neuroscience, 2014. **8**: p. 38.
35. López-Gamero, A.J., et al., *Brain Glucose-Sensing Mechanism and Energy Homeostasis*. Molecular Neurobiology, 2019. **56**(2): p. 769-796.
36. Naoki Uyama, A.G., Hendrik Reynaert, *Neural connections between the hypothalamus and the liver*. The Anatomical Record, 2004. **280A**.
37. Deem, J.D., et al., *Identification of Hypothalamic Glucoregulatory Neurons That Sense and Respond to Changes in Glycemia*. Diabetes, 2023. **72**(9): p. 1207-1213.
38. Thorens, B., *Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2011. **13**(S1): p. 82-8.
39. Choi, J.H. and M.S. Kim, *Homeostatic Regulation of Glucose Metabolism by the Central Nervous System*. Endocrinology and Metabolism 2022. **37**(1): p. 9-25.
40. Ogunnowo-Bada, E.O., et al., *Brain glucose sensing, glucokinase and neural control of metabolism and islet function*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2014. **16** (Suppl 1): p. 26-32.
41. Chadt, A. and H. Al-Hasani, *Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease*. Pflugers Arch, 2020. **472**(9): p. 1273-1298.

42. Mike Mueckler, B.T., *The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters*. Molecular Aspects of Medicine, 2013. **34**(0).
43. Pascal Seyer, D.V., Carole Poitry-Yamate, Frédéric Schütz, Salima Metref, David Tarussio, Pierre Maechler, Bart Staels, Bernard Lanz, Rolf Grueter, Julie Decaris, Scott Turner, Anabela da Costa, Frédéric Preitner, Kaori Minehira, Marc Foretz, and Bernard Thorens, *Hepatic glucose sensing is required to preserve β cell glucose competence*. The Journal of Clinical Investigation, 2013. **123**(4).
44. P B Iynedjian, S.M., A Gjinovci, B Genin, S P Deng, L Buhler, P Morel, G Mentha, *Glucokinase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the human liver. Regulation of gene expression in cultured hepatocytes*. Journal of Clinical Investigation, 1995. **95**(5): p. 1966-1973.
45. R M O'Doherty, D.L.L., J Seoane, A M Gómez-Foix, J J Guinovart, C B Newgard, *Differential metabolic effects of adenovirus-mediated glucokinase and hexokinase I overexpression in rat primary hepatocytes*. The Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(34).
46. Iynedjian, P.B., *Mammalian glucokinase and its gene*. Biochemical Journal 1993. **293**(Pt 1): p. 1-13.
47. German, M.S., *Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(5): p. 1781-5.
48. Porte, D., Jr., *A receptor mechanism for the inhibition of insulin release by epinephrine in man*. Journal of Clinical Investigation, 1967. **46**(1): p. 86-94.
49. Bratusch-Marrain, P.R., *Insulin-counteracting hormones: their impact on glucose metabolism*. Diabetologia, 1983. **24**(2): p. 74-9.
50. Vionnet, N., et al., *Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Nature, 1992. **356**(6371): p. 721-2.
51. Froguel, P., et al., *Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Nature, 1992. **356**(6365): p. 162-4.
52. Hevener, A.L., R.N. Bergman, and C.M. Donovan, *Novel glucosensor for hypoglycemic detection localized to the portal vein*. Diabetes, 1997. **46**(9): p. 1521-5.
53. Delaere, F., C. Magnan, and G. Mithieux, *Hypothalamic integration of portal glucose signals and control of food intake and insulin sensitivity*. Diabetes Metabolism, 2010. **36**(4): p. 257-62.
54. Schmitt, M., *Influences of hepatic portal receptors on hypothalamic feeding and satiety centers*. American Physiological Society Journal, 1973. **225**(5): p. 1089-95.
55. Reidelberger, R.D., *Abdominal vagal mediation of the satiety effects of exogenous and endogenous cholecystokinin in rats*. American Physiological Society Journal, 1992. **263**(6 Pt 2): p. R1354-8.
56. Abbott, C.R., et al., *The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway*. Brain Research, 2005. **1044**(1): p. 127-31.
57. Date, Y., et al., *The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats*. Gastroenterology, 2002. **123**(4): p. 1120-8.
58. Rickels, M.R., et al., *Glycemic thresholds for activation of counterregulatory hormone and symptom responses in islet transplant recipients*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007. **92**(3): p. 873-9.
59. Havel, P.J. and B. Ahren, *Activation of autonomic nerves and the adrenal medulla contributes to increased glucagon secretion during moderate insulin-induced hypoglycemia in women*. Diabetes, 1997. **46**(5): p. 801-7.

60. Pacák, K., et al., *Effects of various stressors on in vivo norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and on the pituitary-adrenocortical axis*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1995. **771**: p. 115-30.
61. Wasserman, D.H., et al., *Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work*. American Physiological Society Journal, 1989. **257**(1 Pt 1): p. E108-17.
62. Hancock, A.S., et al., *Glucagon deficiency reduces hepatic glucose production and improves glucose tolerance in adult mice*. Molecular Endocrinology, 2010. **24**(8): p. 1605-14.
63. Gelling, R.W., et al., *Lower blood glucose, hyperglucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(3): p. 1438-43.
64. Sørensen, H., et al., *Glucagon receptor knockout mice display increased insulin sensitivity and impaired beta-cell function*. Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3463-9.
65. Conarello, S.L., et al., *Glucagon receptor knockout mice are resistant to diet-induced obesity and streptozotocin-mediated beta cell loss and hyperglycaemia*. Diabetologia, 2007. **50**(1): p. 142-50.
66. Liang, Y., et al., *Reduction in glucagon receptor expression by an antisense oligonucleotide ameliorates diabetic syndrome in db/db mice*. Diabetes, 2004. **53**(2): p. 410-7.
67. Sloop, K.W., et al., *Hepatic and glucagon-like peptide-1-mediated reversal of diabetes by glucagon receptor antisense oligonucleotide inhibitors*. The Journal of Clinical Investigation, 2004. **113**(11): p. 1571-81.
68. Lee, Y., et al., *Hyperglycemia in rodent models of type 2 diabetes requires insulin-resistant alpha cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(36): p. 13217-22.
69. Perry, R.J., et al., *Glucagon stimulates gluconeogenesis by INSP3R1-mediated hepatic lipolysis*. Nature, 2020. **579**(7798): p. 279-283.
70. Tengholm, A. and E. Gylfe, *cAMP signalling in insulin and glucagon secretion*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2017. **19**(S1): p. 42-53.
71. Janah, L., et al., *Glucagon Receptor Signaling and Glucagon Resistance*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(13).
72. Urcelay, E., et al., *Characterization of the alpha 1-adrenoceptor-mediated responses in perfused rat liver*. Biochimica et Biophysica Acta 1993. **1220**(1): p. 49-56.
73. Moratinos, J., et al., *Alpha-adrenoceptor involvement in catecholamine-induced hyperglycaemia in conscious fasted rabbits*. British Journal of Pharmacology, 1986. **89**(1): p. 55-66.
74. Uyama, N., A. Geerts, and H. Reynaert, *Neural connections between the hypothalamus and the liver*. The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology, 2004. **280**(1): p. 808-20.
75. Jensen, J., et al., *Effects of adrenaline on whole-body glucose metabolism and insulin-mediated regulation of glycogen synthase and PKB phosphorylation in human skeletal muscle*. Metabolism, 2011. **60**(2): p. 215-26.
76. Christensen, N.J., *Plasma norepinephrine and epinephrine in untreated diabetics, during fasting and after insulin administration*. Diabetes, 1974. **23**(1): p. 1-8.
77. Bolli, G.B. and C.G. Fanelli, *Physiology of glucose counterregulation to hypoglycemia*. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 1999. **28**(3): p. 467-93, v.
78. Exton, J.H. and C.R. Park, *Control of gluconeogenesis in the perfused liver of normal and adrenalectomized rats*. Journal of Biological Chemistry, 1965. **240**: p. 955-7.

