



## EFFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS. ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO

**Cristina Rojas Domínguez**

**Dipòsit Legal: T. 987-2013**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

***A MI FAMILIA***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

*“Caminante no hay camino,  
se hace camino al andar”*

Fragmento del poema “Caminante no  
hay camino” de Antonio Machado.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

## **AGRADECIMIENTOS**

Después de realizar “mi particular camino doctoral” ha llegado ya el momento de llegar a la meta. Pese a que escribir la tesis me haya costado sudor y lágrimas, la etapa de doctorado me ha ayudado a aprender muchas cosas, aumentar mi círculo de amigos y también a conocerme mejor a mi misma. Sin duda creo que es una de esas experiencias que llevas contigo para siempre y que te hace ser más fuerte.

*Primerament, voldria agrair al Dr. Miquel Mulero el temps que m’ha dedicat i la paciència que ha tingut amb mi. Sense cap mena de dubte saps transmetre molt bé la teva passió per la Ciència a la gent que t’envolta. Hem tingut moments de decepció però ens n’hem ensortit a base de treballar i treballar i, en el present document hi trobem plasmat el resultat. També no podré oblidar mai els exemples que has emprat per animar-me a seguir en davant (cuidar i posar maco el Sis-cents, tot i que, no tinguem un Ferrari)...sincerament, moltes gràcies.*

*Aquest doctorat no seria una realitat sense el recolçament del grup de Nutrigenòmica. Agradeixo molt l’atenció rebuda pels professors: Lluís Arola, Josepa Salvadó, Cinta Bladé, Gerard Pujadas, Santi Garcia-Vallvé, Montse Pinent, Juan Fernández, Maite Blay, Anna Ardévol, Begoña Muguerza, Antoni Romeu, Anna Arola i Manuel Suárez.*

*També vull agrair tota l’ajuda rebuda des d’un punt de vista administratiu desde la Secretaria del Departament de Bioquímica i Biotecnologia a: la Montse, l’Ingrid i la Rosa Abelló.*

A continuación, pasaré revista al despacho de los técnicos. Muchas gracias a Niurka, Yaiza y Rosa por estar siempre al pie del cañón y es que creo que sois un pilar fundamental en este grupo. Siempre habéis sido muy cercanas y amables conmigo, chicas. Tampoco puedo olvidar a Vanessa Grifol por las agradables e interesantes charlas mantenidas en el laboratorio 113. *Vull donar les gràcies a la Cris Valls per haver-me ensenyat, aconsellat i, sobretot, escoltat... me n’alegro molt que el destí ens fes coincidir una altra vegada, aquest cop a la Universitat i al Pla de Sta Maria.* Gracias también a Santiago por su gran ayuda en los laboratorios de Docencia. Y no puedo

abandonar virtualmente este despacho de los técnicos 112 sin nombrar a Braulio, el cual siempre me ha animado y ayudado.

No dejo de acordarme de los primeros compañeros que tuve en el Departamento, los bioinformáticos ya doctorados Albert Pallejà, Esther Sala y Laura Guasch, los cuales me dieron ánimos para seguir luchando cuando más lo necesitaba. También querría aprovechar estas líneas para recordar a los ya doctores Isa Quesada y Mario Bustos (los argentinos del grupo que nos deleitaron con sus fabulosas barbacoas), Sabina, Helena, David Pajuelo y Anna Castell, los cuales supieron transmitir excelentemente su entusiasmo y su afán de superación a los demás. Como no, quiero dar gracias al resto de mis compañeros: a Anabel, la guindilla del grupo, quiero agradecerle todo el cariño y atención que me ha dedicado durante estos años de doctorado; a la Dra Ligia Guerrero por tratarme siempre con tanta dulzura y por ofrecerme su amistad incondicional; *també als meus companys doctors Lúdia i Víctor, sempre m'heu escoltat i ajudat quan ho he necessitat i us ho agraeixo enormement*; a Neus, mi compañera de al lado en el despacho y casi en frente en el laboratorio, que es una futbolista y científica de pro; a Ester Casanova, con la cual no puedo ir a un restaurante de Sitges de cuyo nombre no quiero acordarme; a Noemí, la gallega más dicharachera y alegre que conozco; a Laura Baselga, la doctorante más madrugadora; a Aleix, *que s'assembla a Ben Affleck i a més és bon jan*; a Husam, tan cordial y amable como siempre; a Maria, *que té el millor arròs* y a Zara, la más cocinitas del grupo. Muchas gracias a Sara Samino por su ayuda y compañía en los laboratorios de docencia. También quiero mandar ánimos a los bioinformáticos M<sup>a</sup> José y Adrià con los cuales he coincidido en el Soteras y a los que han entrado recientemente en el grupo para realizar el doctorado: Sarah, Susana y Joan. También quiero saludar a la torbellino Belén, la cual tiene el laboratorio revolucionado. Sin duda, durante mis años de doctorado he vivido momentos inolvidables con algunos de vosotros formando parte de un equipo de fútbol, el Recreativo de Juerga y de El club del viernes por la tarde, os lo agradezco enormemente.

*Moltes gràcies per ésser sempre tan propers i al vostre recolzament científic, la veritat és que sou un pou de sabiduria. Em refereixo als meus companys del CTNS: Anna Crescenti, Josep M<sup>a</sup> del Bas, Antoni Caimari, Isa Baiges i Sirle.*

También me gustaría agradecer no sólo el apoyo técnico recibido sino también las fructuosas charlas en el pasillo con los compañeros del laboratorio de Enología: Inma Andorrà, Boris, Marta Sancho, Gema, Isabel Araque, Claudio y Estíbaliz.

Muchas gracias a Alba Gómez, Alba Olivares, M<sup>a</sup>José Mansilla, María Ortega, Cris Sans y Eli Serra por haberme arropado tanto durante la carrera de Biotecnología en la UAB y también a mis compañeras de piso en la Vila Universitaria, *en especial a l'Anna d'Almacelles i a la Maria de El Far d'Empordà per ser encara avui tan bones amigues i quedar per veure'ns de tant en quan.*

*Thank you very much to all the friends I made in London. I get excited when I remember the time we spent together.*

También quiero agradecer a mis amigos y amigas de la pandilla tanto a los “viejos” como a los “jóvenes” y, también a mis amigos y conocidos de Valls por haberse interesado en conocer mis investigaciones, escucharme y transmitirme fuerza positiva.

Miguel Angel, muchas gracias por quererme, hacerme sonreír cada día y acompañarme tanto en los buenos como en los malos momentos. ¡Tú eres mi compañero, mi amigo, mi novioooo! ¡Te quiero mucho, guapo! También quiero agradecerle a la familia de Miguel A. por haberme tratado como a un miembro más de su familia desde un primer momento.

Aunque suene a mafia para mí lo más grande es mi familia. Lo que soy y lo que tengo se lo debo a ella. Muchas gracias, papá y mamá por quererme y apoyarme en todo lo que me he propuesto, por haberme inculcado unos valores tan importantes como el amor, el respeto y el luchar por lo que uno quiere. Gracias papá por transmitirme tu amor por tu tierra, Murcia, por ser firme en tus convicciones y no dejarte torcer ante las adversidades; hay pocas personas tan valientes y con tantas agallas como tú. ¡Te agradezco mucho mamá por ser como eres: tan buena, graciosa y derrochar alegría por todos los poros de tu piel, guapa! Los dos sois un ejemplo a seguir y, sin lugar a dudas, vuestra capacidad de sacrificio ha marcado mi personalidad y la de mis dos hermanos, a los cuales quiero con locura. Mis hermanos me han enseñado a ser constante y perseverante entre otras muchas cosas y, también, fueron los que me

animaron a practicar el atletismo, deporte que para mí es como una droga. También, quiero dar gracias a mi cuñada Magda y a mi sobrinilla Andrea, la cual ha llenado de felicidad y alegría nuestras vidas. No puedo olvidar tampoco el amor incondicional de mi abuela Josefa y mi chacha Dora, mis tíos y mis primos. Gracias también a mis vecinos de toda la vida, en especial a Eugenio y a su familia.

## ***ABSTRACT***

Endoplasmic reticulum (ER) stress response, also called UPR (Unfolded Protein Response), has an important role either in liver lipid metabolism and hepatic steatosis, which is the hepatic manifestation of the Metabolic Síndrome (MS). On the other hand, polyphenols are plant secondary metabolites which have beneficial effects on health. In fact, polyphenols-rich food ingestion is linked to prevention and improvement of MS risk factors.

It has been reported that some polyphenols reduce lipid accumulation *in vitro* and *in vivo*. In contrast, saturated fatty acids rich-diet promotes UPR activation and hepatic steatosis *in vivo*. Due to the intersection of the ER stress signaling pathways and hepatic lipid metabolism, we hypothesized that the polyphenols ability to reduce lipid accumulation induced by saturated fatty acids treatment could be mediated by a reduction in the UPR *in vivo* and *in vitro*. The results suggest that grape seed proanthocyanidins extract (GSPE) and docosahexaenoic acid (DHA) are able to reduce ER stress in a rat model of diet-induced obesity. Specifically, GSPE reduces eIF2 $\alpha$  phosphorylation while DHA decreases splicing of XBP1. Surprisingly, in HepG2 cells acute treatments, resveratrol (RSV) enhanced both toxicity and apoptosis induced by palmitate. Elucidation of the molecular mechanisms that participate in this effect led us to study the membrane saturation and, specifically, the enzyme SCD1 as an important target in the action of this polyphenol. The impairment in the capacity to “mobilize” the cellular saturation activated UPR mechanisms and the related apoptosis. Initially this mechanism is derived from a metabolic hypothesis and must be validated in primary hepatocytes. However, it could have a hypothetical anti-cancer application. In contrast to what obtained in acute treatments, the chronic RSV preconditioning has a protective effect in palmitate-induced ER stress in HepG2 cells due to a decrease in pro-apoptotic molecules (PUMA, CHOP) expression and, thus, an improvement in the adaptive ability of these cells against stronger ER stress inducers.

## **RESUMEN**

La respuesta a estrés de retículo endoplasmático (RE), también conocida como UPR (del inglés, *Unfolded Protein Response*), tiene un papel muy destacado en el metabolismo lipídico hepático, así como en la esteatosis hepática (patología considerada como la manifestación hepática del síndrome metabólico (SM)). Por otro lado, los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas que ejercen efectos beneficiosos sobre la salud. De hecho, la ingestión de alimentos ricos en polifenoles está relacionada con la prevención y mejora de los factores de riesgo asociados al SM.

Se ha descrito que los polifenoles reducen la acumulación lipídica *in vitro* e *in vivo*. Por otra parte, se ha observado que una dieta rica en ácidos grasos saturados promueve la activación de la UPR y la esteatosis hepática *in vivo*. Debido a la interacción existente entre las vías de señalización de estrés del RE y la regulación de la lipogénesis hepática, en esta tesis nos planteamos demostrar si la capacidad de los polifenoles para reducir la acumulación lipídica inducida por el tratamiento con ácidos grasos saturados podría ser mediada en parte por una disminución en la respuesta a estrés de RE *in vivo* e *in vitro*. En conclusión, los resultados de esta tesis sugieren que las proantocianidinas de la pepita de uva (GSPE) y el DHA tienen capacidad para reducir el estrés de RE en ratas modelo de obesidad. En estos animales, el GSPE ayudaría a reducir la fosforilación de eIF2 $\alpha$  mientras que el DHA disminuiría el splicing de XBP1. Sorprendentemente, los tratamientos agudos con resveratrol (RSV) en células HepG2 exacerbaban la toxicidad y apoptosis producida por el palmitato. La elucidación de los mecanismos moleculares que participan en dicho efecto apuntó a la saturación de la membrana y concretamente a la enzima SCD1 como diana importante en la acción del polifenol. La afectación en la capacidad de “movilización” de la saturación celular disparó los mecanismos de estrés de RE y la correspondiente apoptosis. A la espera de la realización de estudios con cultivos primarios, este mecanismo aunque inicialmente derivado de una hipótesis metabólica podría tener una hipotética aplicación anticancerosa. En contraposición a lo obtenido en experimentos agudos, el precondicionamiento crónico con RSV tiene un efecto protector frente al estrés de RE inducido por palmitato en células HepG2 debido a una disminución en la expresión de

moléculas proapoptóticas (CHOP, PUMA) y, por tanto, a una mejora en la capacidad adaptativa de estas células frente a posibles inductores de estrés de mayor magnitud.

## ***ABREVIATURAS***

**AG:** ácido graso.

**AP-1:** activador de proteína-1.

**ATF4:** *activating transcription factor 4*.

**ATF6:** Activating Transcription Factor 6.

**BiP:** proteína de unión a inmunoglobulinas, *Binding immunoglobulin protein*.

**CHOP:** *C/EBP homologous protein*.

**CNX:** calnexina.

**CRT:** calreticulina.

**DISC:** *Death-inducing signaling complex*.

**DOC:** *downstream of CHOP*.

**EGCG:** (-)-epigallocatequin galato.

**eIF2 $\alpha$ :** subunidad  $\alpha$  del factor iniciación 2 de la traducción en eucariotas eIF2;  
*eukaryotic translation-initiation factor 2*.

**ERAD:** sistema de degradación asociado al RE, *ER-associated degradation*.

**ERO1 $\alpha$ :** la oxidasa 1 $\alpha$  del RE.

**ERSE:** elementos de respuesta a estrés de RE; *ER stress response elements*.

**ERSE-II:** elementos de respuesta a estrés de RE; *ER stress response elements II*.

**FADD:** Dominio de muerte asociado a Fas; *Fas-associated death domain*.

**FAS:** AG sintasa, *fatty acid synthase*.

**GADD34:** *growth-arrest and DNA-damage-inducible protein 34*.

**GLS:** secuencias de localización a Golgi; *Golgi localization sequences*.

**GRP78:** proteína de 78 kDa regulada por glucosa, *78 kDa glucose-regulated protein*.

**GRP94:** *96 kDa glucose-regulated protein*.

**IAP:** proteínas inhibidoras de la apoptosis; *inhibitors of apoptosis proteins*.

**IP3R:** receptor inositol trifosfato, *inositol triphosphate receptor*.

**IRE1:** inositol-requiring protein 1 $\alpha$ .

**I $\kappa$ B:** inhibidor de NF $\kappa$ B; *inhibitor of NF $\kappa$ B*.

**JIK:** *c-Jun-N-terminal inhibitory kinase*.

**MAPK:** proteínas quinasas activadas por mitógenos; *mitogen-activated protein kinases*.

**MPT:** poro de transición de permeabilidad mitocondrial; *mitochondrial permeability transition pore*.

**NAFLD:** La esteatosis hepática o hígado graso no alcohólico; *nonalcoholic fatty liver disease*.

**NASH:** esteatohepatitis no alcohólica; *nonalcoholic steatohepatitis*.

**NF $\kappa$ B:** factor nuclear- $\kappa$ B; *nuclear factor- $\kappa$ B*.

**NRF2:** *nuclear factor-erythroid-derived 2 (NF-E2)-related factor 2*.

**O $_2^{\cdot -}$ :** anión superóxido.

**PARP:** (poly(ADP-ribosa) polimerasa.

**PDI:** proteína disulfuro isomerasa; *Protein disulfide isomerase*.

**PERK:** double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase.

**PI3K:** fosfoinositol 3-quinasa.

**PP1:** proteína fosfatasa 1; *protein phosphatase 1*.

**QRC:** quercetina.

**RIP:** proteólisis intramembranal regulada; *regulated intramembranal proteolysis*.

**RSV:** resveratrol.

**S1P:** proteasa de sitio 1; *site-1 protease*.

**S2P:** proteasa de sitio 2; *site-2 protease*.

**SERCA:** bomba ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático/sarcoplásmico; *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium-ATPase*.

**SFA/MUFA:** ácidos grasos saturados/ácidos grasos monoinsaturados; *saturated fatty acids/monounsaturated fatty acids*.

**SM:** síndrome metabólico.

**SRP:** partícula de reconocimiento de Señal, *signal recognition particle*.

**TG:** triglicéridos.

**TNFR:** Receptor del factor de necrosis tumoral; *Tumor necrosis factor receptor*.

**TRAF2:** *TNF receptor-associated factor 2*.

**TRAIL2:** TNF-related apoptosis-inducing ligand.

**UPR:** respuesta a proteínas mal plegadas; *Unfolded Protein Response*.

**UPRE:** elemento de respuesta a proteínas mal plegadas; *UPR response elements*.

**VEGF:** factor de crecimiento endothelial vascular; *vascular endothelial growth factor*).

**XBP1:** *X-box DNA-binding protein 1*.

**XBP1s:** forma no procesada o precursora de XBP1; *spliced XBP1*.

**XBP1u:** forma no procesada o precursora de XBP1; *unspliced XBP1*.

**XIAP:** inhibidor de la apoptosis ligado a X; *X-linked inhibitor of apoptosis*.

## ÍNDICE

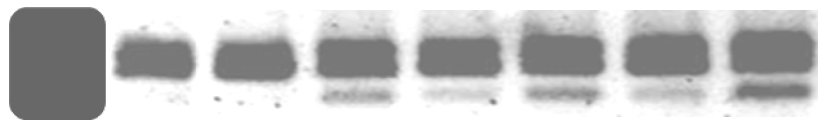
AGRADECIMIENTOS.....	ix
ABSTRACT .....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABREVIATURAS .....	xvi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Estrés de retículo endoplasmático (RE) y la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, <i>Unfolded Protein Response</i> ).....	3
1.1.1 Vía de PERK.....	5
1.1.2 Vía de IRE1.....	7
1.1.3 Vía ATF6.....	8
1.2 Apoptosis .....	9
1.2.1 Introducción .....	9
1.2.2 Reguladores y ejecutores de la apoptosis.....	10
1.2.3 Vías apoptóticas .....	12
1.2.3.1 Vía extrínseca .....	13
1.2.3.2 Vía intrínseca o mitocondrial.....	14
1.2.3.3 Vía de estrés de RE .....	15
1.3 Estrés de RE y enfermedades hepáticas .....	19
1.3.1 El estrés de RE en enfermedades hepáticas .....	19
1.3.2 Hígado graso no alcohólico (NAFLD).....	19
1.3.2.1 Interacción estrés de RE y NAFLD.....	20
1.3.2.2 La UPR y la progresión de la enfermedad en NAFLD .....	25
1.3.2.3 Activación de la UPR en obesidad humana y NAFLD .....	26
1.4 Los polifenoles y la salud .....	27
1.4.1 Los polifenoles.....	27
1.4.1.1 Flavonoides.....	27
1.4.1.2 No flavonoides.....	30
1.4.2 Biodisponibilidad de los polifenoles.....	31
1.4.3 Mecanismos biológicos de los polifenoles sobre el organismo .....	33
1.4.4 Efectos beneficiosos de los polifenoles sobre la salud .....	33
1.4.4.1 Obesidad y polifenoles .....	34

1.4.4.2 Dislipemia y polifenoles.....	35
1.4.4.3 Hipertensión arterial y polifenoles .....	36
1.4.4.4 Enfermedad Cardiovascular (ECV) y polifenoles .....	37
1.4.4.5 Resistencia a insulina y polifenoles .....	37
1.4.4.6 Cáncer y polifenoles .....	38
1.4.5 Efecto de los polifenoles sobre la respuesta a estrés de RE .....	39
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	45
3.1 Reactivos .....	47
3.2 Diseño experimental .....	48
3.2.1 Estudios <i>in vivo</i> .....	48
3.2.1.1 Experimento crónico con GSPE y/o DHA en ratas alimentadas con dieta de cafetería (modelo de obesidad) durante 21 días.....	48
3.2.2 Estudios <i>in vitro</i> .....	49
3.2.2.1 Experimentos agudos en células HepG2 .....	50
3.2.2.2 Experimento crónico en células HepG2 .....	52
3.3 Preparación de la solución palmitato-BSA.....	53
3.4 Ensayo MTT .....	53
3.5 Aislamiento de RNA .....	54
3.5.1 Extracción de RNA de cultivo celular (células HepG2) .....	55
3.5.2 Extracción de RNA de tejido hepático.....	56
3.6 Retrotranscripción .....	57
3.7 PCR cuantitativa a tiempo real .....	60
3.8 Análisis del splicing del mRNA de XBP1 .....	67
3.8.1 Protocolo splicing XBP1 para células humanas (células HepG2) .....	67
3.8.2 Protocolo splicing XBP1 para células hepáticas de rata.....	67
3.9 Tinción Oil Red O.....	68
3.10 Medida de la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS) .....	68
3.11 Extracción de proteínas totales .....	69
3.11.1 Extracción de proteínas de cultivo celular .....	69
3.11.2 Extracción de proteínas de muestra de tejido .....	70
3.12 Determinación de la concentración proteica .....	70