79. Sistare, F.D. and R.C. Haynes, Jr., *Acute stimulation by glucocorticoids of gluconeogenesis from lactate/pyruvate in isolated hepatocytes from normal and adrenalectomized rats*. Journal of Biological Chemistry, 1985. **260**(23): p. 12754-60.
80. Kuo, T., et al., *Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2015. **872**: p. 99-126.
81. Kuo, T., C.A. Harris, and J.C. Wang, *Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2013. **380**(1-2): p. 79-88.
82. Exton, J.H., et al., *Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue*. Journal of Biological Chemistry, 1972. **247**(11): p. 3579-88.
83. DeFronzo, R.A. and D. Tripathy, *Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2009. **32** (S2): p. S157-63.
84. Charmandari, E., C. Tsigos, and G. Chrousos, *Endocrinology of the stress response*. Annual Review of Physiology, 2005. **67**: p. 259-84.
85. Wise, J.K., R. Hendler, and P. Felig, *Influence of glucocorticoids on glucagon secretion and plasma amino acid concentrations in man*. The Journal of Clinical Investigation, 1973. **52**(11): p. 2774-82.
86. Ohshima, K., et al., *Effects of dexamethasone on glucose transport by skeletal muscles of obese (ob/ob) mice*. International Journal of Obesity, 1989. **13**(2): p. 155-63.
87. Haluzik, M., et al., *Adrenalectomy improves diabetes in A-ZIP/F-1 lipotrophic mice by increasing both liver and muscle insulin sensitivity*. Diabetes, 2002. **51**(7): p. 2113-8.
88. Holland, W.L., et al., *Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance*. Cell Metabolism, 2007. **5**(3): p. 167-79.
89. Rafacho, A., et al., *Pancreatic alpha-cell dysfunction contributes to the disruption of glucose homeostasis and compensatory insulin hypersecretion in glucocorticoid-treated rats*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93531.
90. Van Cauter, E. and L. Plat, *Physiology of growth hormone secretion during sleep*. The Journal of Pediatrics, 1996. **128**(5 Pt 2): p. S32-7.
91. Alexopoulou, O., et al., *Prevalence and risk factors of impaired glucose tolerance and diabetes mellitus at diagnosis of acromegaly: a study in 148 patients*. Pituitary, 2014. **17**(1): p. 81-9.
92. Kim, S.H. and M.J. Park, *Effects of growth hormone on glucose metabolism and insulin resistance in human*. Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism, 2017. **22**(3): p. 145-152.
93. Hu, X., et al., *The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021. **6**(1): p. 402.
94. Tong, J., et al., *Physiologic concentrations of exogenously infused ghrelin reduces insulin secretion without affecting insulin sensitivity in healthy humans*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013. **98**(6): p. 2536-43.
95. Barazzoni, R., et al., *Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007. **92**(10): p. 3935-40.
96. Andralojc, K.M., et al., *Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas*. Diabetologia, 2009. **52**(3): p. 486-93.
97. Fang, F., et al., *Growth hormone acts on liver to stimulate autophagy, support glucose production, and preserve blood glucose in chronically starved mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019. **116**(15): p. 7449-7454.

98. Lucidi, P., et al., *Ghrelin is not necessary for adequate hormonal counterregulation of insulin-induced hypoglycemia*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 2911-4.
99. Fu, Z., E.R. Gilbert, and D. Liu, *Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes*. Current Diabetes Reviews, 2013. **9**(1): p. 25-53.
100. Gerich, J.E., *Control of glycaemia*. Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism, 1993. **7**(3): p. 551-86.
101. Aronoff, S.L., et al., *Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon*. Diabetes spectrum, 2004. **17**(3): p. 183-190.
102. Edgerton, D.S., et al., *Insulin's direct hepatic effect explains the inhibition of glucose production caused by insulin secretion*. JCI Insight, 2017. **2**(6): p. e91863.
103. Barthel, A. and D. Schmoll, *Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2003. **285**(4): p. E685-92.
104. Li, X., et al., *Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator*. Nature, 2007. **447**(7147): p. 1012-6.
105. Ayala, J.E., et al., *Conservation of an insulin response unit between mouse and human glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoters: transcription factor FKHR binds the insulin response sequence*. Diabetes, 1999. **48**(9): p. 1885-9.
106. Hall, R.K., et al., *Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(39): p. 30169-75.
107. I, O.S., et al., *FoxO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization*. Nature Communications, 2015. **6**: p. 7079.
108. Puigserver, P., et al., *Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction*. Nature, 2003. **423**(6939): p. 550-5.
109. Matsumoto, M., et al., *Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism*. The Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(9): p. 2464-72.
110. Lee, Y.H. and M.F. White, *Insulin receptor substrate proteins and diabetes*. Archives of Pharmacal Research, 2004. **27**(4): p. 361-70.
111. Ravier, M.A. and G.A. Rutter, *Glucose or insulin, but not zinc ions, inhibit glucagon secretion from mouse pancreatic alpha-cells*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1789-97.
112. Kawamori, D., et al., *Insulin signaling in alpha cells modulates glucagon secretion in vivo*. Cell Metabolism, 2009. **9**(4): p. 350-61.
113. Lewis, G.F., et al., *Fatty acids mediate the acute extrahepatic effects of insulin on hepatic glucose production in humans*. Diabetes, 1997. **46**(7): p. 1111-9.
114. Satake, S., et al., *Direct and indirect effects of insulin on glucose uptake and storage by the liver*. Diabetes, 2002. **51**(6): p. 1663-71.
115. Sharabi, K., et al., *Molecular pathophysiology of hepatic glucose production*. Molecular Aspects of Medicine, 2015. **46**: p. 21-33.
116. Chiasson, J.L., et al., *Insulin regulation of skeletal muscle glycogen metabolism*. American Physiological Society Journal, 1980. **239**(1): p. E69-74.
117. Saltiel, A.R., *Insulin signaling in health and disease*. Journal of Clinical Investigation, 2021. **131**(1).
118. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
119. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.