3.13 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS).....	71
3.14 Western blotting .....	73
3.15 Análisis estadístico .....	75
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	77
4.1 Estudios <i>In vivo</i> .....	79
4.1.1 Experimento crónico con GSPE y/o DHA en ratas alimentadas con dieta de cafetería (modelo de obesidad) durante 21 días. ....	79
4.2 Estudios <i>In vitro</i> .....	86
4.2.1 Experimentos agudos en células HepG2 .....	86
4.2.1.1 Bloque I. Tratamientos agudos con resveratrol y/o palmitato .....	86
4.2.1.2 Bloque II. Tratamientos agudos con quercetina y/o resveratrol .....	106
4.2.1.3 Bloque III. Experimento agudo con quercetina y/o resveratrol y/o palmitato .....	110
4.2.2 Experimento crónico en células HepG2 .....	114
5. RECAPITULACIÓN .....	121
6. CONCLUSIONES.....	129
7. BIBLIOGRAFÍA .....	133
8. ANEXO.....	145
Contribuciones a congresos.....	147
Artículo enviado a PLoS ONE .....	148

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

## ***1. INTRODUCCIÓN***



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

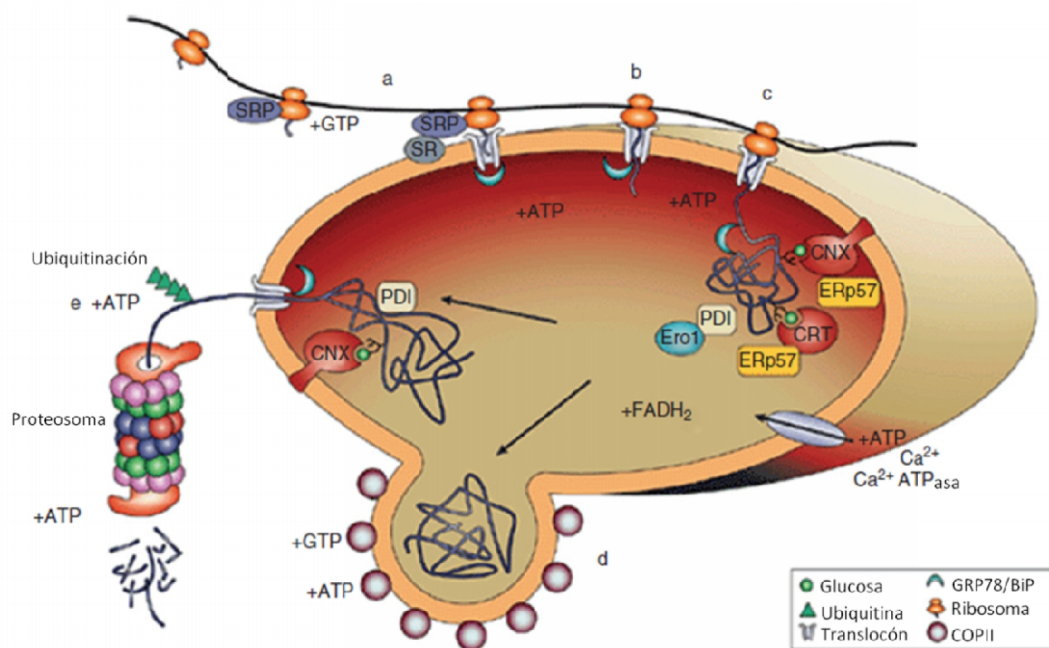
## 1.1 Estrés de retículo endoplasmático (RE) y la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, *Unfolded Protein Response*)

En células de mamífero, el retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo membranoso que lleva a cabo funciones muy importantes a nivel celular como son: la síntesis, el plegamiento y la maduración de proteínas, el almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  y la biosíntesis de lípidos (1,2).

Las proteínas destinadas a la síntesis y al plegamiento en el RE son dirigidas a dicho orgánulo celular mediante un péptido señal (figura **1a**). Este péptido señal expuesto por el ribosoma se une a una partícula de reconocimiento de señal (SRP), hecho que desencadena una pausa en la traducción hasta que el ribosoma no alcanza la membrana del RE. Después del acoplamiento de SRP con el receptor SRP (figura **1b**), se retoma la elongación traduccional. Los polipéptidos nacientes son translocados al RE cotraduccionalmente, es decir, que mientras la porción N-terminal de la proteína empieza a plegarse, la porción C-terminal de la proteína está todavía siendo sintetizada por el ribosoma (figura **1b-c**). El plegamiento ocurre básicamente en tres fases: i) los plegamientos cotraduccionales se llevan a cabo después de que la proteína atraviese la membrana del RE a través del complejo translocón Sec61p, ii) el plegamiento postraduccional se lleva a cabo después de que el polipéptido completo haya sido liberado del ribosoma y, iii) finalmente, se da el ensamblaje oligomérico. Sólo las proteínas plegadas correctamente viajan al aparato de Golgi (figura **1d**) mientras que las proteínas mal plegadas son retenidas en el RE por la función de las chaperonas y, son finalmente degradadas en el proteasoma mediante el sistema de degradación asociado al RE (ERAD) (figura **1e**). Una gran parte de las proteínas nacientes producidas en el RE están desplegadas o mal plegadas y, por tanto, existe un conjunto de chaperonas del RE encargadas de que éstas adopten una conformación adecuada. Algunas chaperonas y sensores del plegamiento claves en el RE incluyen: la proteína de 78 KDa regulada por glucosa (GRP78), también conocida como proteínas de unión a inmunoglobulinas (BiP); las lectinas, calnexina (CNX) y calreticulina (CRT), y;

## 1. INTRODUCCIÓN

las tiol-disulfuro oxidoreductasas, la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y ERp57. Todas estas proteínas residen en el RE a altas concentraciones y participan en todos los estadios de plegamiento y de control de calidad. Un control de calidad estricto dentro del RE previene la liberación de proteínas ensambladas y plegadas inadecuadamente al citosol o a otros orgánulos o compartimentos celulares.



**Figura 1. GRP78/BiP y otras chaperonas importantes involucradas en el plegamiento proteico en el RE.** a) Las proteínas destinadas a la síntesis y plegamiento en el RE son reconocidas a través de péptidos señal por la partícula de reconocimiento de señal (SRP) que se asocia al ribosoma. b) El paso del péptido nascente a través del translocón está acoplado a la actividad ATPasa de GRP78/BiP. c) GRP78/BiP funciona como una chaperona para plegar sustratos; lo mismo sucede con las lectinas calnexina (CNX) y calreticulina (CRT). La formación de puentes disulfuro está regulada por la actividad Ero1 a través de la proteína disulfuro isomerasa (PDI). d) Las proteínas plegadas correctamente salen del RE. e) Las proteínas mal plegadas pueden asociarse con GRP78/BiP, CNX y PDI para la retrotranslocación hacia el citosol, posterior ubiquitinización, y digestión en el proteosoma (siendo ambos procesos dependientes de ATP). Figura obtenida de (3).

Hay una serie de estímulos fisiológicos (o endógenos), farmacológicos y patológicos capaces de alterar la homeostasis del RE y de afectar la capacidad de plegamiento proteico, provocando una acumulación de proteínas mal plegadas y agregados proteicos que resultan perjudiciales para la supervivencia de la célula. A la incapacidad de la célula para plegar y secretar proteínas eficientemente se la denomina **estrés de RE**. En respuesta a estrés de RE, se activa una vía de transducción de señal conocida como **respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)** (1).

A nivel celular, la UPR tiene una fase adaptativa en la que se desencadenan tres tipos de respuestas celulares protectoras: i) un aumento en la expresión de chaperonas del RE como GRP78/BiP para mejorar el plegamiento proteico; ii) una disminución de la traducción proteica para reducir el influjo de proteínas nacientes en el RE; y iii) la degradación de proteínas mal plegadas en el proteosoma mediante el sistema ERAD. Estas tres respuestas protectoras sirven para limitar la carga proteica y reducir el estrés de RE. Por último, si el estrés de RE es excesivo o prolongado, entonces la célula activa mecanismos de muerte celular programada (apoptosis), algunos de los cuales derivan del propio RE.

En células de mamífero, la UPR está compuesta por tres vías de señalización promovidas por tres sensores proteicos ubicados en la membrana del RE (figura 2): PERK (*PKR-like ER kinase*), IRE1 (*inositol-requiring protein 1 $\alpha$* ) y ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*). Cada una de estas proteínas transmembrana tiene: un dominio luminal en el RE, el cual se asocia con la proteína GRP78/BiP; un dominio transmembrana, mediante el cual están ancladas a la membrana del RE; y, un dominio citosólico funcional. En condiciones de reposo, los tres sensores de estrés de RE son mantenidos en un estado inactivo mediante su asociación con la chaperona GRP78/BiP. En cambio, cuando hay estrés de RE en la célula, GRP78/BiP se disocia de los sensores de estrés y se une a las proteínas insuficientemente glicosiladas, mal plegadas, o no ensambladas, desencadenando de este modo la UPR. En investigación, se suele utilizar la activación de las vías de la UPR como indicador del estrés de RE debido a las dificultades técnicas en medir directamente la integridad del RE comprometido o agregados proteicos formados en el RE (1,3).

### 1.1.1 Vía de PERK

Tras la disociación de GRP78/BiP inducida por mal plegamiento proteico, PERK se homodimeriza y se autofosforila, activando así su actividad quinasa. Inicialmente, PERK fosforila a la subunidad  $\alpha$  del factor iniciación 2 de la traducción en eucariotas eIF2 (eIF2 $\alpha$ ) en el residuo Serina 51 (figura 2). Esto lleva a la rápida atenuación en el inicio de la traducción de mRNA, reduciendo de este modo la carga de nuevas proteínas que requieren plegamiento en el RE (4), y a una disminución de la síntesis de ciclina D1 con

## 1. INTRODUCCIÓN

el fin de mediar una parada del ciclo celular en dichas células estresadas. Sin embargo, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  potencia la traducción preferencial de algunos mRNAs como los de: ATF4 (*activating transcription factor 4*), GRP94 (*94 kDa glucose-regulated protein*) y GRP78/BiP (1). Concretamente, la expresión del factor de transcripción ATF4 controla los niveles de genes de prosupervivencia, los cuales están relacionados con el equilibrio redox, el metabolismo de los aminoácidos, el plegamiento proteico y la autofagia. No obstante, cuando el estrés de RE es sostenido, ATF4 activa un importante factor proapoptótico llamado CHOP (*C/EBP homologous protein*). CHOP estimula la expresión de la proteína GADD34 (*growth-arrest and DNA-damage-inducible protein 34*), la cual se acompleja con la proteína fosfatasa 1 (PP1) para desfosforilar eIF2 $\alpha$  y aliviar a la célula de la represión traduccional. Bajo condiciones fisiológicas, esta última etapa está diseñada para reanudar la síntesis de proteínas e inactivar la UPR (5). Adicionalmente, en caso de una marcada fosforilación eIF2 $\alpha$ , se activa el factor de transcripción factor nuclear- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) vía inhibición de la traducción del inhibidor de NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B).

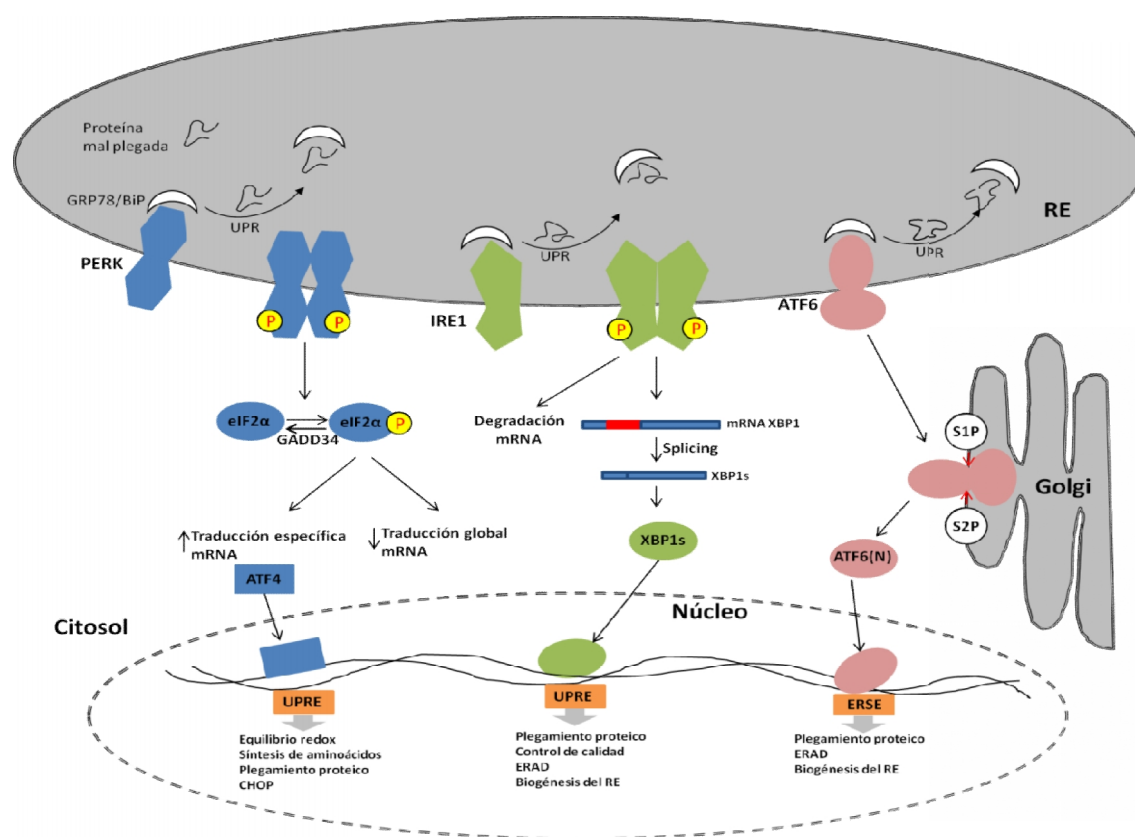


Figura 2. Estrés de RE y activación de las vías de señalización de la UPR. Figura obtenida de (1).

PERK también potencia la fosforilación y la translocación de Nrf2 (*nuclear factor-erythroid-derived 2 (NF-E2)-related factor 2*) al núcleo, lugar en el que este factor transcripcional sobreexpresa genes que codifican para enzimas con actividad antioxidante (2).

### 1.1.2 Vía de IRE1

La vía de IRE1 (figura 2) es la vía más conservada de la UPR. Las células de mamífero tienen dos genes IRE1: IRE1 $\alpha$  e IRE1 $\beta$ . IRE1 $\alpha$  se expresa ubicuamente; en cambio, la expresión de IRE1 $\beta$  está limitada al epitelio intestinal.

La proteína IRE1 $\alpha$  tiene un dominio amino-terminal en el lumen del RE, una región transmembrana, y un dominio carboxi-terminal citoplasmático que contiene las actividades catalíticas endoribonucleasa y Ser/Thr quinasa (4).

El mecanismo por el que IRE1 $\alpha$  detecta la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE ha sido ampliamente debatido. En levaduras, se ha observado que las proteínas mal plegadas también podrían unirse directamente a IRE1 promoviendo su homodimerización y autofosforilación. No obstante, en mamíferos, IRE1 $\alpha$  podría no interactuar con proteínas mal plegadas ya que se ha observado que la región amino terminal de IRE1 $\alpha$  no puede acomodar proteínas mal plegadas, proponiéndose en consecuencia que en mamíferos la activación de IRE1 depende solamente de la disociación de GRP78/BiP y no de la unión directa de proteínas mal plegadas (3,6).

Una vez activado, IRE1 $\alpha$  se homodimeriza, lo cual lleva a su autofosforilación y activación de sus funciones quinasa y endoribonucleasa. La activación de la función endoribonucleasa de IRE1 provoca el splicing alternativo del mRNA de XBP1 (*X-box DNA-binding protein 1*), un proceso en el que una secuencia de 26 nucleóticos del mRNA de XBP1 se escinde produciéndose un cambio en el marco de lectura en la traducción. Es importante destacar que el mecanismo de splicing del mRNA de XBP1 es completamente distinto del splicing mRNA convencional. El splicing del mRNA convencional se da en el núcleo y depende del spliceosoma mientras que el splicing del mRNA de XBP1 tiene lugar en el citoplasma y es independiente de spliceosoma. A diferencia de la proteína XBP1 no procesada (XBP1u, *unspliced XBP1*), que se traduce

## 1. INTRODUCCIÓN

pero es rápidamente degradada, la proteína procesada (XBP1s, *spliced XBP1*) codifica un factor de transcripción con un dominio potente de transactivación (propiedad que sirve para la comunicación con el aparato de traducción o síntesis de proteínas). Ambas formas de XBP1 pueden translocarse al núcleo y unirse a elementos de respuesta a estrés de RE (ERSE). No obstante, XBP1s activa la UPR mucho más potentemente que XBP1u ya que puede unirse a otros dos elementos de respuesta además de a ERSE: elemento de respuesta a proteínas mal plegadas (UPRE) y a elementos de respuesta a estrés de RE II (ERSE-II).

En situación de estrés de RE, la expresión del mRNA de XBP1 es potenciada por ATF6 $\alpha$ , proveyendo a IRE1 $\alpha$  de sustrato adicional para procesar mayor cantidad de forma transcripcionalmente activa (XBP1s). Por otro lado, XBP1u es inestable en la célula y puede heterodimerizar con ATF6 y XBP1s para promover su degradación proteosomal. Por tanto, XBP1u actuaría como regulador negativo de la UPR. Las dianas transcripcionales de XBP1s incluyen genes que codifican funciones de plegamiento proteico en el RE y control de calidad, ERAD, biogénesis del RE (4) y biosíntesis de fosfolípidos (hecho que permite la expansión de la membrana del RE) (1,5).

Además del splicing de XBP1, IRE1 $\alpha$  tiene un papel en la atenuación transcripcional en respuesta a estrés de RE (3). IRE1 $\alpha$  puede inducir la degradación selectiva de mRNAs codificantes para proteínas localizadas en la membrana del RE en un proceso denominado como RIDD (*regulated IRE1 $\alpha$ -dependent decay*), reduciendo así la importación de proteínas al lumen del RE (2,6).

### 1.1.3 Vía ATF6

Las células de vertebrado tienen dos genes ATF6: ATF6 $\alpha$  i ATF6 $\beta$ . Aunque ambos son expresados ubicuamente, ATF6 $\alpha$  es un activador transcripcional más potente que ATF6 $\beta$ . ATF6 (figura 2) posee un dominio N-terminal citoplasmático que contiene un motivo básico de cremallera de leucina que es esencial para la unión al DNA y también para la formación de dímeros (3,4). La forma residente en el RE de ATF6 (90 kDa de peso molecular) tiene dos secuencias de localización a Golgi (GLS, *Golgi localization sequences*) que están enmascaradas por la unión de GRP78/BiP (figura 2). Tras disociarse de GRP78/BiP, ATF6 se transloca a Golgi, lugar en el que su mitad C-terminal

es escindida por la proteasa S1P mientras que la mitad N-terminal anclada en la membrana es escindida por la proteasa S2P. La proteólisis secuencial de las proteasas S1P y S2P, en un proceso llamado proteólisis intramembranal regulada (RIP, *regulated intramembranal proteolysis*)(5), lleva a la liberación del dominio citosólico N-ter de ATF6, de 50 kDa. A continuación, este fragmento entra en el núcleo para unirse a ERSE activando en consecuencia genes diana de la UPR involucrados en ERAD, biosíntesis de lípidos, expansión del RE y plegamiento proteico (2,3). Entre estos genes diana encontramos XBP1, CHOP y chaperonas del RE (tales como GRP78/BiP), las cuales permiten que el RE pueda hacer frente a la alta demanda de plegamiento proteico. Curiosamente, ATF6 y XBP1 poseen una especificidad de unión a DNA muy similar y, además, ambos pueden heterodimerizar sugiriendo que podrían tener genes dianas en común.

## 1.2 Apoptosis

### 1.2.1 Introducción

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso ordenado de muerte de una célula ante estímulos extra o intracelulares. Las células apoptóticas muestran cambios morfológicos tales como: condensación y fragmentación de la cromatina, desestabilización de la membrana celular y formación de cuerpos apoptóticos (especie de contenedores formados por elementos deteriorados del citoplasma y del núcleo). La apoptosis apenas provoca respuesta inflamatoria porque: i) las células apoptóticas difícilmente liberan componentes en el tejido circundante intersticial; ii) las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas, previniendo necrosis secundaria y iii) las células que las fagocitan no producen citoquinas inflamatorias. Además, la expresión y activación de transglutaminasa tisular lleva a la rotura del DNA (que ocurre por la activación de DNAsas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) y al reconocimiento fagocítico que parece ser resultado tanto del movimiento de la fosfatidilserina (normalmente está en el interior de la membrana celular) como de la exposición de la Annexina I y la CRT hacia la capa externa de la membrana celular, representando señales para el reconocimiento de células apoptóticas.

## 1. INTRODUCCIÓN

En cambio, la alternativa a la muerte celular apoptótica, la necrosis es considerada como un proceso tóxico que sigue un modo de muerte celular con características morfológicas distintas tales como: hinchamiento celular, formación de vacuolas, RE distendido, mitocondria alterada, rotura de orgánulos celulares y, eventualmente, de la membrana celular. Cuando esto ocurre, el contenido citoplasmático es liberado en los tejidos circundantes, enviando señales quimiotácticas y contribuyendo esto último al reclutamiento de células inflamatorias (3,7).

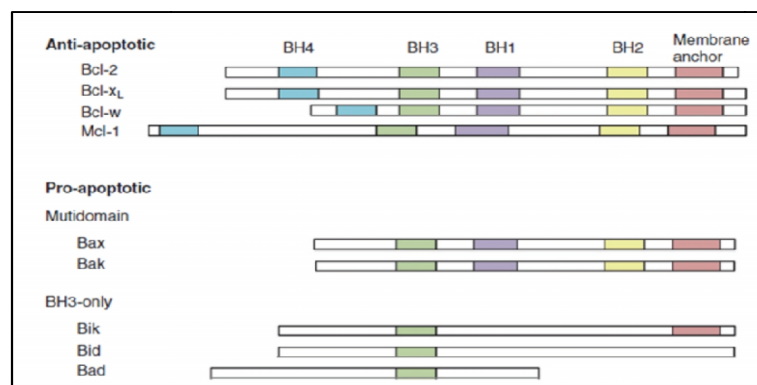


Figura 3. Miembros de la familia Bcl-2. Figura obtenida de (3).

### 1.2.2 Reguladores y ejecutores de la apoptosis

Hay muchas familias de genes responsables de mantener el delicado equilibrio entre la vida y la muerte dentro de la célula. La familia más grande de reguladores apoptóticos es la **familia Bcl-2**. Todos los miembros de la familia Bcl-2 comparten regiones con homología de secuencia, conocidas como dominios de homología Bcl-2 (BH de *Bcl-2 homology*), numeradas BH1-BH4; no obstante, no todos los miembros de la familia Bcl-2 contienen los cuatro dominios de homología (figura 3). El dominio BH3, hallado en todos los miembros de la familia, regula la homodimerización y la heterodimerización entre la familia de miembros antiapoptóticos y proapoptóticos como una manera de neutralizar la competición entre estas proteínas. Los miembros de la familia antiapoptótica típicamente contienen los cuatro dominios BH e incluyen Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, y Mcl-1. Estas proteínas residen principalmente en la mitocondria, aunque también pueden hacerlo en el citosol y el RE. Las proteínas proapoptóticas se dividen en dos grupos: Las moléculas efectoras Bcl-2 (Bax y Bak) que contienen los dominios BH1-BH3, y las proteínas *BH3-only* tales como Bik, Bad y Bid, las cuales directamente activan Bax

y Bak. La susceptibilidad de la célula a apoptosis es determinada fundamentalmente por el *ratio* entre miembros Bcl-2 antiapoptóticos y miembros proapoptóticos.

Las **caspasas** (proteasas específicas de aspartato dependientes de cisteína) son la principal familia de proteínas responsables de la ejecución de la apoptosis y dentro de las células existen como procaspasas inertes. Estos zimógenos contienen una estructura muy diversa en su dominio N-terminal que es requerido para la activación de la caspasa. La inducción de la apoptosis normalmente lleva a la activación de caspasas iniciadoras o de señalización (caspasas-2, -8, -9, -10 y -12) las cuales digieren sus sustratos diana a nivel de residuos de ácido aspártico de lo que deriva su nombre (cisteinil-aspartato proteasas). Estas caspasas pueden activarse ellas mismas de una manera autocatalítica o bien, activar otras caspasas, en lo que se conoce como cascada de caspasas. Eventualmente, la cascada lleva a la activación de caspasas efectoras o ejecutoras (caspasas-3, -6, y -7), resultando en la escisión de proteínas celulares esenciales, las cuales desencadenan cambios morfológicos típicamente observados en células sometidas a apoptosis.

La familia de **proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP)** representa otra familia importante de reguladores antiapoptóticos. Seis miembros de la familia han sido identificados: -NAIP, c-IAP1, c-IAP2, inhibidor de la apoptosis ligado a X (XIAP, *X-linked inhibitor of apoptosis*), survivina, y BRUCE-. Se cree que suprimen la apoptosis mediante la inhibición de las caspasas. Hay estudios que afirman que las IAP tienen la habilidad de unirse a caspasas-8 y 9 e inhibirlas, al igual, que al ejecutor caspasa-3 (3).

**p53** es una señal transcripcional que regula efectores *downstream* importantes para el paro de la proliferación celular, la reparación del DNA y la apoptosis. Después del daño en el DNA, p53 mantiene la célula en quiescencia hasta que el daño es reparado. Si el daño es irreversible entonces se desencadena la apoptosis.

**NF- $\kappa$ B** es un factor transcripcional que regula la expresión de un gran número de genes involucrados en la regulación de la apoptosis y la inflamación. En su forma inactiva está unido a las proteínas inhibitorias I $\kappa$ B pero una vez activado puede presentar tanto funciones proapoptóticas como antiapoptóticas: fisiológicamente induce resistencia a apoptosis mediante la activación de IAP y XIAP. No obstante, algunos estímulos que

## 1. INTRODUCCIÓN

activan NF- $\kappa$ B podrían inducir apoptosis probablemente mediante la activación de proteínas proapoptóticas tales como c-myc, p53 y caspasa-1.

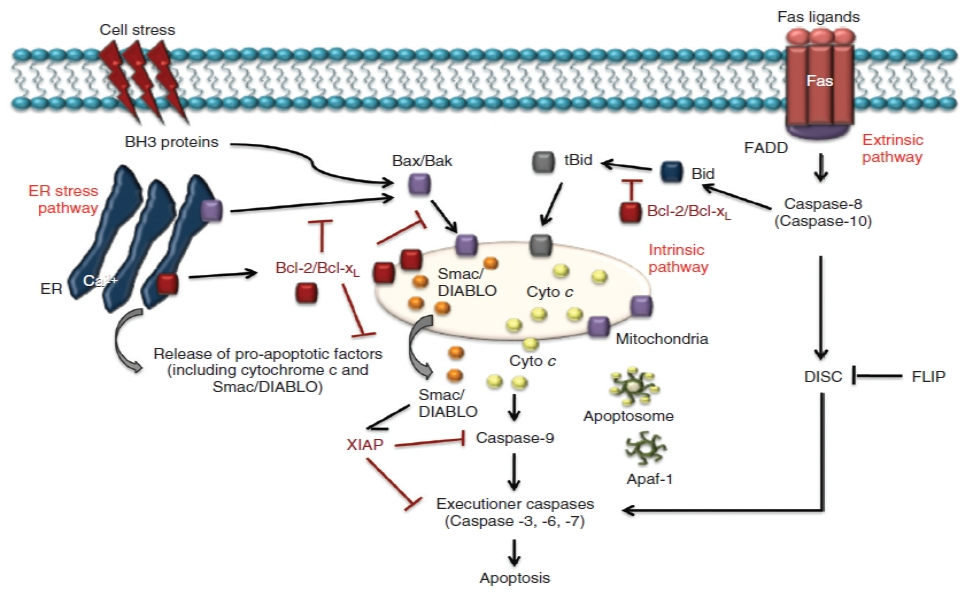
El **sistema ubiquitina-proteosoma** está constituido por un gran complejo de proteasas, responsable del recambio de la mayoría de proteínas celulares y, en consecuencia, regula el crecimiento celular y la apoptosis. En la regulación de proteínas en el sistema ubiquitina-proteosoma hay dos etapas secuenciales (figura 1e): el reconocimiento de proteínas mediante múltiples moléculas de ubiquitina y la posterior digestión de éstas mediante el proteosoma 26S. Muchos reguladores del ciclo celular y factores de transcripción son regulados por este sistema.

**PI3K** (fosfoinositol 3-quinasa) es una quinasa que participa en vías de señalización importantes para la supervivencia celular, la proliferación, la motilidad y la neovascularización, hallándose ésta aumentada en muchos cánceres. PI3K activa la proteína quinasa B (Akt/PKB), la cual a su vez está involucrada en la activación de proteínas que promueven la supervivencia celular, concretamente de NF- $\kappa$ B. La fosforilación de Bad o caspasa por Akt también bloquea la apoptosis.

Por último, una de las características de la apoptosis es la escisión cromosomal del DNA en unidades nucleosomales. Las caspasas juegan un papel muy importante en este proceso mediante la activación de DNasas (CAD, *caspase activated DNase*), inhibiendo enzimas de reparación del DNA (poly (ADP-ribosa) polimerasa (PARP por caspasa-3) y rompiendo proteínas estructurales (por ejemplo, laminas por caspasa-6) en el núcleo (7).

### 1.2.3 Vías apoptóticas

La cascada apoptótica puede ser iniciada por: la vía intrínseca (o mitocondrial), la vía extrínseca (o del receptor de muerte) y la vía de estrés de RE. Aunque las tres vías son distintas, en todas ellas hay solapamiento mitocondrial y, por último, convergen en la vía de ejecución, en la cual se activan las caspasas efectoras y resulta en destrucción física de la célula (3) (figura 4).



## 1. INTRODUCCIÓN

muerte de FasL y el dominio efector de muerte de FADD. A continuación, los zimógenos Caspasa-8 o 10 son reclutados para formar DISC (*Death-inducing signaling complex*). La formación de DISC provoca que las caspasas se agrupen, resultando en la activación catalítica posterior inducida por proximidad. Una vez se activa la caspasa-8, también se activa directamente la caspasa-3 (proteína efectora) para iniciar la degradación de la célula. La caspasa-8 también puede escindir Bid (proapoptótico) a tBid, el cual actúa como señal en la membrana de la mitocondria para facilitar la liberación de citocromo c en la vía intrínseca representando una interacción entre las dos vías, amplificando la señal apoptótica de los receptores de muerte.

### 1.2.3.2 Vía intrínseca o mitocondrial

La vía intrínseca se inicia en la mitocondria y es desencadenada por varios estímulos no mediados por receptor (a diferencia de la vía extrínseca), los cuales producen señales dentro de la célula que actúan directamente sobre dianas intracelulares (figura 4). Los estímulos de esta vía producen señales intracelulares que pueden actuar de manera positiva o negativa. Los estímulos negativos son, por ejemplo, la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, los cuales normalmente suprimen la apoptosis. En cambio, los estímulos positivos pueden ser: la radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, radicales libres (ROS) u otros. Estos estímulos pueden provocar cambios en la membrana mitocondrial interna resultando en la obertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT, *Mitochondrial permeability transition pore*), pérdida de potencial de membrana y liberación de moléculas proapoptóticas hacia el citosol. Tras la señal de estrés, las proteínas proapoptóticas en el citoplasma, Bax y Bid, se unen a la membrana externa de la mitocondria para señalar la liberación del contenido interno. No obstante, las señales de Bax y Bid no son suficientes como para desencadenar una liberación total. Otra proteína proapoptótica llamada Bak, que reside dentro de la mitocondria, es necesaria también para promover totalmente la liberación de citocromo c y todo el contenido intermembrana de la mitocondria. Después de la liberación en el citoplasma, el citocromo c forma un complejo en el citoplasma con ATP y el Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*). A la vez, la procaspasa 9 se une a Apaf-1 resultando en su autoactivación catalítica. El complejo formado por el citocromo c, Apaf-1 y Caspasa-9 recibe el nombre de apoptosoma.

Además del citocromo *c*, el espacio intermembranoso contiene las proteínas Smac/DIABLO y las serin-proteasas HtrA2/Omi, las cuales promueven la apoptosis inhibiendo la actividad IAP (7).

### 1.2.3.3 Vía de estrés de RE

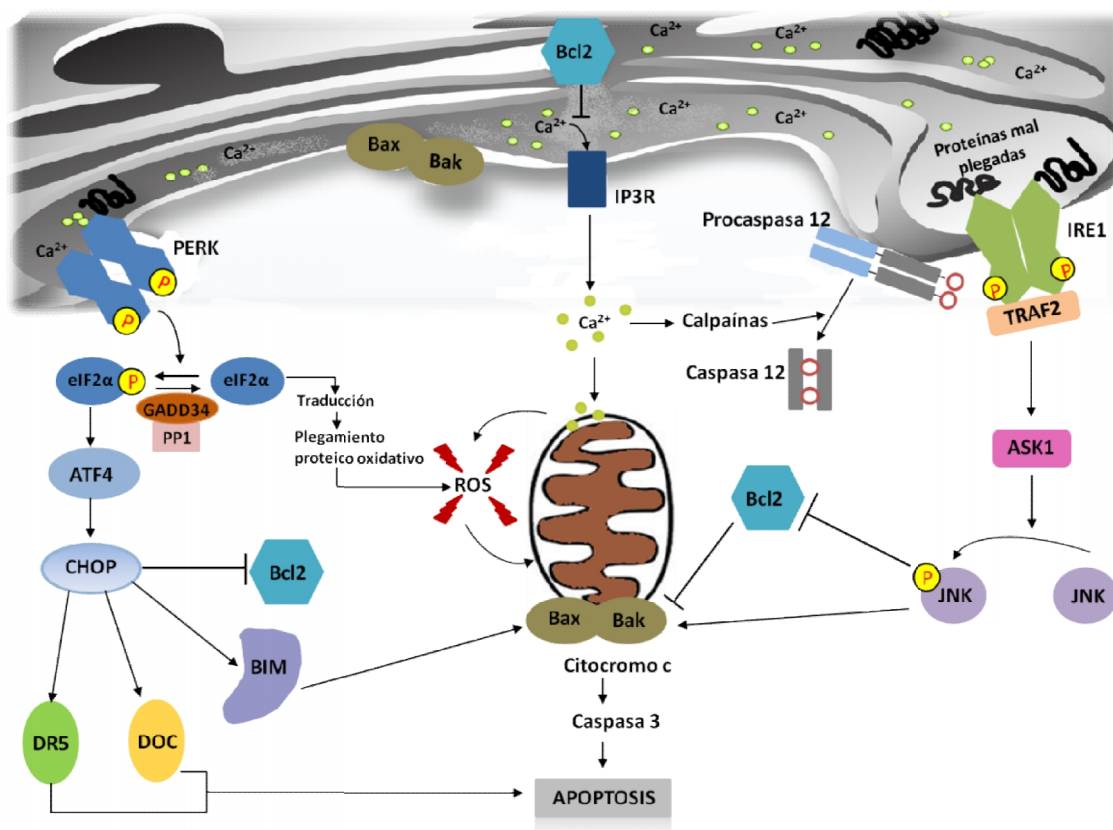
Un estrés de RE prolongado lleva a apoptosis (figura 4). Para resolver el estrés de RE, una UPR sostenida consume mucha energía en retrotranslocar proteínas mal plegadas retenidas en el RE al citoplasma mediante el sistema ERAD. Por tanto, el agotamiento energético de la célula puede contribuir al programa de la muerte celular programada.

Hay varios mediadores de apoptosis implicados en la muerte celular asociada a estrés de RE. Algunos de estos mediadores son activados por sensores de la UPR mientras que otros están relacionados con el calcio y la homeostasis redox (figura 5). Existen varias vías de señalización de apoptosis activadas por estrés de RE: vía IRE1 $\alpha$ , vía CHOP y vía de liberación de Ca<sup>2+</sup>.

#### 1.2.3.3.1 Vía IRE1 $\alpha$

Durante el estrés de RE, el IRE1 activado interacciona con JIK (*c-Jun-N-terminal inhibitory kinase*) el cual recluta el adaptador citosólico TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) en la membrana del RE. TRAF2 activa a ASK1 (*apoptosis-signaling kinase 1*) que conduce a la activación de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) y a la activación de caspasas dependiente de mitocondria/Apaf-1 (figura 4). Tras la activación de la caspasa-12, se activa la caspasa-9 y, ésta posteriormente activa la caspasa-3. Además, JNK tiene otros efectos proapoptóticos, incluyendo la activación inducida por fosforilación de la proteína proapoptótica Bim y la inactivación de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (figura 5).

## 1. INTRODUCCIÓN



**Figura 5. Apoptosis inducida por estrés de RE.** El estrés de RE sostenido está asociado con apoptosis. Las células que están muriendo en situación de estrés de RE demuestran evidencias de tener una UPR continua, o bien, sin resolver. Algunas de las vías que pueden llevar a la apoptosis inducida por estrés de RE están descritas en esta figura. Figura obtenida de (4).

También se ha descrito que las proteínas Bak y Bax (miembros de la familia Bcl-2 proapoptótica) se asocian con IRE1 $\alpha$  en la membrana del RE y potencian su actividad RNasa.

Por otro lado, BI-1 (Bax inhibitor 1) es una proteína de la membrana del RE que inhibe la apoptosis y, también, es un regulador negativo de la activación de IRE1 $\alpha$ . De hecho, en ratones deficientes en BI-1 se ha observado una mayor sensibilidad a la apoptosis inducida por estrés de RE, sugiriendo un papel proapoptótico para IRE1 $\alpha$ .

En cambio, pese a las respuestas proapoptóticas desencadenadas vía IRE1 mencionadas anteriormente, en células con estrés de RE, el splicing de XBP1 y la expresión de proteínas disminuyen con el tiempo y, este declive se correlaciona con un aumento de muerte celular. De hecho, se ha descrito que la reconstitución de la actividad de IRE1 $\alpha$  mejora la supervivencia celular.

### 1.2.3.3.2 Vía de CHOP

La vía proapoptótica mejor caracterizada es la mediada por el factor de transcripción CHOP. Aunque tanto las vías de IRE1-XBP1 y ATF6 pueden aumentar la inducción de CHOP, la vía PERK-eIF2 $\alpha$  predomina a través del aumento selectivo de la traducción de ATF4, factor de transcripción que posteriormente activa la transcripción de CHOP (mencionado anteriormente).

CHOP está ligado a la maquinaria de la apoptosis de varias maneras (figura 5). Por un lado, CHOP aumenta transcripcionalmente la expresión de GADD34, hecho que implica la posterior desfosforilación de eIF2 $\alpha$  y la reanudación de la traducción proteica. Bajo condiciones en que el estrés de RE no se ha resuelto completamente, las proteínas entran en el RE para experimentar un plegamiento proteico oxidativo con la consiguiente generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), hecho que tiene consecuencias perjudiciales para la célula.