120. Rushing, P.A., et al., *Inhibition of central amylin signaling increases food intake and body adiposity in rats*. Endocrinology, 2001. **142**(11): p. 5035.
121. Perley, M.J. and D.M. Kipnis, *Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects*. Journal of Clinical Investigation, 1967. **46**(12): p. 1954-62.
122. Kim, W. and J.M. Egan, *The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment*. Pharmacological Reviews, 2008. **60**(4): p. 470-512.
123. Brown, J.C. and J.R. Dryburgh, *A gastric inhibitory polypeptide. II. The complete amino acid sequence*. Canadian Journal of Biochemistry, 1971. **49**(8): p. 867-72.
124. Schmidt, W.E., E.G. Siegel, and W. Creutzfeldt, *Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets*. Diabetologia, 1985. **28**(9): p. 704-07.
125. Komatsu, R., et al., *Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide I-(7-36)-amide*. Diabetes, 1989. **38**(7): p. 902-5.
126. Willms, B., et al., *Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1996. **81**(1): p. 327-32.
127. Prigeon, R.L., et al., *Suppression of glucose production by GLP-1 independent of islet hormones: a novel extrapancreatic effect*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2003. **285**(4): p. E701-7.
128. Nauck, M.A., et al., *Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus*. The Journal of Clinical Investigation, 1993. **91**(1): p. 301-7.
129. Clemmensen, C., et al., *Emerging hormonal-based combination pharmacotherapies for the treatment of metabolic diseases*. Nature Reviews Endocrinology, 2019. **15**(2): p. 90-104.
130. Knerr, P.J., et al., *Selection and progression of unimolecular agonists at the GIP, GLP-1, and glucagon receptors as drug candidates*. Peptides, 2020. **125**: p. 170225.
131. Gilbert, M.P. and R.E. Pratley, *GLP-1 Analogs and DPP-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes Therapy: Review of Head-to-Head Clinical Trials*. Frontiers in Endocrinology, 2020. **11**: p. 178.
132. Moore, M.C., et al., *Sources of carbon for hepatic glycogen synthesis in the conscious dog*. The Journal of Clinical Investigation, 1991. **88**(2): p. 578-87.
133. Han, H.S., et al., *Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective*. Experimental & Molecular Medicine, 2016. **48**(3): p. e218.
134. von Wilamowitz-Moellendorff, A., et al., *Glucose-6-phosphate-mediated activation of liver glycogen synthase plays a key role in hepatic glycogen synthesis*. Diabetes, 2013. **62**(12): p. 4070-82.
135. Aiston, S., et al., *Glucose 6-phosphate causes translocation of phosphorylase in hepatocytes and inactivates the enzyme synergistically with glucose*. Biochemical Journal, 2004. **377**(Pt 1): p. 195-204.
136. Sternisha, S.M. and B.G. Miller, *Molecular and cellular regulation of human glucokinase*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2019. **663**: p. 199-213.
137. Pilkis, S.J. and T.H. Claus, *Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes*. Annual Review of Nutrition, 1991. **11**: p. 465-515.
138. Owen, O.E., S.C. Kalhan, and R.W. Hanson, *The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(34): p. 30409-12.

139. Adeva-Andany, M.M., et al., *Liver glucose metabolism in humans*. Bioscience Reports, 2016. **36**(6).
140. Brouwers, M., et al., *Modulation of Glucokinase Regulatory Protein: A Double-Edged Sword?* Trends in Molecular Medicine, 2015. **21**(10): p. 583-594.
141. Rider, M.H., et al., *6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis*. Biochemical Journal, 2004. **381**(Pt 3): p. 561-79.
142. Shimano, H., et al., *Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(50): p. 35832-9.
143. Ma, L., N.G. Tsatsos, and H.C. Towle, *Direct role of ChREBP.Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(12): p. 12019-27.
144. Iizuka, K. and Y. Horikawa, *ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome*. Endocrine Journal, 2008. **55**(4): p. 617-24.
145. McDevitt, R.M., et al., *De novo lipogenesis during controlled overfeeding with sucrose or glucose in lean and obese women*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2001. **74**(6): p. 737-46.
146. Zhang, T., et al., *Acetylation negatively regulates glycogen phosphorylase by recruiting protein phosphatase 1*. Cell Metabolism, 2012. **15**(1): p. 75-87.
147. Agius, L., *Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism*. Biochemical Journal, 2008. **414**(1): p. 1-18.
148. Ogawa, A., et al., *Case of glycogen storage disease type VI (phosphorylase deficiency) complicated by focal nodular hyperplasia*. Pediatrics International, 2010. **52**(3): p. e150-3.
149. Li, X.H., et al., *Inherent lipid metabolic dysfunction in glycogen storage disease IIIa*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014. **455**(1-2): p. 90-7.
150. Kirchner, S., et al., *The role of hepatic, renal and intestinal gluconeogenic enzymes in glucose homeostasis of juvenile rainbow trout*.
Journal of Comparative Physiology B, 2008. **178**(3): p. 429-38.
151. Surholt, B. and E.A. Newsholme, *Maximum activities and properties of glucose 6-phosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates*. Biochemical Journal 1981. **198**(3): p. 621-9.
152. Gilles Mithieux, F.R., Amandine Gautier-Stein, and Maud Soty, *Adaptation of Hepatic, Renal and Intestinal Gluconeogenesis During Food Deprivation*. Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation, 2017. **178**(3): p. 1-15.
153. Mithieux, G., et al., *Contribution of intestine and kidney to glucose fluxes in different nutritional states in rat*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2006. **143**(2): p. 195-200.
154. Paksu, M., et al., *Gluconeogenesis defect presenting with resistant hyperglycemia and acidosis mimicking diabetic ketoacidosis*. Pediatric Emergency Care, 2011. **27**(12): p. 1180-1.
155. Jitrapakdee, S., et al., *Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase*. Biochemical Journal, 2008. **413**(3): p. 369-87.
156. Cappel, D.A., et al., *Pyruvate-Carboxylase-Mediated Anaplerosis Promotes Antioxidant Capacity by Sustaining TCA Cycle and Redox Metabolism in Liver*. Cell Metabolism, 2019. **29**(6): p. 1291-1305.e8.
157. Kumashiro, N., et al., *Targeting pyruvate carboxylase reduces gluconeogenesis and adiposity and improves insulin resistance*. Diabetes, 2013. **62**(7): p. 2183-94.