También se han propuesto un número de genes diana de CHOP que llevan a apoptosis. CHOP puede aumentar transcripcionalmente la expresión del receptor de muerte, receptor TRAIL 2 (también conocido como receptor de muerte 5, DR5) en líneas celulares humanas transformadas. Además, CHOP también puede inducir transcripcionalmente la expresión de las proteínas proapoptóticas Bim y TRB3. Otros genes inducidos por estrés de RE llamados DOC (*downstream of CHOP*) son inducidos por heterodímeros CHOP-C/EBP $\beta$ . Uno de estos es la anhidrasa carbónica IV que podría contribuir a la acidificación del citoplasma, la cual es una característica asociada a la apoptosis. Es importante recalcar que la sobreexpresión de CHOP no resulta en apoptosis; en cambio, sí que sensibiliza las células a la apoptosis. De hecho, se ha asociado el aumento de la sensibilidad a muerte celular en células que sobreexpresaron CHOP con: la disminución celular de los niveles de glutatión, la generación de ROS y la caída en la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>. Por último, en macrófagos, CHOP media apoptosis a través del aumento de la expresión de la oxidasa 1 $\alpha$  del RE (ERO1 $\alpha$ ) que conduce a la liberación de Ca<sup>2+</sup> del RE (4).

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.2.3.3.3 Vía de liberación de $\text{Ca}^{2+}$ del RE

La apoptosis inducida en el RE también puede proceder de la liberación sostenida de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (figura 5). Hay dos transportadores que regulan la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del RE: la bomba ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático/sarcoplásmico (SERCA) que importa  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol al RE y el receptor inositol trifosfato (IP3R, *inositol triphosphate receptor*) que regula el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE al citosol y a la mitocondria.

Los agentes inductores de estrés de RE, en ciertas líneas celulares, llevan a: la liberación sostenida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE, la acumulación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  seguida por la permeabilización mitocondrial y la liberación de efectores apoptóticos desde la mitocondria hasta el citosol. Tanto la proteína antiapoptótica Bcl-2 como las proteínas proapoptóticas Bak y Bax, halladas todas ellas en la membrana del RE, controlan el  $\text{Ca}^{2+}$  del RE. Concretamente, los hepatocitos requieren la permeabilización mitocondrial con el objetivo de activar las caspasas terminales y ejecución de la apoptosis, un proceso mediado por Bax y Bak. Además, se ha observado que las membranas de la mitocondria y del RE se asocian mediante distintas uniones celulares. Estas uniones facilitan la transferencia de calcio y fosfolípidos y podrían también estar involucradas en apoptosis. No obstante, como en otros sistemas, las vías exactas de señalización que median la apoptosis inducida en hepatocitos “estresados” no están bien definidas.

Los flujos de calcio intracelular también están involucrados en la producción de ROS. El plegamiento proteico del RE puede llevar a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular desde la vía de los canales del IP3R del RE que conduce a la captación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual a su vez promueve la producción de ROS y apoptosis mediante múltiples efectos en la mitocondria.

El estrés oxidativo inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  puede inducir tanto muerte celular como activar señalización de NF- $\kappa$ B (respuesta por sobrecarga en el RE), contribuyendo a la inflamación. De hecho, se ha observado que los quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  y los antioxidantes bloquean la activación de NF- $\kappa$ B.

Además, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol también activa las calpainas, las cuales digieren proteolíticamente la caspasa 12 activándola (4,5).

## **1.3 Estrés de RE y enfermedades hepáticas**

### **1.3.1 El estrés de RE en enfermedades hepáticas**

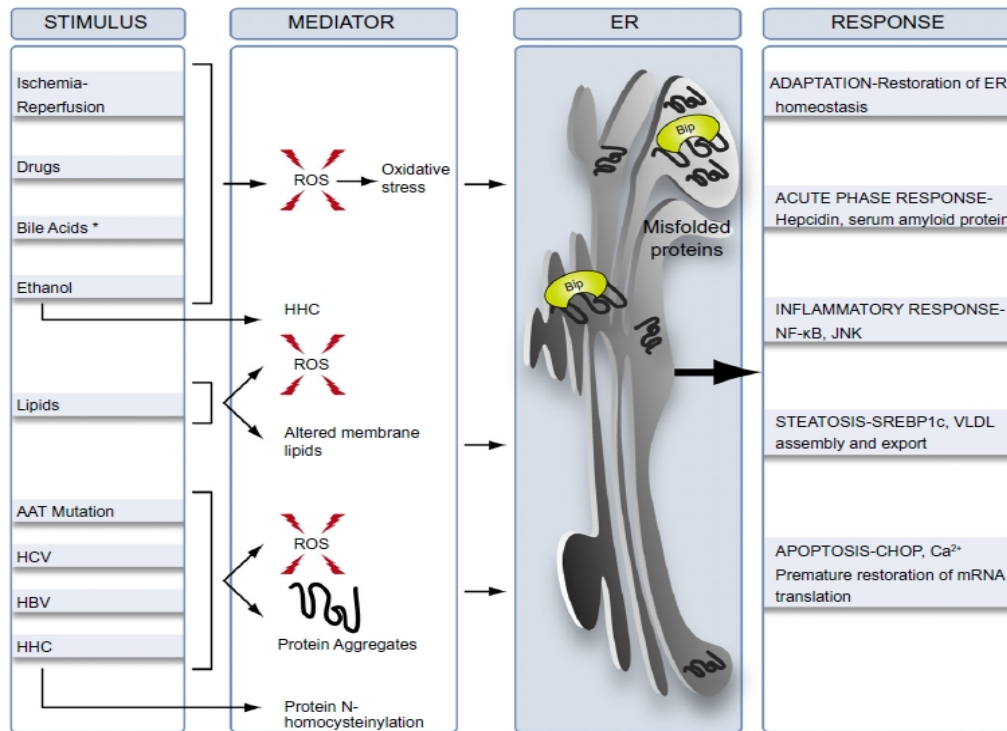
El estrés de RE ha sido observado en diversas enfermedades hepáticas (figura 6). Existen estímulos que dañan el hígado y pueden activar múltiples mecanismos de estrés intracelular, tales como: la generación de ROS, la alteración de la composición lipídica de la membrana, la hiperhomocistinemia (HHC) o la formación de agregados proteicos. En los hepatocitos, la disfunción del RE da lugar a diferentes respuestas posibles: adaptación, respuesta de fase aguda, respuesta inflamatoria, esteatosis y apoptosis.

La UPR tiene un papel muy destacado en el metabolismo lipídico hepático. La activación de la UPR ha sido observada en enfermedades de hígado graso, sugiriendo la inducción de estrés de RE en estas condiciones patológicas, hecho que se tratará a fondo en esta sección.

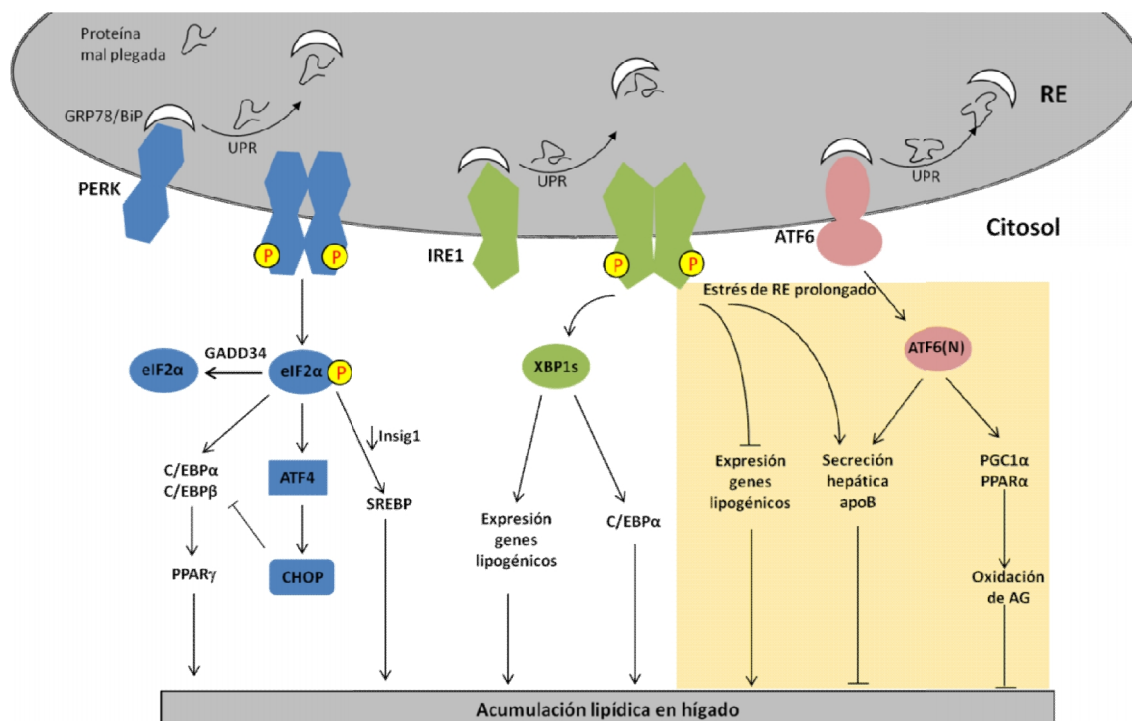
Otras enfermedades asociadas a la activación del estrés de RE incluyen: Enfermedad relacionada con alteraciones en la conformación de las proteínas, Colestasis, Hepatitis viral crónica, HHC, Daño hepático inducido por alcohol, Isquemia-reperfusión hepática (IR), Toxinas agudas y Carcinoma hepatocelular.

### **1.3.2 Hígado graso no alcohólico (NAFLD)**

El hígado graso, también conocido como esteatosis hepática, es una enfermedad caracterizada por la acumulación de triglicéridos (TG) en el citoplasma de los hepatocitos. Cuando esta patología no es debida a un consumo crónico de alcohol recibe el nombre de hígado graso no alcohólico (NAFLD) (8,9). En algunos individuos, el NAFLD progresa hasta esteatohepatitis no alcohólica (NASH) caracterizada por esteatosis, inflamación, apoptosis y fibrosis (9). Algunas de las personas afectadas con NASH pueden llegar a desarrollar cirrosis e incluso, carcinoma hepatocelular.



componentes de la red de señalización de la UPR juegan un papel en la regulación del metabolismo lipídico. La figura 7 resume las interacciones entre varios componentes de la señalización de la UPR y el metabolismo lipídico.



**Figura 7. Intersección entre vías de señalización de la UPR y lipogénesis.** La fosforilación de eIF2α y la activación de la vía de PERK, en condiciones de estrés de RE inducido con dieta alta en grasas, permite potenciar la lipogénesis mediante la inducción de C/EBPα y disminuyendo la traducción de la proteína Insig1, hecho que aumenta la activación de SREBP. Sin embargo, bajo condiciones severas o prolongadas de estrés de RE, la expresión de CHOP puede llevar a la desregulación de la actividad C/EBPα. De manera similar, en condiciones de estrés de RE inducido por dieta alta en carbohidratos se produce una inducción de la expresión de genes lipogénicos y C/EBPα, los cuales promueven la lipogénesis. No obstante, en condiciones severas de estrés de RE, el tratamiento con tunicamicina desencadena la inhibición mediada por XBP1s de la expresión de genes que codifican enzimas que promueven la lipogénesis. Además, tanto XBP1 como ATF6 son importantes para la secreción de apolipoproteína B de los hepatocitos y para la activación de vías de oxidación de ácidos grasos (PPARα, PGC1α) bajo tales condiciones. Estas vías culminan en la atenuación de la lipogénesis y en la prevención de NAFLD en condiciones severas de estrés de RE. Figura obtenida de (1).

A continuación se detalla la asociación entre la señalización del estrés de RE y el NAFLD, la cual ha sido comprobada mediante la modulación genética de: la vía PERK/eIF2α, la vía IRE1α/XBP1, la vía ATF6, el proceso de plegamiento proteico del RE y la vía de secreción de proteínas del RE.

### 1.3.2.1.1 Vía PERK

Se suele evaluar el estado de fosforilación de eIF2α, una diana *downstream* de PERK, para monitorizar la actividad de PERK (figura 7).

## 1. INTRODUCCIÓN

Para investigar la función de la rama de la UPR PERK/eIF2 $\alpha$  en el hígado, Oyadomari *et al.* generaron ratones transgénicos que sobreexpresaran el fragmento C-terminal de la proteína GADD34 en el hígado y Rutkowski *et al.* emplearon ratones con la mutación S51A en eIF2 $\alpha$ . En ambos modelos murinos, los animales fueron incapaces de fosforilar eIF2 $\alpha$  y mostraron una supresión de la expresión de proteína C/EBP $\alpha$  hepática (factor de transcripción involucrado en la glucogénesis hepática y la homeóstasis de lípidos). Bajo estrés dietético con dieta alta en grasas, los ratones de Oyadomari *et al.* exhibieron una disminución de la expresión de PPAR $\gamma$  y sus genes diana lipogénicos (tales como FASN, ACC2 y SCD1), una reducida esteatosis hepática (11) y una mayor sensibilidad a la insulina que los ratones de fenotipo salvaje. En cambio, después de tratamiento con tunicamicina (agente inductor de estrés de RE que inhibe la N-glicosilación de las proteínas), los ratones transgénicos de Rutkowski *et al.* desarrollaron hígado graso. Por tanto, mientras que el aumento de la desfosforilación de eIF2 $\alpha$  protege de la esteatosis inducida por un estrés dietético crónico y adaptativo (Oyadomari *et al.*), la fosforilación de eIF2 $\alpha$  es claramente necesaria para prevenir la acumulación lipídica en respuesta a un estímulo de estrés de RE directo y agudo como la tunicamicina (Tm) (Rutkowski *et al.*). Estas diferencias apuntan a que la fuente y severidad del estrés de RE son factores importantes en la regulación del metabolismo lipídico y que, en definitiva, la señalización PERK/eIF2 $\alpha$  contribuye a que la lipogénesis hepática sea óptima (1).

### 1.3.2.1.2 Vía IRE1 $\alpha$ /XBP1

Se ha observado que ratones con supresión de IRE1 $\alpha$  en hígado (Ire1 $\alpha^{\text{Hep}^{\text{fe}}/-}$ ) muestran un fenotipo normal en ausencia de inducción de UPR. No obstante, el tratamiento con Tm provoca que estos animales muestren una mala adaptación al estrés de RE y un metabolismo lipídico alterado. En estos ratones aumentó la expresión de algunos factores de transcripción como ATF4, ATF3 y CHOP y, de la forma procesada de la caspasa-3 en comparación con los ratones control. Además, los hígados de los animales Ire1 $\alpha^{\text{Hep}^{\text{fe}}/-}$  también exhibieron una mayor esteatosis hepática y una disminución de los lípidos plasmáticos debido a la supresión la secreción de lipoproteínas que contienen ApoB. Por tanto, IRE1 $\alpha$  (figura 7) tiene un papel

importante en la prevención de la esteatosis hepática, particularmente en condiciones severas de estrés de RE.

XBP1 es un factor de transcripción *downstream* de la activación de IRE1 $\alpha$  necesario para la síntesis lipídica *de novo* en el hígado. Se ha observado hipolipidemia y expresión reducida de genes codificantes para enzimas lipogénicos como DGAT2, SCD1 y ACC2 en ratones KO (*knockout*) para XBP1. Los hígados de estos ratones muestran una menor síntesis de lípidos y secreción de TG (en este caso, la tasa de recambio de proteína ApoB no está afectada) que en animales de fenotipo salvaje (1).

Por otro lado, en ratones ob/ob (deficientes en leptina) se ha observado una pérdida de la heterodimerización entre subunidades reguladoras de PI3K y XBP1s, la cual facilita la translocación nuclear de XBP1s. Esto impide que XBP1s pueda inducir la expresión de chaperonas y que, por tanto, se resuelva el estrés de RE en hígado. Además, en ratones deficientes en la subunidad reguladora p85 de PI3K (mutación específica en hígado) mostraron una disminución de la activación de IRE1 $\alpha$  y ATF6 (4).

#### 1.3.2.1.3 Vía ATF6

ATF6 interacciona con la forma nuclear de SREBP2 (factor de transcripción responsable de regulación de las vías biosintéticas de colesterol), antagonizando la transcripción de genes lipogénicos regulados por SREBP2 y la acumulación lipídica en cultivos celulares de hígado y riñón.

Por otro lado, también se ha observado que ratones KO para ATF6 son fenotípicamente normales en condiciones fisiológicas. No obstante, después de haber sido tratados con Tm, estos animales KO mostraron signos de disfunción hepática (niveles alterados de alanina aminotransferasa (ALT), contenido proteico y niveles de albúmina). Además, tras la inyección intraperitoneal con Tm los hígados de estos animales presentaron una expresión reducida de chaperonas del RE y un aumento del número de células apoptóticas, sugiriendo que ATF6 protege a los hepatocitos del daño inducido por estrés de RE y apoptosis.

El resultado fenotípico de la inducción de estrés de RE con Tm en ratones KO para ATF6 fue una NAFLD causada por acumulación lípidos neutros en el hígado como TG y

## 1. INTRODUCCIÓN

colesterol debido a una reducción de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (AG) y atenuación de la formación de VLDL (figura 7). Específicamente, se produjo una expresión sostenida de CHOP y una disminución de la expresión de PPAR $\alpha$  y niveles proteicos de apoB-100 en comparación con ratones de fenotipo salvaje. Además, la acumulación de lípidos en el hígado no fue debida a un aumento de la lipogénesis *de novo* ya que la expresión de genes lipogénicos fue suprimida en los hígados de ratones KO para ATF6 tratados con Tm. Globalmente, estos hallazgos sugieren que la pérdida de ATF6 predispone a el NAFLD inducida por estrés.

### 1.3.2.1.4 Proceso de plegamiento proteico del RE

La sobreexpresión de GRP78/BiP en ratones ob/ob lleva a la mejora del estrés de RE en el hígado, asociado a una inhibición de la activación de SREBP1c (factor de transcripción que induce la expresión de genes lipogénicos), mejorando la sensibilidad a la insulina y reduciendo la esteatosis hepática (12). También, se ha postulado que la heterocigosidad de GRP78/BiP desencadena una UPR adaptativa caracterizada por la sobreexpresión de otras chaperonas del RE (por ejemplo, GRP94) y componentes del sistema ERAD (9).

Por otro lado, se ha observado que animales KO para p58<sup>IPK</sup> (cochaperona de GRP78/BiP) son más sensibles a estrés de RE que sus homólogos de fenotipo salvaje, probablemente debido al papel de p58<sup>IPK</sup> en la potenciación del plegamiento proteico dependiente de GRP78/BiP. Tras la administración de Tm, estos animales transgénicos mostraron esteatosis hepática, supresión de la expresión de C/EBP $\alpha$  y una expresión persistente de CHOP (13).

Por tanto, la mejora del plegamiento proteico contribuye a una disminución del estrés de RE y a una mejora del NAFLD.

### 1.3.2.1.5 Vía de secreción de proteínas del RE

En ratón, la mutación de la proteína Sec61alfa1, la cual es importante en la vía secretora del RE, provoca defectos en el hígado y en células  $\beta$ -pancreáticas. Estos ratones desarrollan esteatosis hepática, daño progresivo con fibrosis en el hígado y, una eventual cirrosis tras tratar estos animales con una dieta alta en grasas.

BI-1 es una proteína de la membrana del RE que inhibe la apoptosis. En modelos de NAFLD, BI-1 está reducida. A nivel experimental, la sobreexpresión de BI-1 en ratones ob/ob aumenta la sensibilidad a la insulina mediante la inhibición de la gluconeogénesis pero disminuye la actividad de IRE1 $\alpha$  (suprimiendo la activación de genes involucrados en la secreción proteica) y aumenta NAFLD, además de disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos en el suero.