158. Adina-Zada, A., T.N. Zeczycki, and P.V. Attwood, *Regulation of the structure and activity of pyruvate carboxylase by acetyl CoA*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2012. **519**(2): p. 118-30.
159. Zhang, S., et al., *The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility*. Nutrition & Metabolism, 2014. **11**(1): p. 10.
160. Klyuyeva, A., et al., *Tissue-specific kinase expression and activity regulate flux through the pyruvate dehydrogenase complex*. Journal of Biological Chemistry, 2019. **294**(3): p. 838-851.
161. Kolobova, E., et al., *Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites*. Biochemical Journal, 2001. **358**(Pt 1): p. 69-77.
162. Jeong, J.Y., et al., *Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase*. Diabetes & Metabolism Journal, 2012. **36**(5): p. 328-35.
163. Jeoung, N.H., et al., *Role of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDHK4) in glucose homeostasis during starvation*. Biochemical Journal 2006. **397**(3): p. 417-25.
164. Jeoung, N.H., et al., *Fasting induces ketoacidosis and hypothermia in PDHK2/PDHK4-double-knockout mice*. Biochemical Journal 2012. **443**(3): p. 829-39.
165. Consoli, A., et al., *Determination of Krebs cycle metabolic carbon exchange in vivo and its use to estimate the individual contributions of gluconeogenesis and glycogenolysis to overall glucose output in man*. The Journal of Clinical Investigation, 1987. **80**(5): p. 1303-10.
166. Yu, S., et al., *Phosphoenolpyruvate carboxykinase in cell metabolism: Roles and mechanisms beyond gluconeogenesis*. Molecular Metabolism, 2021. **53**: p. 101257.
167. Beale, E.G., B.J. Harvey, and C. Forest, *PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes*. Cell Biochemistry and Biophysics, 2007. **48**(2-3): p. 89-95.
168. Olswang, Y., et al., *A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(2): p. 625-30.
169. Devine, J.H., et al., *Adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter requires peroxisome proliferator-activated receptor gamma and 9-cis-retinoic acid receptor binding to an adipocyte-specific enhancer in vivo*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(19): p. 13604-12.
170. Herzig, S., et al., *CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1*. Nature, 2001. **413**(6852): p. 179-83.
171. Koo, S.H., et al., *The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism*. Nature, 2005. **437**(7062): p. 1109-11.
172. Valera, A., et al., *Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(19): p. 9151-4.
173. She, P., et al., *Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism*. Molecular and Cellular Biology, 2000. **20**(17): p. 6508-17.
174. Semakova, J., et al., *PEPCK-C reexpression in the liver counters neonatal hypoglycemia in Pck1 (del/del) mice, unmasking role in non-gluconeogenic tissues*. Journal of Physiology and Biochemistry, 2017. **73**(1): p. 89-98.
175. Burgess, S.C., et al., *Impaired tricarboxylic acid cycle activity in mouse livers lacking cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(47): p. 48941-9.
176. Burgess, S.C., et al., *Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver*. Cell Metabolism, 2007. **5**(4): p. 313-20.

177. Hakimi, P., et al., *Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the critical role of cataplerosis in the control of hepatic metabolism*. Nutrition & Metabolism, 2005. **2**: p. 33.
178. Reshef, L., et al., *Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(33): p. 30413-6.
179. Zhao, S., et al., *Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation*. Science, 2010. **327**(5968): p. 1000-4.
180. Jiang, W., et al., *Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase*. Molecular Cell, 2011. **43**(1): p. 33-44.
181. Hanson, R.W. and L. Reshef, *Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression*. Annual Review of Biochemistry, 1997. **66**: p. 581-611.
182. Sasaki, K., et al., *Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. The dominant role of insulin*. Journal of Biological Chemistry, 1984. **259**(24): p. 15242-51.
183. Oh, K.J., et al., *CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis*. BMB Reports, 2013. **46**(12): p. 567-74.
184. Erion, D.M., et al., *Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by knockdown of cAMP response element-binding protein*. Cell Metabolism, 2009. **10**(6): p. 499-506.
185. Zhou, X.Y., et al., *Insulin regulation of hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB-binding protein*. Nature Medicine, 2004. **10**(6): p. 633-7.
186. Biggs, W.H., 3rd, et al., *Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(13): p. 7421-6.
187. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.
188. Matsumoto, M., et al., *Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver*. Cell Metabolism, 2007. **6**(3): p. 208-16.
189. Puigserver, P., et al., *A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis*. Cell, 1998. **92**(6): p. 829-39.
190. Yoon, J.C., et al., *Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1*. Nature, 2001. **413**(6852): p. 131-8.
191. Lin, J., et al., *Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice*. Cell, 2004. **119**(1): p. 121-35.
192. Mayr, B. and M. Montminy, *Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**(8): p. 599-609.
193. London, E., M. Bloyd, and C.A. Stratakis, *PKA functions in metabolism and resistance to obesity: lessons from mouse and human studies*. Journal of Endocrinology, 2020. **246**(3): p. R51-r64.
194. Altarejos, J.Y. and M. Montminy, *CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2011. **12**(3): p. 141-51.
195. Dentin, R., et al., *Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2*. Nature, 2007. **449**(7160): p. 366-9.
196. Liu, Y., et al., *A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange*. Nature, 2008. **456**(7219): p. 269-73.
197. Wang, Y., et al., *Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor regulates hepatic gluconeogenesis in fasting and diabetes*. Nature, 2012. **485**(7396): p. 128-32.
198. Ozcan, L., et al., *Calcium signaling through CaMKII regulates hepatic glucose production in fasting and obesity*. Cell Metabolism, 2012. **15**(5): p. 739-51.

199. Cao, W., et al., *p38 Mitogen-activated protein kinase plays a stimulatory role in hepatic gluconeogenesis*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(52): p. 42731-7.
200. Mihaylova, M.M., et al., *Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis*. Cell, 2011. **145**(4): p. 607-21.
201. Rosa, J.L., et al., *Regulation of hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase gene expression by glucagon*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(30): p. 22540-5.
202. Jiang, G. and B.B. Zhang, *Glucagon and regulation of glucose metabolism*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2003. **284**(4): p. E671-8.
203. Miller, R.A. and M.J. Birnbaum, *Glucagon: acute actions on hepatic metabolism*. Diabetologia, 2016. **59**(7): p. 1376-1381.
204. Vegiopoulos, A. and S. Herzig, *Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2007. **275**(1-2): p. 43-61.
205. Lemke, U., et al., *The glucocorticoid receptor controls hepatic dyslipidemia through Hes1*. Cell Metabolism, 2008. **8**(3): p. 212-23.
206. Opherck, C., et al., *Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus*. Molecular Endocrinology, 2004. **18**(6): p. 1346-53.
207. Winkler, R., et al., *Histone deacetylase 6 (HDAC6) is an essential modifier of glucocorticoid-induced hepatic gluconeogenesis*. Diabetes, 2012. **61**(2): p. 513-23.
208. Kim, Y.D., et al., *Orphan nuclear receptor small heterodimer partner negatively regulates growth hormone-mediated induction of hepatic gluconeogenesis through inhibition of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) transactivation*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(44): p. 37098-108.
209. Kim, Y.D., et al., *Metformin inhibits growth hormone-mediated hepatic PDK4 gene expression through induction of orphan nuclear receptor small heterodimer partner*. Diabetes, 2012. **61**(10): p. 2484-94.
210. Mueller, K.M., et al., *Hepatic growth hormone and glucocorticoid receptor signaling in body growth, steatosis and metabolic liver cancer development*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2012. **361**(1-2): p. 1-11.
211. Michael, M.D., et al., *Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction*. Molecular Cell, 2000. **6**(1): p. 87-97.
212. Chou, J.Y. and B.C. Mansfield, *Mutations in the glucose-6-phosphatase-alpha (G6PC) gene that cause type Ia glycogen storage disease*. Human Mutation, 2008. **29**(7): p. 921-30.
213. Thorens, B., *GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis*. Diabetologia, 2015. **58**(2): p. 221-32.
214. Ramazi, S. and J. Zahiri, *Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods*. Database (Oxford), 2021. **2021**.
215. Deribe, Y.L., T. Pawson, and I. Dikic, *Post-translational modifications in signal integration*. Nature Structural & Molecular Biology, 2010. **17**(6): p. 666-72.
216. Ravid, T. and M. Hochstrasser, *Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008. **9**(9): p. 679-90.
217. Wilkinson, K.D., *Protein ubiquitination: a regulatory post-translational modification*. Anticancer Drug Desing, 1987. **2**(2): p. 211-29.
218. Kamitani, T., et al., *Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(45): p. 28557-62.