Por tanto, la obesidad genética está asociada a un deterioro de la UPR y a un persistente estrés de RE en el hígado. Además, un deterioro en cualquier rama de la UPR en el contexto de un “challenge” metabólico con dieta alta en grasas empeora la esteatosis hepática y el daño hepático.

### **1.3.2.2 La UPR y la progresión de la enfermedad en NAFLD**

Tanto la apoptosis como la inflamación son factores clave en la progresión de NAFLD a NASH y, ambas están también relacionadas con la UPR.

El mecanismo exacto por el que los ácidos grasos libres (AGL) inducen apoptosis en hepatocitos esteatóticos no está claro. Se sabe que los ácidos grasos (AG) de cadena larga pueden activar la UPR de varios tipos celulares, incluyendo los hepatocitos. De hecho, el ácido palmítico induce la expresión de CHOP en líneas celulares de hepatocito, y las células deficientes en la expresión de CHOP están protegidas de la apoptosis inducida por palmitato. Por otro lado, hay AGs que podrían ser importantes en su capacidad para inducir la UPR (AG saturados) o mitigarla (AG insaturados). Por ejemplo, existen ratones incapaces de sintetizar AG monoinsaturados debido a la supresión de la esteroil CoA desaturasa-1 (SCD1), enzima que convierte los AG saturados en monoinsaturados. Estos ratones exhiben una activación de la UPR en sus hígados debido a una deficiencia en AG monoinsaturados. Los pacientes con NAFLD y NASH tienen tendencia a tener niveles elevados de ácido palmítico y oleico con una disminución concomitante de AG poliinsaturados. El colesterol libre en el hígado suele aumentar progresivamente en pacientes con NAFLD y NASH y, en cambio, la concentración de ésteres de colesterol se mantiene invariable.

## 1. INTRODUCCIÓN

Por otro lado, CD154, un mediador inflamatorio derivado de las plaquetas, promueve el splicing XBP1, presumiblemente potenciando la adaptación a estrés de RE, y reduciendo la muerte celular tras un estímulo con ácido oleico *in vitro*. Además, tras la exposición a una dieta rica en aceite de oliva, ratones deficientes en CD154 mostraron una disminución de la secreción de VLDL y un aumento de la esteatosis hepática. Esto sugiere la posibilidad de que un mediador de inflamación pueda promover la adaptación a estrés de RE, de este modo, aboliendo el NAFLD (4).

### 1.3.2.3 Activación de la UPR en obesidad humana y NAFLD

La activación de la UPR ha sido observada en el tejido hepático y adiposo de modelos animales genéticos y dietéticos de obesidad, muchos de los cuales incluyen características del NAFLD. En cambio, actualmente sólo hay un estudio que haya comparado los marcadores de la activación de la UPR en humanos con o sin NAFLD. En este estudio, las muestras hepáticas fueron extraídas de personas con SM y con histología de hígado normal (controles, n = 17), de personas con SM y NAFLD (NAFLD, n = 21) y de personas con SM y NASH (NASH, n = 21). Los hígados con NAFLD y NASH fueron caracterizados por un aumento de la forma fosforilada de eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ -P); en cambio, otros marcadores de la activación de la UPR no aumentaron (por ejemplo: mRNA de ATF4, CHOP, GADD34, EDEM (lectina del RE)). Los hígados de los sujetos con NASH fueron caracterizados adicionalmente mediante una reducción en la cantidad de mRNA de XBP1 procesado (XBP1s).

Otro estudio examinó tanto el hígado como el tejido adiposo de sujetos con obesidad mórbida antes y un año después de la cirugía de *bypass* gástrico. Los sujetos perdieron aproximadamente un 40 % de su masa corporal al año de seguimiento y se observaron reducciones significativas en tejido adiposo de: expresión génica de GRP78/BiP, splicing de XBP1, eIF2 $\alpha$ -P y de la fosforilación de JNK. Las muestras de hígado fueron caracterizadas por una reducción en la tinción inmunohistoquímica de GRP78/BiP y eIF2 $\alpha$ -P.

Un reciente estudio analizó un conjunto de genes hepáticos en pacientes con obesidad mórbida con NAFLD y sin NAFLD. Hubo tres genes relacionados con la vía de la fibrosis (COL1A1, IL10 y IGFBP3) que se sobreexpresaron y un gen asociado con la UPR (HSPA5,

también conocido como GRP78/BIP) se reprimió en pacientes con NAFLD en comparación con pacientes sin NAFLD (9).

Estos hallazgos junto con los datos obtenidos en experimentos en roedores indican la presencia de estrés de RE en tejidos de animales obesos. Por tanto, combatir el estrés de RE puede representar una nueva estrategia terapéutica contra la obesidad y, en consecuencia también del NAFLD y sus complicaciones metabólicas (1).

## 1.4 Los polifenoles y la salud

### 1.4.1 Los polifenoles

Los polifenoles o compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas involucrados en diferentes procesos tales como: crecimiento, lignificación, pigmentación, polinización y, resistencia contra patógenos y depredadores. Por tanto, los polifenoles son constituyentes normales en alimentos de origen vegetal y, de hecho, existen más de 8000 compuestos de este tipo diferentes en la dieta humana.

Desde un punto de vista químico, los compuestos fenólicos o polifenoles son compuestos que poseen uno o más anillos aromáticos unidos a grupos hidroxilo. Se clasifican en diferentes grupos en función de los anillos fenol que contengan y de los elementos estructurales que conecten estos anillos. Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados principalmente en dos grupos: en compuestos fenólicos flavonoides y no flavonoides.

#### 1.4.1.1 Flavonoides

Los flavonoides son polifenoles compuestos por 15 carbonos, con 2 anillos aromáticos conectados por un puente de 3 carbonos. En función de las modificaciones en el anillo central C (heterociclo), estos se pueden dividir en diferentes clases estructurales: flavonoles, flavonas, flavan-3-oles (o flavanales), flavanonas, isoflavonas y antocianidinas (figura 8).

## 1. INTRODUCCIÓN

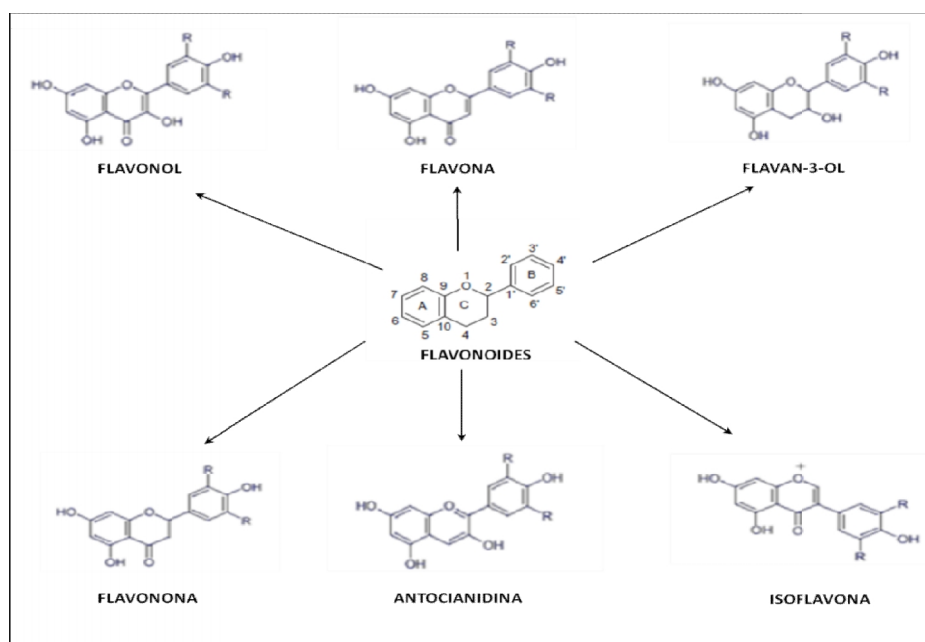


Figura 8. Flavonoides comunes en la dieta. Figura obtenida de (14).

Los **flavonoles** son los flavonoides más extendidos en alimentos de origen vegetal y varían en color desde el blanco hasta el amarillo. La estructura de los flavonoles contiene una hidroxilación en la posición 3 del anillo C y está estrechamente relacionada con la de las flavonas. Normalmente, los encontramos en forma de conjugados glicosilados en las plantas. Estos flavonoides están representados principalmente por: quercetina (QRC), kaempferol, y miricetina, mientras que el derivado metilado de la isoramnetina es también bastante común. La QRC es el flavonol más extendido en la dieta y está presente en frutas y verduras, especialmente en cebolla. En general, las mayores concentraciones de flavonoles las encontramos en plantas medicinales, fresas, espinacas y coliflor.

A diferencia de los flavonoles, las **flavonas** no están tan ampliamente distribuidas en la dieta y tampoco tienen hidroxilación en la posición 3 del anillo C. Las flavonas están representadas en la dieta por la apigenina y la luteolina. Se pueden hallar conjugados de flavonas en apio, perejil, alcachofa y té de Roiboos. Como consecuencia, su ingesta diaria es muy baja. Recientemente se ha observado que las metoxiflavonas, que están presentes en cítricos, presentan una biodisponibilidad más alta que las flavonas no metiladas.

Los **flavan-3-oles** o **flavanales** representan el grupo de flavonoides más común consumido en la dieta occidental. Los flavan-3-oles están considerados como ingredientes funcionales en varias bebidas, alimentos, hierbas medicinales y suplementos. Su presencia en los alimentos afecta a diferentes parámetros de calidad tales como: la astringencia, la amargura, la acidez, el dulzor y el aroma. Los flavan-3-oles son estructuralmente la subclase más compleja de flavonoides abarcando desde los simples monómeros (+)-catequina y su isómero (-)-epicatequina a las proantocianidinas oligoméricas y poliméricas, las cuales son también conocidas con el nombre de taninos condensados. El tipo más común de proantocianidinas en plantas son las procianidinas, las cuales están formadas exclusivamente por unidades de (epi)catequina. En cambio, las proantocianidinas menos comunes son la propelargonina y la prodelfinina, formadas respectivamente por subunidades de (epi)afzelequina y (epi)galocatequina.

Los flavan-3-oles se encuentran de forma abundante en: frutas (albaricoques, cerezas, uva, moras), frutos secos, chocolate, especias, hierbas medicinales, cebada y cerveza. En concreto, las pepitas de la uva contienen cantidades sustanciales de (+)-catequina, (-)-epicatequina, y de oligómeros y polímeros de procianidinas.

Los flavan-3-oles pueden esterificarse con ácido gálico para formar galatos de catequina e hidroxilarse para formar galocatequinas. Las galocatequinas como la (-)-epigalocatequina, (-)-epigalocatequin galato (EGCG) y (-)-epicatequin galato son abundantes en infusiones de té verde. Durante la fermentación para formar té negro, estos compuestos polimerizan, dando lugar a teaflavinas y a tearubiginas de alto peso molecular.

Las **flavanonas** tiene dos características estructurales: la ausencia del doble enlace  $\Delta^{2,3}$  y presencia de un centro quiral en el carbono 2. En la mayoría de flavanonas, el anillo C está unido al B en la configuración  $\alpha$ . La estructura de la flavanona es muy reactiva y lleva a cabo de reacciones de hidroxilación, glicosilación y *O*-metilación. En la dieta, las formas más comunes de flavanonas son: la naringenina, el eriodictiol y hesperetina. Se pueden hallar flavanonas en: el zumo de pomelo, el zumo de naranja, cítricos, tomates, kiwis, plátanos y té de roiboos.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las **antocianidinas/antocianinas** son pigmentos vegetales solubles en agua y son responsables de los colores rojizos, azulados y violáceos de las frutas y flores que los contienen. Al parecer, las antocianidinas tienen una función fotoprotectora en las plantas. Este tipo de flavonoides se encuentran en los alimentos en forma de glicósidos y no en forma aglicona (forma del polifenol no glicosilada). Normalmente, el residuo de azúcar está unido a la posición 3 del anillo C o a la posición 5 del anillo A y, a diferencia de otros grupos de flavonoides, las antocianidinas tienen carga positiva en su estructura a pH ácido. Sólo 6 de las 17 antocianidinas que hay en la naturaleza se hallan en la dieta: la cianidina, la delfidina, la petunidina, la peonidina, la pelargonidina y la malvidina. Las uvas rojas y sus derivados, el zumo de uva morada, las bayas, las ciruelas y las cerezas son alimentos ricos en antocianidinas.

A diferencia de los otros flavonoides, las **isoflavonas** están caracterizadas por tener el anillo B unido a la posición C3 y no a la posición C2. Tienen una distribución muy limitada en el reino vegetal, con cantidades sustanciales encontradas solamente en leguminosas. La soja es prácticamente la única fuente dietética de isoflavonas. Sin embargo, isoflavonas comunes como la genisteína, la daidzeína, y la gliciteína, también se dan, pero en más bajos niveles, en los guisantes. Las isoflavonas se dan normalmente en forma de  $\beta$ -glucósidos, o como acetyl- $\beta$ -glucósidos y malonyl- $\beta$ -glucósidos, y son, por lo tanto, compuestos polares y solubles en agua. Las isoflavonas también pueden ser modificadas mediante metilación, hidroxilación o polimerización.

### 1.4.1.2 No flavonoides

Los principales compuestos fenólicos no flavonoides importantes desde un punto de vista nutricional son: los ácidos fenólicos (hidroxibenzoatos), los hidroxicinamatos y sus conjugados derivados, y los estilbenos (figura 9).

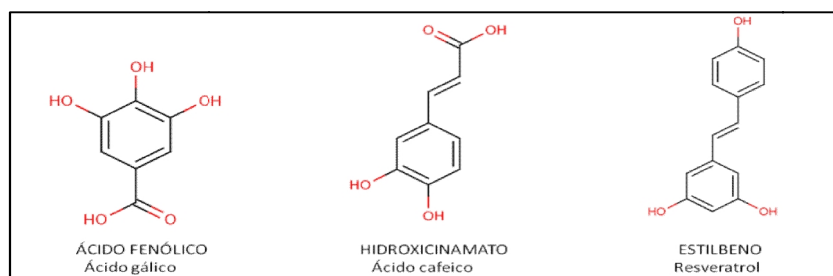


Figura 9. No flavonoides comunes en los alimentos. Figura obtenida de (14).

Los **ácidos fenólicos** son también conocidos con el nombre de hidroxibenzoatos y tienen la estructura química  $C_6-C_1$ . Están representados por los ácidos: gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico y sirínico. Típicamente, forman parte de estructuras complejas como ligninas y taninos hidrolizables. También pueden ser encontrados, en alimentos, en forma de derivados de azúcares y ácidos orgánicos. Hay ácidos fenólicos en bayas, zumo de pomelo, dátiles, cereales, especias y hierbas aromáticas.

Por otro lado, los **hidroxicinamatos** poseen la estructura química  $C_6-C_3$  y los más comunes son los ácidos *p*-coumárico, cafeico y ferúlico. Las frutas (las manzanas y los dátiles), las zanahorias, los tomates, las lechugas y el café verde son ricos en hidroxicinamatos. En esta subclase de no flavonoides, hay un especial interés nutricional en los curcuminoides, los cuales pueden ser encontrados en zanahorias, dátiles y lechuga.

Los miembros de la familia de los **estilbenos** tienen la estructura  $C_6-C_2-C_6$  y son producidos en las plantas en respuesta a enfermedad, daño o estrés. La principal fuente dietética de estilbenos es el resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) del vino tinto y de los cacahuetes aunque también se halla en pequeñas cantidades en bayas, col lombarda y espinacas. El resveratrol (RSV) se da en forma de los isómeros *cis* y *trans* y *trans*-resveratrol; el *trans*-resveratrol-*O*-glucosido (*trans*-piceido) ha sido detectado también, recientemente, en los pistachos. Se ha comprobado que el *trans*-RSV tiene efectos beneficiosos sobre la salud (14).

### 1.4.2 Biodisponibilidad de los polifenoles

Es importante conocer la biodisponibilidad de los polifenoles, es decir, qué factores están involucrados en la liberación de los polifenoles de los alimentos y el destino final de estos en el organismo, para determinar cuáles de estos polifenoles son los que van a resultar más eficaces en la prevención y mejora de la salud humana.

## 1. INTRODUCCIÓN

La biodisponibilidad de los polifenoles varía enormemente de un compuesto a otro. La estructura química de los polifenoles, y no su concentración, determina la velocidad y el grado de absorción y la naturaleza de los metabolitos circulantes en el plasma.

Actualmente, se conoce bien el metabolismo de varios polifenoles. En los alimentos, todos los flavonoides excepto los flavan-3-oles existen en formas glicosiladas. Normalmente, muchos de los glicosidos probablemente resisten la hidrólisis ácida en el estómago y, por tanto, llegan intactos al intestino delgado, lugar dónde sólo las agliconas (forma no glicosilada de un polifenol) y algunos glucósidos pueden ser absorbidos. Excepcionalmente, se ha observado que la absorción a nivel gástrico es sólo posible para algunos flavonoides como las antocianidinas.

Por consiguiente, muchos de los polifenoles están presentes en los alimentos en forma de ésteres, glicosidos o polímeros que no pueden ser absorbidos en su forma nativa. Estas sustancias tienen que ser hidrolizadas por enzimas intestinales, como la  $\beta$ -glucosidasa y la lactasa-phlorizin hidrolasa, o por la microflora del colon, antes de ser absorbidas. En el colon, la microflora además de hidrolizar glicosidos hasta agliconas, metaboliza las agliconas hasta ácidos aromáticos (15).

Una vez absorbidos en los enterocitos, los polifenoles en forma aglicona, son sometidos a conjugación. Este proceso principalmente incluye metilación, sulfatación y glucuronización. Estas reacciones están catalizadas respectivamente por la enzima catecol-O-metil transferasa (en hígado y riñones), la sulfotransferasa (en hígado, principalmente) y la UDP-glucuronosiltransferasa (en intestino e hígado). La conjugación de los polifenoles representa un proceso de detoxificación metabólica, común a muchos xenobióticos, que facilita su eliminación por vía biliar y urinaria mediante el aumento de su hidrofiliidad. Se ha estimado que el 90-95 % de los polifenoles absorbidos son convertidos en conjugados (16).

Los metabolitos de los polifenoles circulan en la sangre unidos a proteínas, principalmente a la albúmina. La afinidad del polifenol por la albúmina depende de su estructura química. Además, la unión a la albúmina puede condicionar la velocidad de eliminación de los metabolitos y su liberación a células y tejidos. En cambio, todavía no

está claro si los polifenoles tienen que estar libres o bien unidos a albúmina para poder ejercer su actividad biológica.

Las concentraciones de polifenoles en el plasma varían en función de la naturaleza del polifenol y de su fuente de origen (15). Las concentraciones máximas de flavonoides intactos son bajas, aproximadamente pueden llegar a ser de 1  $\mu$ M. De hecho, las concentraciones máximas de polifenoles suelen alcanzarse 1-2 h tras la ingestión, excepto las de aquellos polifenoles que requieran ser degradados antes de su absorción. Por tanto, el mantenimiento de altas concentraciones en plasma requiere la ingestión repetida de polifenoles con el tiempo (17).

### **1.4.3 Mecanismos biológicos de los polifenoles sobre el organismo**

Hay varios mecanismos que intentan explicar las acciones biológicas de los polifenoles en los animales. Estos mecanismos biológicos se pueden clasificar en dos grupos, en: i) mecanismos generales o no específicos, relacionados principalmente con la presencia de grupos fenólicos y, ii) mecanismos específicos, dependientes de las características químicas y estructurales de un polifenol activo.

Los polifenoles pueden afectar a la función celular de manera no específica: i) como antioxidantes, bien, captando radicales libres o bien, quelando metales (hierro y/o cobre) para prevenir la formación de radicales libres; y ii) interactuando con la bicapa lipídica modificando la estructura y las propiedades físicas de ésta tales como la fluidez y las propiedades eléctricas.