219. Kumar, S., Y. Tomooka, and M. Noda, *Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992. **185**(3): p. 1155-61.
220. Whitby, F.G., et al., *Crystal structure of the human ubiquitin-like protein NEDD8 and interactions with ubiquitin pathway enzymes*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(52): p. 34983-91.
221. Wu, S., et al., *CAND1 controls in vivo dynamics of the cullin 1-RING ubiquitin ligase repertoire*. Nature Communications, 2013. **4**: p. 1642.
222. Larsen, C.N., J.S. Price, and K.D. Wilkinson, *Substrate binding and catalysis by ubiquitin C-terminal hydrolases: identification of two active site residues*. Biochemistry, 1996. **35**(21): p. 6735-44.
223. Wu, K., et al., *DEN1 is a dual function protease capable of processing the C terminus of Nedd8 and deconjugating hyper-neddylated CUL1*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(31): p. 28882-91.
224. Mendoza, H.M., et al., *NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(28): p. 25637-43.
225. Wada, H., et al., *Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. **251**(3): p. 688-92.
226. Gan-Erdene, T., et al., *Identification and characterization of DEN1, a deneddylase of the ULP family*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(31): p. 28892-900.
227. Bohnsack, R.N. and A.L. Haas, *Conservation in the mechanism of Nedd8 activation by the human AppBp1-Uba3 heterodimer*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(29): p. 26823-30.
228. Huang, D.T., et al., *A unique E1-E2 interaction required for optimal conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8*. Nature Structural & Molecular Biology, 2004. **11**(10): p. 927-35.
229. Gong, L. and E.T. Yeh, *Identification of the activating and conjugating enzymes of the NEDD8 conjugation pathway*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(17): p. 12036-42.
230. Mamun, M., et al., *Discovery of neddylation E2s inhibitors with therapeutic activity*. Oncogenesis, 2023. **12**(1): p. 45.
231. Huang, D.T., et al., *E2-RING expansion of the NEDD8 cascade confers specificity to cullin modification*. Molecular Cell, 2009. **33**(4): p. 483-95.
232. Zhou, W., et al., *UBE2M Is a Stress-Inducible Dual E2 for Neddylation and Ubiquitylation that Promotes Targeted Degradation of UBE2F*. Molecular Cell, 2018. **70**(6): p. 1008-1024.e6.
233. Merlet, J., et al., *Regulation of cullin-RING E3 ubiquitin-ligases by neddylation and dimerization*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009. **66**(11-12): p. 1924-38.
234. Duda, D.M., et al., *Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation*. Cell, 2008. **134**(6): p. 995-1006.
235. Wim E. Crusio, J.D.L., Yi Sun, Wenyi Wei, Jianping Jin, N. Zheng, *Cullin-RING Ligases and Protein Neddylation*. Vol. 1217. 2020, Singapore: Springer.
236. Deshaies, R.J. and C.A. Joazeiro, *RING domain E3 ubiquitin ligases*. Annual Review of Biochemistry, 2009. **78**: p. 399-434.
237. Zhao, Y., M.A. Morgan, and Y. Sun, *Targeting Neddylation pathways to inactivate cullin-RING ligases for anticancer therapy*. Antioxidants & Redox Signaling, 2014. **21**(17): p. 2383-400.
238. Zhou, L., et al., *Neddylation: a novel modulator of the tumor microenvironment*. Molecular Cancer, 2019. **18**(1): p. 77.
239. Enchev, R.I., B.A. Schulman, and M. Peter, *Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015. **16**(1): p. 30-44.

240. Gao, F., et al., *Neddylation of a breast cancer-associated protein recruits a class III histone deacetylase that represses NFkappaB-dependent transcription*. *Nature Cell Biology*, 2006. **8**(10): p. 1171-7.
241. Oved, S., et al., *Conjugation to Nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(31): p. 21640-21651.
242. Stickle, N.H., et al., *pVHL modification by NEDD8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development*. *Molecular and Cellular Biology*, 2004. **24**(8): p. 3251-61.
243. Ryu, J.H., et al., *Hypoxia-inducible factor α subunit stabilization by NEDD8 conjugation is reactive oxygen species-dependent*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. **286**(9): p. 6963-70.
244. Broemer, M., et al., *Systematic in vivo RNAi analysis identifies IAPs as NEDD8-E3 ligases*. *Molecular Cell*, 2010. **40**(5): p. 810-22.
245. Vousden, K.H. and D.P. Lane, *p53 in health and disease*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007. **8**(4): p. 275-83.
246. Sundqvist, A., et al., *Regulation of nucleolar signalling to p53 through NEDDylation of L11*. *EMBO reports*, 2009. **10**(10): p. 1132-9.
247. Xirodimas, D.P., et al., *Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity*. *Cell*, 2004. **118**(1): p. 83-97.
248. Guihard, S., et al., *The NEDD8 conjugation pathway regulates p53 transcriptional activity and head and neck cancer cell sensitivity to ionizing radiation*. *International Journal of Oncology*, 2012. **41**(4): p. 1531-40.
249. Watson, I.R., et al., *Mdm2-mediated NEDD8 modification of TAp73 regulates its transactivation function*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(45): p. 34096-103.
250. Abdelmohsen, K. and M. Gorospe, *Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR*. *Wiley Interdisciplinary Reviews*, 2010. **1**(2): p. 214-29.
251. Embade, N., et al., *Murine double minute 2 regulates Hu antigen R stability in human liver and colon cancer through NEDDylation*. *Hepatology*, 2012. **55**(4): p. 1237-48.
252. Fernández-Ramos, D. and M.L. Martínez-Chantar, *NEDDylation in liver cancer: The regulation of the RNA binding protein Hu antigen R*. *Pancreatology*, 2015. **15**(S4): p. S49-54.
253. Zhou, L., et al., *Protein neddylation and its alterations in human cancers for targeted therapy*. *Cell Signaling*, 2018. **44**: p. 92-102.
254. Soucy, T.A., et al., *The NEDD8 Conjugation Pathway and Its Relevance in Cancer Biology and Therapy*. *Genes Cancer*, 2010. **1**(7): p. 708-16.
255. Soucy, T.A., et al., *An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer*. *Nature*, 2009. **458**(7239): p. 732-6.
256. Brownell, J.E., et al., *Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic in situ*. *Molecular Cell*, 2010. **37**(1): p. 102-11.
257. Milhollen, M.A., et al., *Inhibition of NEDD8-activating enzyme induces rereplication and apoptosis in human tumor cells consistent with deregulating CDT1 turnover*. *Cancer Research*, 2011. **71**(8): p. 3042-51.
258. Lin, J.J., et al., *NEDD8-targeting drug MLN4924 elicits DNA rereplication by stabilizing Cdt1 in S phase, triggering checkpoint activation, apoptosis, and senescence in cancer cells*. *Cancer Research*, 2010. **70**(24): p. 10310-20.