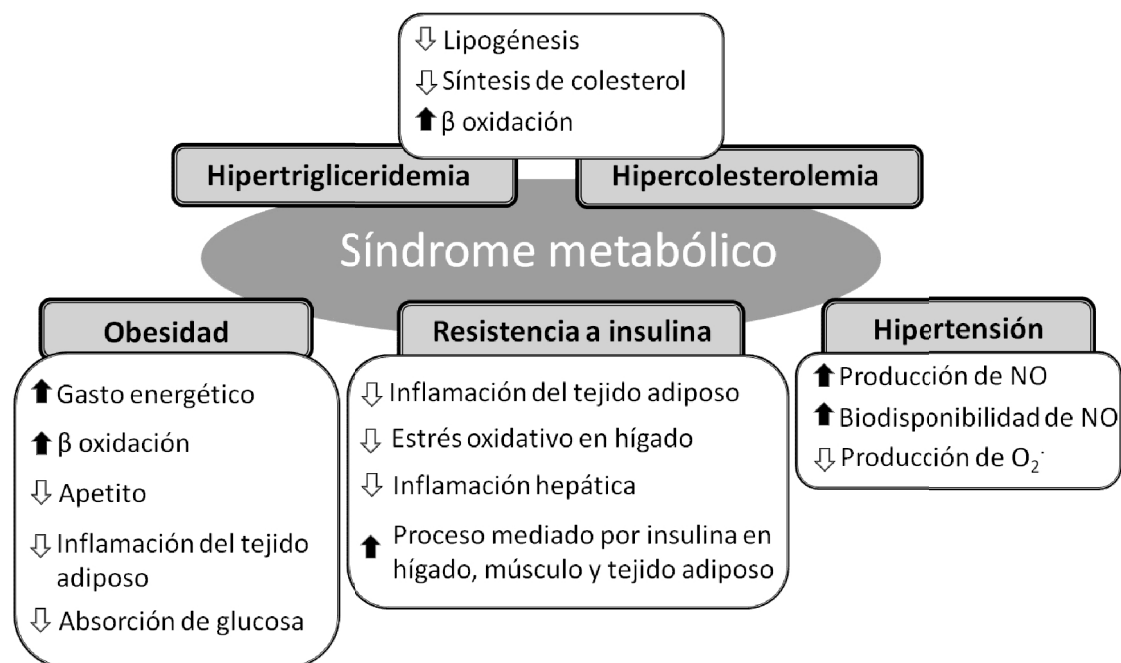
Por otro lado, los compuestos fenólicos pueden actuar de manera específica sobre el organismo interactuando con: diversas enzimas (normalmente, inhibiendo sus actividades), factores de transcripción y receptores (18).

### **1.4.4 Efectos beneficiosos de los polifenoles sobre la salud**

Los polifenoles ejercen efectos beneficiosos sobre la salud. La ingestión de alimentos ricos en polifenoles está asociada a la prevención y mejora de los factores de riesgo asociados al SM: la obesidad, la hipertrigliceridemia, la hipercolesterolemia, la hipertensión y la resistencia a la insulina (figura 10). Además de incidir sobre el SM y,

## 1. INTRODUCCIÓN

por consiguiente, en la reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular, los polifenoles son capaces de modular la respuesta inflamatoria, nexo común entre muchas de estas patologías. También poseen efectos anticancerosos, neuroprotectores, y reguladores sobre el metabolismo energético y la salud intestinal, entre otros.



**Figura 10. Síndrome metabólico y polifenoles de la dieta.** La figura muestra los cinco factores de riesgo que definen el SM (cajas grises) y los efectos beneficiosos de los polifenoles en los parámetros asociados a cada factor (cajas blancas). Las flechas indican la dirección de los cambios mediados por los polifenoles. Figura obtenida de (19).

### 1.4.4.1 Obesidad y polifenoles

La obesidad está caracterizada por la acumulación de grandes cantidades de grasa en los adipocitos y por un aumento tanto del tamaño como del número de adipocitos. Hay evidencias científicas que apoyan la correlación entre el exceso de tejido adiposo intraabdominal o visceral (circunferencia de cintura) y otros factores observados en el SM. Además, el exceso de grasa es responsable de la producción de mediadores químicos que relacionan la obesidad con la inflamación (19).

Se evaluaron los efectos de las catequinas del té verde sobre diferentes parámetros de la obesidad (índice de masa corporal, peso corporal y circunferencia de cintura) en humanos y se concluyó que sólo había una reducción sobre estos parámetros cuando la ingesta de té verde había sido combinada con cafeína. Estas asociaciones podrían

ser el resultado de los efectos de las catequinas en el gasto energético y en la oxidación de grasa (20). Además el té verde podría reducir la absorción de glucosa mediante la inhibición de enzimas relacionadas con el metabolismo de la glucosa como la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa (21). Los flavonoides disminuyen la absorción de lípidos mediante la inhibición de la actividad de la lipasa pancreática, reduciendo la accesibilidad del sustrato a su enzima (22,23). También se han estudiado las acciones que tienen los flavonoides en ciertas vías del metabolismo lipídico. Por ejemplo, el extracto de mora (contiene polifenoles flavonoides y no flavonoides) administrado a hámsteres alimentados con dieta alta en grasas durante 12 semanas promovió la lipólisis y previno de la lipogénesis hepática (24) (figura 10). Por otro lado, combinaciones de RSV y QRC ejercieron efectos antiobesidad inhibiendo la diferenciación de preadipocitos e induciendo la apoptosis de adipocitos maduros en la línea celular de preadipocitos 3T3-L1 (25).

El tejido adiposo secreta gran variedad de adipoquinas proinflamatorias como la adiponectina, la leptina y el TNF- $\alpha$ , entre otras. El aumento de la adiposidad visceral está asociado a una elevada producción de estas adipocitoquinas, hecho que lleva a una inflamación local y generalizada. Se ha observado que los alimentos que contienen polifenoles interfieren en la señalización inflamatoria. En ratas alimentadas con fructosa, la administración de vino tinto redujo el peso del tejido adiposo y favoreció las vías de antiobesidad (antiinflamación) mediante la reducción de la expresión de la resistina (proobesidad) y el aumento de la expresión de la adiponectina (antiobesidad) (26)(19). En roedores alimentados con dieta alta en grasas, la administración de 30 mg/Kg de un extracto de proantocianidinas de pepita de uva (GSPE, *grape-seed proanthocyanidin extract*) a ratones durante 19 días provocó la reducción de la inflamación del tejido adiposo (27).

#### 1.4.4.2 Dislipemia y polifenoles

La dislipemia en SM está caracterizada por presentar: elevados niveles de TG, colesterol LDL y bajos niveles de colesterol HDL. Se ha observado que los flavonoides pueden bajar los TG plasmáticos y/o colesterol total y el colesterol LDL (o aumentar el

## 1. INTRODUCCIÓN

colesterol HDL) en circulación tanto en humanos como en modelos murinos de SM (figura 10).

En nuestro grupo de investigación se observó que el GSPE (25m/Kg de peso corporal/día durante 10 días) es capaz de disminuir los niveles de TG postprandiales en ratas (28) y ratones normolipidémicos (29), y en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas (30), además de reducir también la expresión de SREBP-1 en hígado. El mismo extracto también suprimió la expresión inducida por una dieta alta en grasas de: enzimas involucradas en lipogénesis como FAS y ATP-citrato liasa (31); de la proteína de transferencia microsomal, que es un controlador clave en el ensamblaje de lipoproteínas de baja densidad; y, de la diglicérido aciltransferasa 2 (30). De manera similar, otros extractos de flavonoides, como el regaliz y flavonoides puros como la baicalina, disminuyeron los niveles de expresión y actividad de genes lipogénicos (SREBP1, acetil CoA carboxilasa y FAS) en hígado de ratones alimentados con dieta alta en grasas (32-34). La administración de EGCG (3.2 g/Kg dieta durante 16 semanas) a ratones con dieta alta en grasas provocó una disminución del peso corporal, peso hepático y TG, y de los niveles de colesterol plasmáticos (35). Por otro lado, en ratones obesos, la administración de extracto de arándanos mejoró el perfil lipídico y redujo la grasa visceral. Estos efectos están mediados probablemente por la activación de la vía adiponectina/AMPK, la cual acelera la utilización de ácidos grasos en el músculo y disminuye el almacenamiento de grasas en los adipocitos (36).

### 1.4.4.3 Hipertensión arterial y polifenoles

La regulación de la presión arterial (PA) es el resultado de la interacción de una serie de moléculas y sistemas. Unos niveles adecuados de NO (óxido nítrico) están asociados con una vasodilatación apropiada y una PA normal; mientras que una disminución en la biodisponibilidad de NO dificulta la relajación del músculo liso desembocando en un aumento de la PA. Algunas bayas son eficaces en la reducción de la PA sistólica y diastólica en pacientes con factores de riesgo asociados a SM.

En muchos de los estudios hechos en ratas con SM (26,37,38), los flavonoides disminuyeron la presión arterial mediante la mejora de la función endotelial y el aumento en la biodisponibilidad del NO. El aumento de la biodisponibilidad de NO

puede ser el resultado de una alta síntesis de NO, la cual es resultado de un aumento en la expresión y/o actividad de NOS (sintasa de óxido nítrico) o a una baja degradación de NO llevada a cabo por aniones superóxido ( $O_2^-$ ) (figura 10).

#### **1.4.4.4 Enfermedad Cardiovascular (ECV) y polifenoles**

Se ha invertido mucho esfuerzo en el estudio de la capacidad de los polifenoles de inhibir la oxidación de las LDL (figura 10) debido a que los LDL oxidados son los mayores constituyentes de las placas aterogénicas, la base de la ECV. Se cree que la formación de éstas es iniciada por la adhesión de leucocitos a las paredes y a su posterior migración al espacio subendotelial. Éste es un proceso esencialmente inflamatorio, inducido por TNF y IL-1 $\beta$ . A continuación de esta fase crónica de la ECV o formación de las placas de ateroma, puede darse una fase aguda, es decir, la actividad trombótica (formación de coágulo).

En ratones alimentados con extracto de vino tinto o catequina se observó una actividad trombótica reducida (39). Además, la nobiletina, un flavonoide polimetilado, podría reducir la concentración de colesterol plasmático y reducir la aterosclerosis a nivel de pared vascular inhibiendo la formación de células espumosas de macrófago (40). Por último, estudios epidemiológicos realizados en humanos constatan que la ingesta de flavanonas, antocianidinas y ciertos alimentos ricos en flavonoides reduce la incidencia de muerte por ECV (41).

#### **1.4.4.5 Resistencia a insulina y polifenoles**

La resistencia a la insulina lleva a: una deficiencia en la tolerancia a la glucosa, a la hiperinsulinemia y juega un papel muy importante en el desarrollo de la diabetes tipo 2 (figura 10). Mecánicamente, la resistencia a insulina en el tejido adiposo está asociado a un aumento del almacenamiento de grasa en los adipocitos y al desarrollo de inflamación local. Dos de los inductores de resistencia a insulina como son la inflamación y el estrés oxidativo en el hígado, mejoraron tras la administración de flavonoides en ratas alimentadas con fructosa durante 60 días. La galangina (100  $\mu$ g/Kg) previno el aumento de la glucosa y la insulina en el plasma, el daño oxidativo y los cambios inflamatorios en el hígado asociados a la administración de fructosa (42).

## 1. INTRODUCCIÓN

En preadipocitos 3T3-L1 el tratamiento con kaempferitina (10-20  $\mu\text{M}$ ) activó la vía de transducción de insulina mediante la estimulación de la fosforilación del receptor  $\beta$  de la insulina, del sustrato 1 del receptor de la insulina y el sitio de la serina473 en la proteína kinasa B (PKB/Akt) (43). Por otro lado, las procianidinas lograron aumentar la captación de glucosa en miotubos L6E9 y en preadipocitos 3T3-L1 (44).

### 1.4.4.6 Cáncer y polifenoles

Muchas de las moléculas de señalización involucradas en inflamación, por ejemplo, NF $\kappa$ B, activador de proteína-1 (AP-1) o las proteínas quinazas activadas por mitógenos (MAPK mitogen-activated protein kinases), están también involucradas en procesos más generales tales como la regulación de la proliferación y la diferenciación celular. Los polifenoles pueden modular las vías de señalización celular, de este modo, inhibiendo el desarrollo o progresión del cáncer e inducir apoptosis en células tumorales (16). El EGCG bloquea cada etapa de la carcinogénesis mediante la modulación de las vías de transducción de señal involucradas en: la proliferación celular, transformación, inflamación, apoptosis, metástasis e invasión (45). Se ha descrito que el RSV exhibe efectos antiproliferativos en células cancerosas mediante varios mecanismos como la inhibición de C-Jun y la supresión de la unión al DNA de AP-1, entre otros (46). También se ha demostrado que la luteolina, la QRC y el kaempferol inducen paro del ciclo celular y apoptosis en células cancerosas de próstata y de mama vía inhibición de la actividad AG sintasa (FAS, *fatty acid synthase*) (47). Además, la combinación de EGCG, RSV y  $\gamma$ -tocotrienol en dosis subóptimas ejercen un efecto sinérgico en la supresión de la proliferación celular en comparación con cada fitoquímico añadido individualmente, en células de cáncer de mama MCF-7 (48).

Por otro lado, los polifenoles pueden inhibir la angiogénesis y, de este modo, el crecimiento tumoral, vía inhibición del factor de crecimiento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). De hecho, se ha observado que algunos compuestos fenólicos pueden inhibir la liberación de VEGF de células de cáncer de mama humanas *in vitro*, a concentraciones tan bajas como 0,1 $\mu\text{M}$  (49).

### 1.4.5 Efecto de los polifenoles sobre la respuesta a estrés de RE

Se ha observado que el kaempferol (10  $\mu\text{M}$ ) disminuye la UPR en una línea celular de músculo cardíaco de rata y en corazones aislados de rata (50). También la QRC (25-50  $\mu\text{M}$ ), en líneas humanas de cáncer de colon (Caco-2 y células LS180), reduce la respuesta a estrés de RE mediante el bloqueo de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  mediada por PERK, la activación de XBP1 mediada por IRE1 y la expresión de ATF6. La QRC suprime la activación de IRE1 y PERK inducida por A23187 (ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y thapsigargina (inhibidor de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana del RE). Además, el efecto supresor de la QRC en la inducción del mRNA de GRP78/BiP fue reproducido por inhibidores de PI3K. Por tanto, se cree que la QRC suprime el estrés de RE causado por una desregulación de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la inhibición de PI3K (51).

El desarrollo del SM también se ha asociado con el estrés de RE. Li *et al.* indujeron la sobreexpresión de SIRT1 en hígado de ratones con obesidad y éstos manifestaron una mejora de su esteatosis hepática y su resistencia a la insulina, al parecer mediante la disminución del estrés de RE y de la actividad de mTORC1. Se observó una mejora de los marcadores de estrés: GRP78/BiP, splicing XBP1, fosforilación de eIF2 $\alpha$  y CHOP. También observaron que la activación de SIRT1 con RSV inhibe la actividad de mTORC1 y, en consecuencia, se reduce la señalización de UPR en células HepG2. De este modo, se ha sugerido que los polifenoles activadores de SIRT1, como el RSV, podrían ser útiles para el tratamiento de enfermedades en las que la UPR está activada como en la esteatosis hepática, la obesidad y la Diabetes Mellitus tipo 2 (52).

En cambio, el tratamiento con liofilizado de uva (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) no previno la apoptosis mediada por estrés de RE en una línea celular humana de hepatoma y, lo mismo sucedió en un cultivo primario de hepatocitos de ratón (50). De manera similar al caso anterior, el EGCG activó la producción de algunos componentes proapoptóticos (inducción de CHOP y procesamiento de procaspasa 12) vinculados a la respuesta a estrés de RE en células de hepatoma de ratón, en parte debido a la inhibición de la glucosidasa II, enzima necesaria para el procesamiento proteico en el RE (53). Liu *et al* mostraron que el RSV causa un paro del ciclo celular y una inhibición de la proliferación vía inducción de la UPR en la línea celular de leucemia humana K562 (54).

## **1. INTRODUCCIÓN**

Al parecer, la apoptosis inducida por el RSV también está asociada con el estrés de RE en células de cáncer de colon HT29. En este caso el tratamiento con RSV estimuló diferentes marcadores de estrés (fosforilación de eIF2 $\alpha$ , splicing XBP1, CHOP y GRP78/BiP) y la muerte celular apoptótica de manera dosis dependiente (55). Adicionalmente, se ha observado que la QRC podría inducir apoptosis mediante la activación de la cascada de las caspasas a través de la vía mitocondrial y de estrés de RE en células de cáncer de próstata PC-3 (56).

## ***2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

El estrés de retículo endoplasmático (RE), es decir, la dificultad para plegar proteínas en el RE, activa la respuesta a estrés de RE, también conocida como UPR (*Unfolded Protein Response*). La UPR tiene un papel muy importante en el metabolismo lipídico y en el hígado graso no alcohólico (NAFLD), el cual es considerado como la manifestación hepática del SM. La alteración de cualquiera de las vías de señalización de la UPR tiene consecuencias en la lipogénesis hepática. De hecho, se ha comprobado la asociación entre la señalización del estrés de RE y el NAFLD mediante la modulación genética de las diferentes vías de la UPR (1).

Por otro lado, los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas que ejercen efectos beneficiosos sobre la salud. Mejoran las patologías asociadas al SM (obesidad, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión y resistencia a la insulina) y también exhiben actividad anticancerosa y antiinflamatoria (19). Recientemente, se ha publicado que los polifenoles activadores de SIRT1, como el resveratrol (RSV), podrían ser útiles para el tratamiento de enfermedades en las que la UPR está activada como en el NAFLD, la obesidad y la Diabetes Mellitus tipo 2 (52).

La presente tesis se enmarca dentro del Grupo de Investigación de Nutrigenómica, el cual lleva muchos años investigando los efectos que tienen las proantocianidinas de la pepita de uva (GSPE) sobre la salud y hasta el momento se ha observado que ejercen efectos positivos en la dislipemia, la diabetes y la inflamación (57). Otros investigadores han descrito que los polifenoles reducen la acumulación lipídica *in vitro* e *in vivo* (58). Por otra parte se ha afirmado que una dieta alta en AG saturados promueve la activación de la UPR y NAFLD *in vivo* (59). Debido a la interacción entre el estrés de RE y la regulación de la lipogénesis hepática descrita anteriormente, la hipótesis de partida es la siguiente: **la capacidad de los polifenoles para reducir la acumulación lipídica inducida por el tratamiento con AGL saturados podría ser mediada en parte por una disminución en la respuesta a estrés de RE *in vivo* e *in vitro*.**

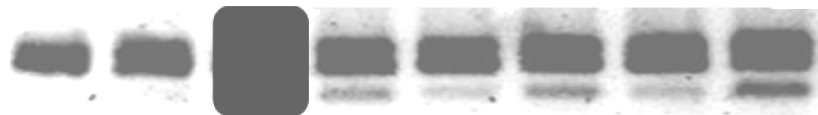
A partir de esta hipótesis de partida se han planteado los objetivos descritos a continuación:

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. **Determinar si la capacidad del GSPE y el ácido docosahexaenoico (DHA) para reducir la acumulación lipídica inducida por una dieta de cafetería podría ser mediada por una disminución en la respuesta a estrés de RE en ratas.**
2. **Determinar si la capacidad del RSV para reducir la acumulación lipídica inducida por la incubación con AGL saturados podría ser mediada en parte por una hipotética disminución en la respuesta a estrés de RE en células HepG2.**
3. **Conocer si la quercetina es capaz de reducir la UPR inducida por dosis subtóxicas de RSV en células HepG2.**
4. **Determinar si la quercetina es capaz de mitigar la UPR inducida por la incubación con AGL saturados y/o la UPR desencadenada por cotratamientos con palmitato y RSV en células HepG2.**
5. **Estudiar si el acondicionamiento de larga duración (crónico) con dosis fisiológicas de polifenoles (GSPE o RSV) puede servir para proteger a células HepG2 de la respuesta a estrés de RE ocasionada por un posterior tratamiento inductor de estrés de mayor magnitud (en este caso, el palmitato).**

Se han diseñado estudios *in vivo* e *in vitro* para intentar hallar respuestas a los objetivos planteados. Dentro de los estudios *in vivo* se ha llevado a cabo un experimento crónico con GSPE y/o DHA en ratas alimentadas con dieta de cafetería (modelo de obesidad) durante 21 días. Por otro lado, se han realizado diversos experimentos *in vitro*, en células HepG2, que pueden ser clasificados en experimentos agudos y en experimento crónico. La sección de experimentos agudos ha sido subdividida en 3 bloques: Bloque I (Tratamientos agudos con resveratrol y/o palmitato), Bloque II (Tratamientos agudos con quercetina y/o resveratrol) y, Bloque III (Tratamiento agudo con quercetina y/o resveratrol y/o palmitato).

### ***3. MATERIALES Y MÉTODOS***



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

### 3.1 Reactivos

El extracto de procianidinas de pepita de uva (GSPE) ha sido fabricado por la empresa Les Dérives Résiniques et Terpéniques (Dax, Francia). Esta empresa ha proporcionado muestras de este extracto al grupo de Nutrigenómica. El GSPE contiene un 16.55% de formas monoméricas, un 18.77% de formas diméricas, un 16% de formas triméricas, un 9.3% de formas tetraméricas, un 35.7% de oligómeros de procianidinas (5-13 unidades), y un 4.2% de ácidos fenólicos.

El DHA (ácido docosahexaenoico) suministrado a las ratas procede del aceite de pescado comprado a Martek (Winchester, EEUU). El perfil de ácidos grasos de este producto es: 7.4% de 14:0, 20% de 16:0, 0.8% de 18:0, 7.1% de 18:1n-9, 0.9% de 18:2n-6, 0.6% de 20:4n-6 ARA, 1.4 % de 20:5n-3 EPA, 15.7% de 22:5n-6DPA, 39.7% de 22:6n-3 DHA y 6.4% de otros.

La albúmina de suero bovino (BSA, Bovine Serum Albumin) (ref. A8806), el palmitato de sodio (ref. P9767), el oleato de sodio (ref. O7101), el resveratrol (RSV) (ref. R5010), el dimetilsulfóxido (DMSO, Dimethyl Sulfoxide)(ref. D8418), cis-5,8,11,14,17 -ácido eicosapentaenoico (EPA) (ref. E2011), TO-901517 (ref. T2320), el tetrazolio [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT) (ref. M5655), el Oil Red O (ref. O0625), el diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DCFH-DA) (ref. 35845), el Cocktail Inhibidor de Proteasas (ref. P8340), el Cocktail 2 de Inhibidores de Fosfatasas (ref. P5726) y el Cocktail 3 de Inhibidores de Fosfatasas 3 (ref. P0044) y la quercetina dihidrato (QRC) (ref. Q0125) fueron comprados a Sigma-Aldrich (EEUU). El fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, *phenilmethylsulfonyl fluoride*) (ref. 93482) fue adquirido de (FLUKA (BioChemika). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) fue comprado a Lonza (USA). La línea celular de hepatoblastoma HepG2 fue obtenida de la Colección Europea de Cultivos Celulares (Reino Unido).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.2 Diseño experimental

### 3.2.1 Estudios *in vivo*

#### 3.2.1.1 Experimento crónico con GSPE y/o DHA en ratas alimentadas con dieta de cafetería (modelo de obesidad) durante 21 días.

En este experimento crónico *in vivo* se han utilizado 42 ratas macho de la cepa Wistar Crl:WI compradas a Charles River (Barcelona, España). Tuvieron diferentes pesos al llegar al estabulario: 226-250 g (8 ratas), 201-225g (15 ratas), 151-175 g (13 ratas), 126-150 g (6 ratas). El Comité de Ética Animal de la Universitat Rovira i Virgili ha aprobado todos los procedimientos a los cuales han sido sometidos estos animales. Los animales han sido mantenidos en el estabulario en ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad (luz de 9:00 h a 21:00 h), en un ambiente controlado de temperatura ( $22^{\circ}\text{C}\pm 2$ ) y alimentados *ad libitum* con una dieta de pienso estándar (Panlab, Barcelona, España) y agua. Todos los animales han tenido como mínimo una semana de adaptación antes del inicio del experimento.

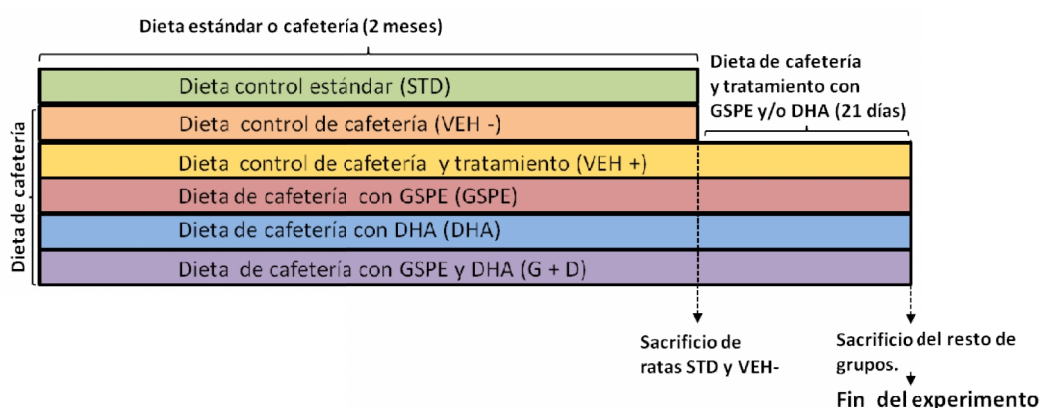


Figura 11. *Planning* del experimento crónico de animales.

Los animales han sido divididos en 6 grupos (figura 11): Dieta control estándar (STD), Dieta control de cafetería (VEH -), Dieta control de cafetería y tratamiento (VEH +), Dieta de cafetería con 25 mg GSPE/Kg (GSPE), Dieta de cafetería con 500 mg DHA/Kg (DHA) y Dieta de cafetería con 25mg GSPE/Kg + 500 mg DHA/Kg (G + D). Hay un total de 7 ratas por grupo. Durante dos meses se les ha administrado agua y pienso estándar o dieta de cafetería *ad libitum* a las 19:00 h y se les ha retirado la comida a las 9:00 h del día siguiente. Transcurrido este tiempo, los animales alimentados con dieta

de cafetería ya han aumentado su peso en aproximadamente un 20% con respecto al que tenían al inicio del experimento, considerándolo un buen modelo de obesidad inducida por dieta para poder iniciar los tratamientos posteriores de 21 días. Los animales alimentados con dieta de cafetería tuvieron pesos comprendidos entre 550-600 g mientras que los del grupo de control estándar pesaron aproximadamente 400-450 g. El tratamiento con 25 mg GSPE/Kg y/o 500 mg DHA/Kg se empezó a dar de forma escalonada en animales alimentados con dieta de cafetería, añadiendo dos ratas cada día. El tratamiento con GSPE y/o DHA se suministró directamente en la cavidad oral de los animales mediante una jeringa y haciendo servir como vehículo goma arábica, la cual también se dio al grupo VEH +. El tratamiento o vehículo junto con la dieta de cafetería se les dio a las 19 h cada día y se les retiró a las 9:00 h del día siguiente. Transcurridos los 21 días de tratamiento, los animales fueron sometidos a ayuno 3 horas antes del sacrificio. Fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/Kg) y exsanguinados por la arteria aorta abdominal. Los tejidos de interés fueron extraídos y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido (N<sub>2(l)</sub>). El plasma fue obtenido por centrifugación a 2500 x g durante 20 min a 4°C. Tanto el plasma como los tejidos fueron guardados a -80°C hasta el momento de su análisis.

### 3.2.2 Estudios *in vitro*

Los experimentos *in vitro* fueron realizados en la línea celular de hepatoblastoma humano HepG2. Las células fueron cultivadas en frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Orange Scientific) con DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 2% penicilina-estreptomicina, 1% L-glutamina, y 1% aminoácidos no esenciales (NEAA, *non-essential amino acids*) en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Para la realización de los tratamientos, se sembraron las células a una densidad de 5 × 10<sup>5</sup> células/pozo en placas de 12 pozos (Orange Scientific). Posteriormente, se procedió a la extracción de mRNA y proteína.

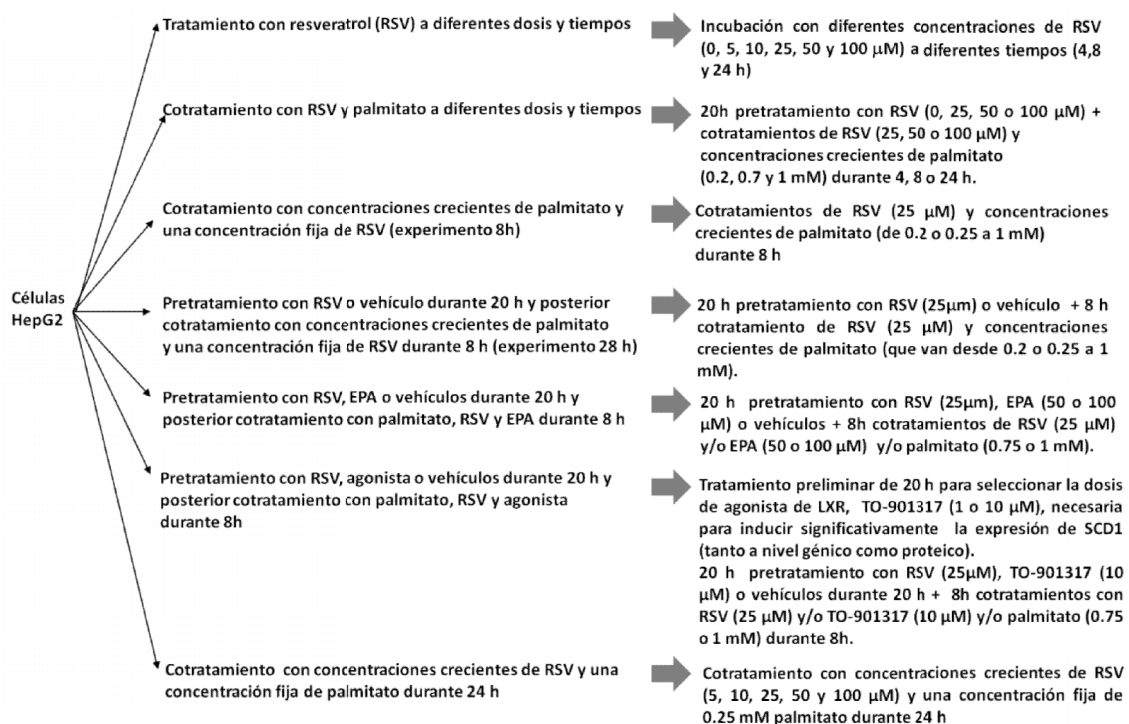
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.2.1 Experimentos agudos en células HepG2

##### 3.2.2.1.1 Bloque I. Tratamientos agudos con resveratrol y/o palmitato

En la figura **12** se esquematizan los experimentos realizados en el bloque I. Para los tratamientos con RSV se incubaron las células HepG2 con concentraciones crecientes de este polifenol (0, 5, 10, 25, 50 o 100  $\mu\text{M}$ ) o vehículo (0.1% etanol) durante 4, 8 o 24 h. En el cotratamiento con palmitato-RSV a diferentes dosis y tiempos, las células fueron lavadas dos veces con DMEM sin suero y transferidas a medio con 0.1% etanol, 25, 50 o 100  $\mu\text{M}$  RSV durante 20 h. Posteriormente, las células fueron cotratadas con RSV (0, 25, 50 o 100  $\mu\text{M}$ ) y palmitato (0, 0.2, 0.7 o 1 mM) durante 4, 8 o 24 h usando BSA como transportador de AG (ratio palmitato:BSA, 7:1). Para los tratamientos palmitato-RSV (experimentos 8 y 28 h), las células HepG2 fueron lavadas dos veces con DMEM sin suero y transferidas a medio con o sin 25  $\mu\text{M}$  RSV durante 28 h; 8 h antes de la finalización del experimento, se añadieron concentraciones crecientes de palmitato (0.2, 0.7 y 1 mM para la evaluación de la producción de ROS o, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM para el resto de ensayos). Para los experimentos de enriquecimiento de la insaturación de la membrana, se añadió EPA (50 o 100  $\mu\text{M}$ ) usando BSA como transportador de AG (ratio EPA:BSA, 4:1) o TO-901317 (10  $\mu\text{M}$ ) concomitantemente con el palmitato. Se realizó un tratamiento preliminar con TO-901317 para escoger la dosis óptima para inducir la expresión de SCD1. También se llevó a cabo un cotratamiento con concentraciones crecientes de RSV (0, 5, 25, 50 o 100  $\mu\text{M}$ ) y una concentración fija de palmitato (0.25 mM) durante 24 h.

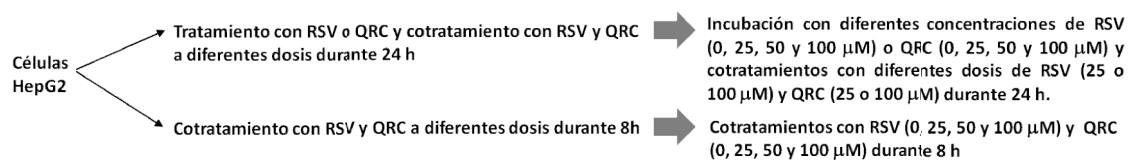
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 12. Experimentos agudos con resveratrol y/o palmitato (bloque I).** El vehículo del RSV fue el etanol al 0.1%, el del TO-901317 fue el 0.1% DMSO y, el del palmitato y el EPA fue el BSA al 5% y 17%, respectivamente, en medio DMEM sin suero.

#### 3.2.2.1.2 Bloque II. Tratamientos agudos con quercetina y/o resveratrol y/o palmitato

En la figura 13 se esquematizan los experimentos realizados en el bloque II. Inicialmente, se llevaron a cabo tratamientos con dosis crecientes de RSV (25-100  $\mu\text{M}$ ), dosis crecientes de QRC (25-100  $\mu\text{M}$ ) o cotratamientos con diferentes dosis (25 o 100  $\mu\text{M}$ ) de RSV y QRC durante 24 h en células HepG2. A continuación, se realizaron cotratamientos con RSV (0, 25, 50 o 100  $\mu\text{M}$ ) y QRC (0, 25, 50 o 100  $\mu\text{M}$ ) durante 8h.



**Figura 13. Experimentos agudos con quercetina y/o resveratrol (bloque II).** El vehículo del RSV fue el etanol al 0.1% y el de la QRC fue el 0.4% DMSO.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.2.1.3 Bloque III. Experimento agudo con quercetina y/o resveratrol y/o palmitato

En la figura 14 se esquematiza el experimento realizado en el bloque III. Las células HepG2 fueron lavadas dos veces con medio DMEM sin suero e incubadas con dicho tipo de medio *overnight* (O/N). Posteriormente, fueron cotratadas con QRC (25 o 50  $\mu$ M) y/o RSV (25 $\mu$ M) y concentraciones crecientes de palmitato (0.75 y 1 mM) usando BSA como transportador de AG (ratio palmitato:BSA, 7:1) durante 8 h. Como vehículos del RSV, de la QRC y del palmitato se utilizaron 0.05% etanol, 0.4% DMSO y 5% BSA, respectivamente.

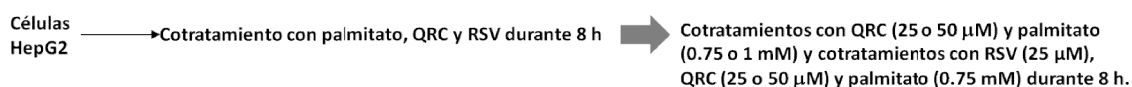


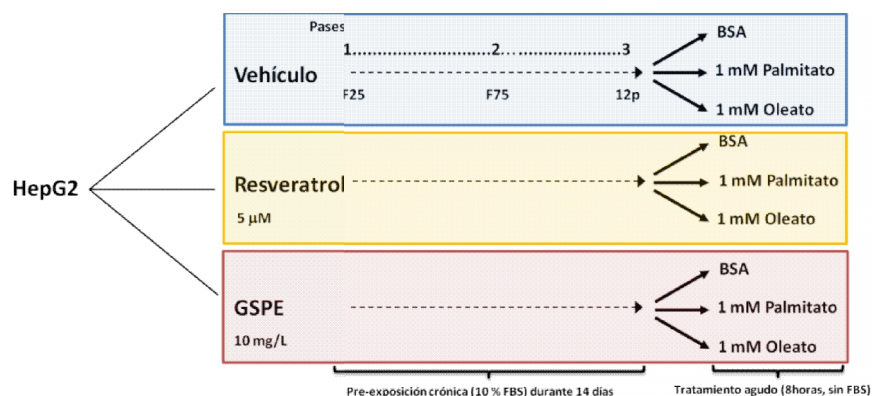
Figura 14. Experimento agudo con quercetina y/o resveratrol y/o palmitato (bloque III). El vehículo del RSV fue el etanol al 0.05%, el de la QRC fue el 0.4% DMSO y el del palmitato fue el BSA al 5% en medio DMEM sin suero.

#### 3.2.2.2 Experimento crónico en células HepG2

En este experimento crónico, se dividieron las células en 3 grupos (cada uno de ellos en un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> diferente) en función del tipo de pretratamiento a las que serían sometidas durante 14 días: vehículo (0.05 % de etanol), 5  $\mu$ M de resveratrol o 10 mg/L de GSPE (figura 15). Fue necesario un período de proliferación celular en frascos de cultivo durante dos pases (en los pases 1 y 2 se utilizaron frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> y 75 cm<sup>2</sup>, respectivamente), en el cual las células recibieron el pretratamiento correspondiente cada dos días para mantener la concentración de polifenoles en el medio (etapa de preadaptación). A continuación, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 12 pozos, utilizándose una placa por grupo. Finalmente, cada placa de cultivo de 12 pozos fue dividida en tres secciones destinando 4 pozos a cada tratamiento final de carácter agudo. Es decir, cada grupo de células (1 grupo = 1 placa) fue dividido en 3 subgrupos dependiendo del tipo de tratamiento agudo de 8h que recibirían posteriormente: BSA (albúmina de suero bovino), 1 mM de Palmitato o 1 mM de Oleato.

El palmitato y el oleato fueron añadidos a las células usando BSA como transportador de AG. El ratio AGL:BSA fue de 7:1.

Los grupos BSA y Oleato son controles negativos de este experimento. El Oleato es un ácido graso monoinsaturado que no induce estrés de RE (60).



**Figura 15. Diseño experimental.** F25 y F75 son frascos de cultivo de células de 25 mL y 75 mL, respectivamente; 6p, placa de cultivo de 12 pozos.

### 3.3 Preparación de la solución palmitato-BSA

Los complejos palmitato-BSA fueron preparados como se ha descrito previamente por Bayer *et al.* con pequeñas modificaciones (61). Se disolvieron 13.9 mg de palmitato sódico en 0.5 mL de agua estéril (solución stock de 100 mM palmitato) con calor (70°C) y mezclando (a 250 rpm) durante 10 min en un thermomixer (Grant-bio). Se añadieron 50 µL de solución stock de palmitato a 950 µL medio DMEM sin suero que contuviera 5% BSA libre de AGs no esterificados (NEFA, *non esterified fatty acids*) (solución de trabajo 5 mM). La solución de trabajo fue calentada (40°C) y agitada (250 rpm) durante 1 h. Finalmente, se filtró la solución de trabajo (filtro de 20 nm de diámetro) y fue usada inmediatamente para tratar las células. El DMEM sin suero con un 5% BSA libre de NEFA fue usado como vehículo control.