259. Serrano-Maciá, M., et al., *Neddylation inhibition ameliorates steatosis in NAFLD by boosting hepatic fatty acid oxidation via the DEPTOR-mTOR axis*. *Molecular Metabolism*, 2021. **53**: p. 101275.
260. Ju, U.I., et al., *Neddylation of sterol regulatory element-binding protein 1c is a potential therapeutic target for nonalcoholic fatty liver treatment*. *Cell Death & Disease*, 2020. **11**(4): p. 283.
261. Park, H.S., et al., *PPAR γ neddylation essential for adipogenesis is a potential target for treating obesity*. *Cell Death & Differentiation*, 2016. **23**(8): p. 1296-311.
262. Zhang, X., et al., *Hepatic neddylation targets and stabilizes electron transfer flavoproteins to facilitate fatty acid beta-oxidation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. **117**(5): p. 2473-2483.
263. Rajerison, R.M., M. Faure, and F. Morel, *Relationship between cell volume and cation content in thick ascending limb of rat kidney*. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 1988. **412**(5): p. 497-502.
264. Chen, C., et al., *Cullin neddylation inhibitor attenuates hyperglycemia by enhancing hepatic insulin signaling through insulin receptor substrate stabilization*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2022. **119**(6).
265. Zubiete-Franco, I., et al., *Deregulated neddylation in liver fibrosis*. *Hepatology*, 2017. **65**(2): p. 694-709.
266. Barbier-Torres, L., et al., *Stabilization of LKB1 and Akt by neddylation regulates energy metabolism in liver cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(4): p. 2509-23.
267. Kumar, D., et al., *Degradation of splicing factor SRSF3 contributes to progressive liver disease*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2019. **129**(10): p. 4477-4491.
268. Olaizola, P., et al., *Targeting NAE1-mediated protein hyper-NEDDylation halts cholangiocarcinogenesis and impacts on tumor-stroma crosstalk in experimental models*. *Journal of Hepatology*, 2022. **77**(1): p. 177-190.
269. Jones, J., et al., *A targeted proteomic analysis of the ubiquitin-like modifier nedd8 and associated proteins*. *Journal of Proteome Research*, 2008. **7**(3): p. 1274-87.
270. Xirodimas, D.P., et al., *Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway*. *EMBO reports*, 2008. **9**(3): p. 280-6.
271. Li, T., et al., *A general approach for investigating enzymatic pathways and substrates for ubiquitin-like modifiers*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2006. **453**(1): p. 70-4.
272. Jin, L., et al., *The alpha-fetoprotein enhancer region activates the albumin and alpha-fetoprotein promoters during liver development*. *Developmental Biology*, 2009. **336**(2): p. 294-300.
273. Delgado, T.C., et al., *Neddylation, a novel paradigm in liver cancer*. *Translational Gastroenterology and Hepatology*, 2018. **3**: p. 37.
274. Zhao, T.J., et al., *Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010. **107**(16): p. 7467-72.
275. Quiñones, M., et al., *Circulating Irisin Levels Are Not Regulated by Nutritional Status, Obesity, or Leptin Levels in Rodents*. *Mediators of Inflammation*, 2015. **2015**: p. 620919.
276. Hughey, C.C., et al., *Approach to assessing determinants of glucose homeostasis in the conscious mouse*. *Mammalian Genome*, 2014. **25**(9-10): p. 522-38.
277. Ayala, J.E., et al., *Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice*. *Disease Models & Mechanisms*, 2010. **3**(9-10): p. 525-34.
278. Yang, Y., et al., *Alteration of de novo glucose production contributes to fasting hypoglycaemia in Fyn deficient mice*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e81866.

279. Ayala, J.E., et al., *Hyperinsulinemic-euglycemic clamps in conscious, unrestrained mice*. Journal of Visualized Experiments, 2011. **57**: p. 3188.
280. Okamoto, T., et al., *Establishment and characterization of a novel method for evaluating gluconeogenesis using hepatic cell lines, H4IIE and HepG2*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2009. **491**(1-2): p. 46-52.
281. Chutkow, W.A., et al., *Thioredoxin-interacting protein (Txnip) is a critical regulator of hepatic glucose production*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(4): p. 2397-406.
282. Committee, A.D.A.P.P., *Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes*. Diabetes Care, 2015. **45**(S1): p. S17-S38.
283. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. **41**(6): p. 1313-21.
284. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. Diabetologia, 1985. **28**(7): p. 412-9.
285. Jumper, J., et al., *Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold*. Nature, 2021. **596**(7873): p. 583-589.
286. Eastman, P., et al., *OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics*. PLOS Computational Biology, 2017. **13**(7): p. e1005659.
287. Chantada-Vázquez, M.D.P., et al., *SWATH-MS Protocols in Human Diseases*. Methods in Molecular Biology, 2021. **2259**: p. 105-141.
288. Lobato-Gil, S., et al., *Proteome-wide identification of NEDD8 modification sites reveals distinct proteomes for canonical and atypical NEDDylation*. Cell Reports, 2021. **34**(3): p. 108635.
289. Vogl, A.M., et al., *Global site-specific neddylation profiling reveals that NEDDylated cofilin regulates actin dynamics*. Nature Structural & Molecular Biology, 2020. **27**(2): p. 210-220.
290. Abidi, N. and D.P. Xirodimas, *Regulation of cancer-related pathways by protein NEDDylation and strategies for the use of NEDD8 inhibitors in the clinic*. Endocrine-Related Cancer, 2015. **22**(1): p. T55-70.
291. Levine, S. and A. Saltzman, *Feeding sugar overnight maintains metabolic homeostasis in rats and is preferable to overnight starvation*. Lab Animal, 2000. **34**(3): p. 301-6.
292. Fried, S.K., et al., *Regulation of leptin production in humans*. The Journal of Nutrition, 2000. **130**(12): p. 3127s-3131s.
293. Edgerton, D.S., et al., *Targeting insulin to the liver corrects defects in glucose metabolism caused by peripheral insulin delivery*. JCI Insight, 2019. **5**(7).
294. Schneeberger, M., et al., *Reduced α -MSH Underlies Hypothalamic ER-Stress-Induced Hepatic Gluconeogenesis*. Cell Reports, 2015. **12**(3): p. 361-70.
295. Jin, E.S., et al., *Hepatic glucose production pathways after three days of a high-fat diet*. Metabolism, 2013. **62**(1): p. 152-62.
296. Rognstad, R., *Rate-limiting steps in metabolic pathways*. Journal of Biological Chemistry, 1979. **254**(6): p. 1875-8.
297. Wolf, G., *Metabolic control of gluconeogenesis in transgenic mice: regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene*. Nutrition Reviews, 1994. **52**(8 Pt 1): p. 275-7.
298. Granner, D. and S. Pilkis, *The genes of hepatic glucose metabolism*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(18): p. 10173-6.
299. Leahy, P., et al., *CREB binding protein coordinates the function of multiple transcription factors including nuclear factor I to regulate phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(13): p. 8813-22.

300. Roesler, W.J., G.R. Vandenbark, and R.W. Hanson, *Identification of multiple protein binding domains in the promoter-regulatory region of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(16): p. 9657-64.
301. Zhang, W., et al., *FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(15): p. 10105-17.
302. Chakravarty, K., et al., *Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2005. **40**(3): p. 129-54.
303. Chandramouli, V., et al., *Quantifying gluconeogenesis during fasting*. American Journal of Physiology, 1997. **273**(6): p. E1209-15.
304. Shao, J., et al., *Chronic hyperglycemia enhances PEPCK gene expression and hepatocellular glucose production via elevated liver activating protein/liver inhibitory protein ratio*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 976-84.
305. Yang, J., et al., *Aspects of the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(40): p. 27031-5.
306. Petersen, K.F., T.B. Price, and R. Bergeron, *Regulation of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during exercise: impact of type 1 diabetes*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004. **89**(9): p. 4656-64.
307. She, P., et al., *Mechanisms by which liver-specific PEPCK knockout mice preserve euglycemia during starvation*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1649-54.
308. Goetzman, E.S., et al., *HIV protease inhibitor ritonavir induces lipodystrophy in male mice*. AIDS Research and Human Retroviruses, 2003. **19**(12): p. 1141-50.
309. Franckhauser, S., et al., *Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance*. Diabetes, 2002. **51**(3): p. 624-30.
310. Nakayama, K.I. and K. Nakayama, *Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(5): p. 369-81.
311. Kumar, S., Y. Yoshida, and M. Noda, *Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993. **195**(1): p. 393-9.
312. Rabut, G. and M. Peter, *Function and regulation of protein neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series*. EMBO reports, 2008. **9**(10): p. 969-76.
313. Samuel, V.T., et al., *Fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with Type 2 Diabetes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(29): p. 12121-6.
314. Qiao, A., et al., *Sam68 promotes hepatic gluconeogenesis via CRTC2*. Nature Communications, 2021. **12**(1): p. 3340.
315. Veneziale, C.M., J.C. Donofrio, and H. Nishimura, *The concentration of P-enolpyruvate carboxykinase protein in murine tissues in diabetes of chemical and genetic origin*. Journal of Biological Chemistry, 1983. **258**(23): p. 14257-62.
316. Sun, Y., et al., *Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(26): p. 23301-7.
317. Duplus, E., et al., *Expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in human adipose tissue: induction by rosiglitazone and genetic analyses of the adipocyte-specific region of the promoter in type 2 diabetes*. Biochimie, 2003. **85**(12): p. 1257-64.

318. Gómez-Valadés, A.G., et al., *Overcoming diabetes-induced hyperglycemia through inhibition of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) with RNAi*. Molecular Therapy journals, 2006. **13**(2): p. 401-10.

ANEXOS

ANEXO 1

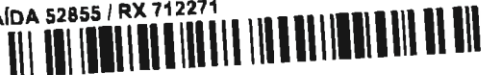


XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Departamento Territorial
Edificio Administrativo de Servizos Múltiples
Vicente Ferrer, 2
15071 – A Coruña

REXISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA
REXISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DE A CORUÑA
A CORUÑA Data 14/05/2018 13:44:11

SAÍDA 52855 / RX 712271



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

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15010/17/007

Data de inicio: 10.05.2018

Persoa interesada: Rubén Nogueiras Pozo

Forma de inicio: solicitude do interesado

Procedemento: resolución de autorización

ANTECEDENTES

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

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

Nome do centro usuario: CIMUS

Persoa responsable do proxecto: Rubén Nogueiras Pozo

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

Clasificación do proxecto : Tipo I ☐ Tipo II ☐ Tipo III ☒

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

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





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

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

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

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

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

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

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

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

A Coruña, 10 de maio de 2018
O xefe territorial

Manuel Rodríguez Vázquez

Asinado por: RODRIGUEZ VAZQUEZ, MANUEL
Cargo: XEFE TERRITORIAL
Data e hora: 14/05/2018 08:46:39

CVE: hK8hcBnYg1
Verificación: <https://sede.xunta.gal/cve>



ANEXO 2



Universidad
de Navarra

Comité de Ética de la Investigación

Dña. MARÍA BELÉN SADABA DÍAZ DE RADA, Secretaria Técnica del Comité de Ética de la Investigación de la Universidad de Navarra,

CERTIFICA: Que, en la sesión ordinaria celebrada el día 11/02/2021, el Comité examinó los aspectos éticos del proyecto **2021.005**, presentado por la **Dra. GEMA FRÜHBECK MARTÍNEZ**, como Investigadora Principal, titulado:

UNMASKING NEDDYLATION ASSOCIATED TO METABOLIC DISEASES (UNNAMED).

Se revisaron las respuestas de la investigadora a las cuestiones planteadas por el comité en la sesión ordinaria del día 25/03/2021, tras lo que se dictó un informe favorable para la realización de dicho proyecto, dado que ha considerado que se ajusta a las normas éticas esenciales y a los criterios deontológicos que rigen en este centro.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Pamplona, a 26 de marzo de 2021.

Dra. MARÍA BELÉN SADABA DÍAZ DE RADA

Secretaria Técnica

ANEXO 3

UNmasking Neddylation Associated to MEtabolic Diseases (UNNAMED)

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

1. El número de personas que padecen sobrepeso y obesidad se ha incrementado de forma alarmante a lo largo de las últimas décadas constituyendo, en la actualidad, un serio problema de salud pública. La obesidad favorece el desarrollo de otras enfermedades como la diabetes, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares o hígado graso no alcohólico, entre otras patologías. Recientemente se ha identificado que la **neddilación**, un proceso bioquímico que incorpora la proteína NEDD8 a ciertas moléculas diana para su degradación, está implicada en el desarrollo de diversas enfermedades humanas. Se le invita a participar en un estudio cuyo objetivo consiste en la identificación de proteínas implicadas en el proceso de neddilación y su contribución al desarrollo de obesidad y dos de las patologías más comúnmente asociadas a la obesidad, la diabetes tipo 2 y el hígado graso no alcohólico.

El hígado es responsable de una gran variedad de funciones biológicas como la secreción de bilis para la digestión de grasas, detoxificación y regulación del metabolismo glucídico y lipídico, entre muchas otras. El hígado produce una serie de proteínas que son liberadas a la circulación sanguínea que pueden influir en el desarrollo posterior de patologías de elevada prevalencia, tales como la obesidad y la diabetes tipo 2. La **neddilación** de estas proteínas en el hígado podría estar implicada en el desarrollo de estas enfermedades metabólicas. El estudio de la neddilación en los hepatocitos solo es posible extrayendo una biopsia de hígado para tratarlo posteriormente en el laboratorio. Así mismo para estudiar las sustancias liberadas a la circulación es necesario disponer de una muestra de su sangre. De forma paralela a la toma de muestras de sangre e hígado se procederá a la recogida de datos antropométricos y clínicos, que se asociarán a sus muestras biológicas.

Para realizar una comparación entre los diferentes perfiles moleculares, sería de gran utilidad contar con la participación de pacientes con obesidad con diferentes alteraciones del metabolismo de la glucosa (normoglucémicos y con diabetes tipo 2) así como con diferente grado de daño hepático (hígado normal, hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica). Le rogamos lea detenidamente esta información y consulte cualquier duda que pueda tener antes de firmar el consentimiento informado. Tómese su tiempo antes de decidir sobre su participación y consulte con su familia u otras personas si lo desea

2. Si Vd. decide participar en este estudio se le extraerá una **muestra de 20 cc de sangre y una biopsia hepática (100 mg) durante la cirugía** a la que Vd. se somete sin la existencia de ningún riesgo para su salud. Asimismo, se le extraerá **otra muestra de 20 cc de sangre 12 meses después de la cirugía**, durante la visita de seguimiento del paciente. Las biopsias hepáticas se toman de forma rutinaria en la operación a la que Vd. se va a someter para el estudio anátomo-patológico del hígado. Si Vd. decide participar en este estudio, una porción de esta biopsia hepática (100 mg) se utilizará para esta investigación. Estas muestras se obtendrán mediante laparoscopia durante la cirugía a la que Vd. se somete el paciente sin la existencia de ningún riesgo para su salud.

3. Los procedimientos extraordinarios que se realicen por la participación en el estudio, serán sin coste.
4. Se le solicita permiso para que si en el momento de la finalización del proyecto existe todavía muestra, en lugar de desecharla, se conserve. Se le ofrecen las siguientes opciones: a) donación de la muestra al biobanco FATBANK del Instituto de Salud Carlos III; y b) la destrucción de la muestra sobrante. El **Biobanco FATBANK** es una plataforma tecnológica de soporte a la investigación promovida por el CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) del Instituto de Salud Carlos III. FATBANK se ha creado con la finalidad de crear una colección de muestras biológicas obtenidas de pacientes con obesidad y con normopeso con el fin de analizar su relación e incidencia en el desarrollo de distintas enfermedades. Su misión es garantizar que todos los procesos relacionados con el uso de muestras humanas y datos asociados se realicen de acuerdo con los principios éticos internacionales, cumpliendo la ley y con procedimientos técnicos que garanticen orden y calidad. Las muestras y sus derivados, marcados con un código de donante, se incorporarán al Biobanco FATBANK y serán almacenados hasta que se agoten en condiciones de orden, seguridad y prevención de incidencias.

La investigadora responsable (Dra. Gema Frühbeck, Depto. Endocrinología y Nutrición, Clínica Universidad de Navarra; teléfono 948 25 54 00, ext. 4484) se compromete a que el(los) destino(s) final(es) de la muestra sea el que Vd. ha elegido en la Hoja de Consentimiento Informado adjunta.

5. Los resultados obtenidos en el estudio serán estrictamente de investigación y la información resultante será procesada siempre preservando su identidad. Estos datos analizados en un grupo amplio de personas permitirán posteriormente extraer conclusiones que beneficiarían a otros pacientes futuros. No está previsto informarle de los resultados del estudio ni habrá beneficio para el participante.
6. Se procederá a codificar sus muestras mediante un código alfa-numérico, cumpliendo el compromiso de confidencialidad.
7. La aceptación para participar en este proyecto de investigación es absolutamente voluntaria y en cualquier momento que Vd. desee podrá retirarse del estudio sin que derive repercusión alguna en su tratamiento.
8. De conformidad con la normativa de protección de datos, le informamos y usted autoriza expresamente a que sus datos se incorporaran a ficheros titularidad de la Clínica Universidad de Navarra, debidamente inscritos en el Registro General de Protección de Datos, con la finalidad de llevar a cabo toda la gestión y operativa del Estudio.
9. Si participa en este Estudio sus datos clínicos serán utilizados por la Dra. Gema Frühbeck (Departamento de Endocrinología y Nutrición, CUN), la Dra. Amaia Rodríguez (Laboratorio de Investigación Metabólica, CUN) y el Dr. Camilo Silva (Departamento de Endocrinología y Nutrición, CUN) para extraer conclusiones del tratamiento empleado. También podrán acceder a los datos las autoridades sanitarias y los miembros del comité ético si lo considerasen necesario.
10. Todos los datos personales incluidos los clínicos serán tratados conforme a las leyes actuales de protección de datos (Ley orgánica 3/2018 de Protección de Datos. Personales y garantía de los derechos digitales y derechos ARCO).
11. No será posible identificarle a usted a través de las comunicaciones que pudiera generar este estudio.

12. En todo momento, Vd., puede acceder, rectificar, oponerse y/o cancelar los datos personales existentes en nuestra base de datos, para lo cual deberá ponerse en contacto con la Clínica Universidad de Navarra, como responsable del fichero, y remitirnos una solicitud firmada a la dirección Avda., Pío XII nº 36 código postal 31008 de Pamplona.

UNmasking Neddylation Associated to MEtabolic Diseases (UNNAMED)

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Consentimiento de D. / Dña.

El Dr. / la Dra. me ha explicado de forma satisfactoria el objetivo del estudio y la forma de obtención de una muestra de sangre y de una biopsia de grasa. He recibido información clara y a mi plena satisfacción sobre el proyecto “**UNmasking Neddylayion Associated to MEtabolic Diseases (UNNAMED)**” en el que voluntariamente decido participar.

- Declaro que he leído la hoja de información al paciente sobre el estudio citado.
- Se me ha entregado una hoja de información al paciente y una copia de este consentimiento informado fechado y firmado. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio, así como los posibles beneficios y riesgos del mismo, y que se realiza con fines de investigación.
- He tenido la oportunidad para realizar preguntas y plantear las dudas que poseía. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.
- Accedo a que el equipo investigador consulte los datos de mi historia clínica si fuera de interés para el estudio.
- Se me ha asegurado que se mantendrá la confidencialidad de mis datos.
- El consentimiento lo otorgo de manera voluntaria y sé que soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento del mismo, por cualquier razón y sin que tenga ningún efecto sobre mi tratamiento médico futuro.

En consecuencia, doy mi consentimiento para la participación en el estudio propuesto.

Deseo que se destruyan las muestras a la finalización del proyecto

Sí ☐ No ☐

Doy mi consentimiento para la incorporación de las muestras al Biobanco FATBANK del Instituto de Salud Carlos III (Investigadora responsable: Dra. Gema Frühbeck, Clínica Universidad de Navarra)

Sí ☐ No ☐

Firmo por triplicado, quedándome una copia,

Pamplona, a de de 20....



Dr. / Dra.

Colegiado Nº.....

D. / Dña.

D.N.I.



La nedilación es un mecanismo postraducciona que agrega una proteína similar a la ubiquitina, a saber, la proteína 8 regulada negativamente durante el desarrollo expresada por células precursoras neurales (NEDD8). En este trabajo mostramos en ratones que la nedilación en el hígado está modulada por la disponibilidad de nutrientes. La inhibición de la nedilación en el hígado de ratón reduce la capacidad gluconeogénica y las acciones hiperglucémicas de las hormonas contrarreguladoras. Además, las personas con diabetes tipo 2 presentan niveles elevados de nedilación hepática. A nivel mecanístico, el ayuno o la restricción calórica de ratones conduce a la nedilación de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (PCK1) en tres residuos de lisina: K278, K342 y K387. Encontramos que la mutación de las tres lisinas PCK1 que están