### 3.4 Ensayo MTT

El ensayo colorimétrico MTT determina la capacidad de células viables para convertir la sal soluble de tetrazolio [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT) en un precipitado insoluble de formazan. Las sales de tetrazolio aceptan electrones de sustratos oxidados o enzimas, tales como el NADH y NADPH. En particular, el MTT es reducido por la ubiquinona y los sitios b y c del sistema de transporte de electrones mitocondrial, el cual resulta de la actividad succinato

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

deshidrogenasa. Esta reacción convierte las sales amarillas del MTT en cristales de formazan de color azul los cuales pueden ser disueltos en un solvente orgánico y la concentración del cual puede ser determinada espectrofotométricamente.

Para el ensayo, las células se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pozo en una placa de cultivo de 96 pozos e incubada *O/N*. Después de los tratamientos, se desecha el medio y se reemplaza por 200  $\mu\text{L}$  de medio fresco. Se añade a las células 50  $\mu\text{L}$  MTT recién preparado (5 mg/mL en tampón fosfato salino (PBS)) y, a continuación, se incuban durante 4 h a  $37^\circ\text{C}$ . Los cristales azules de formazán que se forman tras la reducción del colorante MTT son solubilizados con 200  $\mu\text{L}$  DMSO y 25  $\mu\text{L}$  tampón de glicina (0.1 M glicina, 0.1 M NaCl, pH 10.5) y cuantificado usando el lector Helios Zeta UV-Vis ELISA (Thermo Scientific). La absorbancia del colorante fue medida a 570 nm de longitud de onda (680 nm como longitud de onda de referencia). Las células tratadas con vehículo se establecen como el 100 % de la viabilidad. El porcentaje relativo de viabilidad se calculó como: Viabilidad (%) =  $[A_{570}(\text{compuesto})/A_{570}(\text{control}) \times 100]$ . La supervivencia celular o viabilidad (%) se determinó haciendo el promedio de tres experimentos repetidos.

### 3.5 Aislamiento de RNA

El RNA total fue extraído de células HepG2 o de células de tejido hepático usando un RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) introduciendo pequeñas modificaciones al protocolo del fabricante. Este kit comprende un conjunto de tampones con alto contenido en sales que permite que el RNA se una a las membranas de sílice, contenidas en las columnas RNeasy del kit. En primer lugar, las muestras biológicas son lisadas y homogenizadas en presencia de un buffer que contiene una sustancia desnaturizante llamada tiocianato de guanidinio (tampón RLT), la cual inactiva las RNasas para asegurar una óptima purificación del RNA. El etanol se añade al lisado celular para proporcionar unas condiciones adecuadas para la unión del RNA a las columnas, y entonces se aplica la muestra a la columna RNeasy Mini, donde el RNA total se une a la membrana y los contaminantes son eliminados. A continuación, el RNA de alta calidad es eluido con agua. Todas las etapas de unión, lavado y elución de la columna se llevan a cabo mediante centrifugación en una microcentrífuga. Mediante

este procedimiento se purifican moléculas de RNA más largas de 200 nucleótidos y hay un enriquecimiento de la fracción de RNA mensajero, mRNA (RNA que codifica para la secuencia proteica), respecto a otros RNAs.

Es importante trabajar, durante todo el proceso con guantes (para evitar contaminación por RNasas de las manos del investigador), con puntas con filtro, con micropipetas exclusivas para trabajar en la extracción de RNA y con eppendorfs certificados como RNasa *free*.

### 3.5.1 Extracción de RNA de cultivo celular (células HepG2)

El procedimiento es el siguiente:

- 1) Se retira el tratamiento de la placa de cultivo por aspiración y, a continuación, se ponen 2 mL de PBS 1X en cada pozo, echándolo cuidadosamente por la pared del pozo para evitar que se desprendan células adheridas a la placa. Desechar el PBS 1X del pozo.
- 2) Añadir 350  $\mu$ L de tampón RLT a cada pozo. Después, se guarda la placa a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora como mínimo pero idealmente, se dejará *O/N* (este paso es opcional pero asegura al investigador que las células estén completamente lisadas).
- 3) Descongelar la placa en una caja de porexpan con hielo. Mientras se descongela, se prepara un eppendorf por pozo, con 350  $\mu$ L etanol 70% y se rotula debidamente. También se rotulan las columnas RNeasy (se utiliza una columna por pozo), las cuales se venden unidas a un tubo colector de 2 mL.
- 4) Rascar bien cada pozo con la punta de la micropipeta e ir recogiendo 350  $\mu$ L de la mezcla de lisis (células + tampón RLT) y mezclarlo con en el etanol al 70% del eppendorf correspondiente rotulado en el paso 3). Se puede observar una sustancia viscosa de color blanco (es la cromatina).
- 5) Una vez mezclado bien, transferir 700  $\mu$ L de la mezcla de lisis + etanol al 70% que hay en los eppendorfs, a las columnas RNeasy (préviamente rotuladas). Centrifugar durante 30 s a  $> 8000 \times g$  y descartar el volumen excluido que queda en el tubo colector que viene con la columna.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

- 6) Añadir 700  $\mu\text{L}$  de buffer RW1 a la columna RNeasy. Centrifugar 30 s a  $> 8000 \times g$  y descartar el volumen excluido.
- 7) Añadir 500  $\mu\text{L}$  de buffer RPE a la columna RNeasy. Centrifugar 30 s a  $> 8000 \times g$  y descartar el volumen excluido.
- 8) Añadir 500  $\mu\text{L}$  de buffer RPE a la columna RNeasy. Centrifugar 2 min a  $> 8000 \times g$  y descartar el volumen excluido. En este momento, el RNA está unido a la columna.
- 9) Poner la columna RNeasy en un tubo colector nuevo de 2 mL y centrifugar a máxima velocidad ( $16300 \times g$ ) durante 1 min.
- 10) Poner la columna RNeasy sobre un tubo nuevo de 1.5 mL del kit (previamente rotulado). Añadir 40  $\mu\text{L}$  de agua RNasa free y centrifugar durante 1 min a  $> 8000 \times g$ .
- 11) A continuación el RNA es cuantificado con el espectrofotómetro (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 260 nm. También se evalúan su pureza (con el ratio A260/280) y su integridad (mediante una electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes).

#### 3.5.2 Extracción de RNA de tejido hepático

El procedimiento es el siguiente:

- 1) Rotular tubos eppendorf de 2 mL y añadir 300  $\mu\text{L}$  de buffer RLT en cada uno. A partir de este momento mantener estos tubos en  $\text{N}_2$  ( $l$ ) continuamente.
- 2) Recuperar los eppendorfs con las muestras de tejido almacenadas a  $-80^\circ\text{C}$  y pasarlos a una caja de porexpan con  $\text{N}_2$  ( $l$ ). Verter el contenido de un eppendorf con muestra sobre un trozo de papel de aluminio. A continuación, con la ayuda de un bisturí y unas pinzas curvas cortar la cantidad necesaria de tejido para poder realizar la extracción de RNA (aproximadamente, 30 mg de la muestra) y ponerlo en el tubo correspondiente (que estará en  $\text{N}_2$  ( $l$ ); apartado 1 de esta sección).
- 3) Los tubos contienen 300  $\mu\text{L}$  buffer RLT + muestra. A continuación se añaden 300  $\mu\text{L}$  buffer RLT más y esferas de cerámica de 1.4 mm (FastPrep Lysing

Matrix, MP), teniendo en cuenta que un tubo de esferas sirve para cuatro extracciones. De este modo, en el tubo tendremos un sándwich con los siguientes componentes en orden ascendente: buffer RLT + muestra + buffer RLT + esferas de cerámica.

- 4) Colocar los tubos en un agitador FastPrep para homogenizar las muestras utilizando el programa siguiente: *Speed*: 6.0 y *time*: 40 s. Realizar dos veces seguidas.
- 5) Recuperar el sobrenadante (pero no la espuma formada) y pasarlo a un eppendorf cuantificando el volumen recogido. Aproximadamente se recuperan unos 500  $\mu\text{L}$ .
- 6) Añadir un volumen de etanol (500  $\mu\text{L}$ , depende del volumen recuperado de muestra) y mezclar con la micropipeta. En este paso, habrá un volumen final de 1000  $\mu\text{L}$  en el tubo.
- 7) Cargar 500  $\mu\text{L}$  en una columna RNeasy. Centrifugar 30 s a  $> 8000 \times g$  y descartar el volumen excluido.
- 8) Cargar en la columna los 500  $\mu\text{L}$  que quedan. Centrifugar 30 s a  $> 8000 \times g$  y descartar el volumen excluido.
- 9) Proceder igual que en los apartados 6) a 11) de la sección Extracción de RNA de cultivo celular.

### 3.6 Retrotranscripción

La retrotranscripción es una técnica utilizada para convertir mRNA en cDNA (DNA complementario) molde, en una reacción catalizada por una DNA polimerasa dependiente de RNA llamada transcriptasa reversa (TR). Para realizar dicha conversión es necesario utilizar un oligonucleótico (*primer* o cebador) sintético como por ejemplo el *primer* oligo(dT)<sub>18</sub>, el cual se puede hibridar selectivamente con el extremo 3' de la cola poli(A) de casi todos los mRNA en eucariotas, hecho que permite que la TR extienda el *primer* y produzca una hebra de cDNA. El cDNA sintetizado con este sistema puede ser usado directamente como molde en PCR clásica o PCR a tiempo real.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Después de la extracción de RNA, se usa el kit *DNase I RNase-free* (Fermentas, Thermo Scientific) para retirar el DNA genómico de las soluciones de RNA. Una vez conocida la concentración de RNA se calcula el volumen necesario para coger 1 µg RNA. A continuación, a un tubo RNasa free de 200 µL se le añaden los siguientes componentes: 1 µg RNA, 1 µL 10X buffer de reacción con MgCl<sub>2</sub> y el volumen de agua RNasa free necesaria hasta completar 9 µL. Seguidamente se añade 1 µL de *DNasa I, RNase free* (1 u/µL) y se incuba a 37°C durante 30 min en el termociclador de gradiente Multigene Optimax (Labnet). Transcurrido este tiempo, se añade 1 µL 25 mM EDTA y se incuba a 65°C durante 10 min. En este momento la solución de RNA es libre de DNA y puede ser utilizada como molde en la retrotranscripción.

En la retrotranscripción se usa First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Thermo Scientific) y se trabaja de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se parte de 1 µg de RNA total de cada muestra y se procede como se detalla a continuación:

- 1) Al tubo con solución de RNA libre de DNA se le añaden los siguientes reactivos en el orden indicado en la tabla 1 (trabajar en hielo continuamente):

<i>Oligo(dT)18 primer</i>	1 µL
<i>5X Reaction Buffer</i>	4 µL
<i>RiboLock RNase Inhibitor (20 u/µL)</i>	1 µL
<i>10 mM dNTP Mix</i>	2 µL
<i>M-MuL V Reverse Transcriptase (20 u/µL)</i>	2 µL
Volumen total	20 µL

Tabla 1. Componentes del kit First Strand cDNA Synthesis utilizados en la retrotranscripción.

También se lleva a cabo una reacción idéntica, con todos los reactivos citados a excepción de la transcriptasa reversa para generar un control negativo llamado NAC (*Non Amplified Control*). El NAC es utilizado posteriormente en la PCR para verificar la ausencia de DNA genómico.

- 2) Mezclar cuidadosamente y realizar un pulso de centrifuga.
- 3) Incubar durante 60 min a 37°C.
- 4) Finalizar la reacción calentando a 70°C durante 5 min.

El producto de la reacción de la retrotranscripción puede ser utilizado directamente en la PCR o bien, guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante una semana.

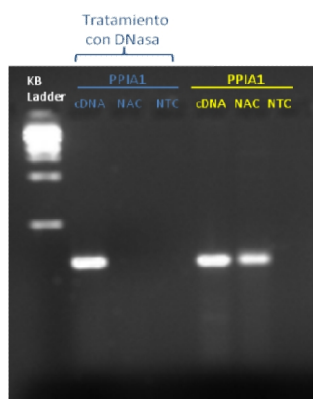
Primer	Dirección	Secuencia
ATF4 rata	<i>forward</i>	5'-TAT GGA TGG GTT GGT CAG TG-3'
	<i>reverse</i>	5'-CTC ATC TGG CAT GGT TTC C-3'
ATF4 humano	<i>forward</i>	5'-GGG TTC TCC AGC GAC AAG GCT AAG-3'
	<i>reverse</i>	5'-AAC AGG GCA TCC AAG TCG AAC TC-3'
ATF6 rata	<i>forward</i>	5'- GAC TGG GAG TCC ACG TTG TT-3'
	<i>reverse</i>	5'-GAA CAG GAG TCT GTG GAC CG-3'
ATF6 humano	<i>forward</i>	5'-ATG TCT CCC CTT TCC TTA TAT GGT-3'
	<i>reverse</i>	5'-AAG GCT TGG GCT GAA TTG AA-3'
CHOP rata	<i>forward</i>	5'- AAG ATG AGC GGG TGG CAG CG-3'
	<i>reverse</i>	5'-CCG GTT TCT GCT TTC AGG TGT GGT-3'
CHOP humano	<i>forward</i>	5'-AGG GAG AAC CAG GAA ACG GAA ACA-3'
	<i>reverse</i>	5'-TCC TGC TTG AGC CGT TCA TTC TCT-3'
Ciclofilina rata	<i>forward</i>	5'- CTT CGA GCT GTT TGC AGA CAA -3'
	<i>reverse</i>	5'- AAG TCA CCA CCC TGG CAC ATG-3'
Ciclofilina humano	<i>forward</i>	5'-TTC ATC TGC ACT GCC AAG AC-3'
	<i>reverse</i>	5'-TCG AGT TGT CCA CAG TAG C-3'
GADD34 humano	<i>forward</i>	5'-CTA GGC TGC CCC TCC GAC-3'
	<i>reverse</i>	5'-CTC GGA GAA GCG CAC CTT TCT G-3'
GRP78 rata	<i>forward</i>	5'-CTA CGA AGG TGA ACG ACC CC-3'
	<i>reverse</i>	5'-ATT TCT TCA GGG GTC AGG CG-3'
PUMA humano	<i>forward</i>	5'-GAC GAC CTC AAC GCA CAG TA-3'
	<i>reverse</i>	5'-AGG AGT CCC ATG ATGA GAT TGT-3'
SCD1 humano	<i>forward</i>	5'-CCG ACG TGG CTT TTT CTT C-3'
	<i>reverse</i>	5'-CCT CCT CTG GAA CAT CAC CA-3'

Tabla 2. Lista de pares de *primers* de rata y de humano adquiridos.

Por otro lado, los *primers* diseñados por nosotros (utilizando herramientas bioinformáticas del NCBI) para amplificar genes de humano y de rata (tabla 2) fueron sintetizados por la empresa Invitrogen. Una vez los *primers* fueron recibidos en los laboratorios del grupo Nutrigenómica, se procedió a su validación (figura 16). Para el proceso de validación se amplifica cDNA por PCR clásica usando *primers* específicos y, DNA polimerasa, dNTPs y otros componentes necesarios para la realización de la PCR (PCR Master Mix 2X (Fermentas)). Después, se separa el producto amplificado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Finalmente, se tiñe el gel con bromuro de etidio (EtBr), se revela la imagen en el captador MiniBis Imaging Systems (DNR Bio-Imaging Systems Ltd) tras encender la lámpara de luz UV y se comprueba que el producto amplificado (amplicón) tiene la longitud esperada. En la PCR, además del

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

control positivo (cDNA) es conveniente cargar dos controles negativos para descartar contaminaciones: un NAC y un NTC (*No Template Control*). El NTC lleva todos los componentes de la reacción de la PCR excepto el cDNA y sirve para descartar contaminaciones en los componentes de la mix de la PCR.



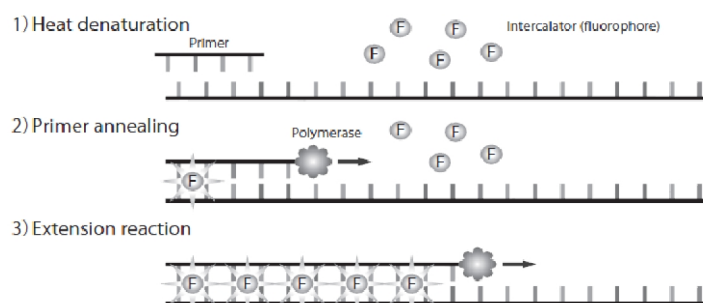
**Figura 16. Validación de *primers* de ciclofilina (gen humano).** La longitud del amplicón de PPIA es de 158 pb; tal y como se esperaba, la banda correspondiente a este amplicón aparece por debajo del marcador molecular de 250 pb. Los carriles de la izquierda (en azul) representan que el tratamiento con DNasa es efectivo para eliminar el DNA genómico (en la banda de NAC no aparece banda). En cambio, en los carriles de la derecha (en amarillo), el RNA no fue tratado con dicho tratamiento y aparece banda en NAC.

### 3.7 PCR cuantitativa a tiempo real

La PCR cuantitativa a tiempo real es una técnica que permite cuantificar la cantidad de amplicones (productos de amplificación) producidos por la DNA polimerasa durante cada ciclo de amplificación usando tecnología basada en la fluorescencia.

A diferencia de la PCR de punto final (PCR clásica o convencional), en la cual el amplicón es medido una vez la amplificación del DNA ha sido completada, la PCR cuantitativa mide la amplificación de la diana al principio de la reacción, en concreto, en la fase exponencial. En este momento, en teoría, la cantidad de DNA producido en la reacción es el doble en cada ciclo como consecuencia de que los componentes de la PCR están en exceso en comparación con la secuencia diana.

Cada ciclo de amplificación se divide en tres etapas de diferente temperatura (Figura 17): el DNA de doble cadena es desnaturalizado mediante calor (etapa de desnaturalización), los dos *primers* complementarios al fragmento diana son hibridados a baja temperatura (etapa de hibridación), y los *primers* hibridados son entonces extendidos por la polimerasa a una temperatura intermedia (etapa de extensión).



**Figura 17. El SYBR green durante la amplificación por PCR de un fragmento de DNA molde.** La figura muestra las diferentes etapas que conforman un ciclo de amplificación de la PCR: desnaturalización, hibridación de los *primers* y extensión. El SYBR green está representado en forma de círculos en cuyo interior hay una F (fluorocromo).

Para detectar el producto de amplificación de la PCR cuantitativa a tiempo real se ha utilizado el fluorocromo, SYBR Green I de *SYBR Premix Ex Taq* (Takara), que se intercala en el DNA y emite fluorescencia una vez unido a una doble cadena de DNA (dsDNA) (figura 17). De este modo, a medida que aumenta la cantidad de dsDNA en la reacción, se producirá un correspondiente incremento en la señal fluorescente. La inespecificidad del SYBR Green implica que no se puedan distinguir los diferentes productos de dsDNA, y por eso es importante optimizar las reacciones de PCR para asegurar la presencia de un solo amplicón (por ejemplo, controlando que no haya DNA genómico en las muestras), o de otros métodos utilizados para distinguir entre diferentes productos (por ejemplo, análisis curvas de disociación).

El uso de PCR cuantitativa a tiempo real ofrece varias ventajas sobre otros métodos utilizados para medir la expresión génica (por ejemplo, Northern Blot) incluyendo la reducida cantidad de muestra necesaria para el análisis, la capacidad de reproducir datos de forma rápida y precisa y, la capacidad de analizar más de un gen a la vez (62).

En esta tesis, se ha utilizado la PCR cuantitativa a tiempo real como herramienta para estudiar la expresión relativa de los genes humanos CHOP, ATF6, ATF4, SCD1, GADD34 y PUMA y, los genes de rata CHOP, ATF4, ATF6 y GRP78.

Antes de empezar a preparar la PCR a tiempo real, es necesario diluir el cDNA de las muestras. El instrumento utilizado para realizar la PCR a tiempo real ha sido CFX96 Real-Time PCR Detection System (BIORAD, Inc.). El fabricante, BIORAD, recomienda

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

utilizar cantidades de cDNA comprendidas entre 50 ng y 50 fg del RNA total en la PCR a tiempo real.

Como teníamos 1 µg RNA en 21 µL de solución, la concentración de cDNA que se ha obtenido como producto de la retrotranscripción es de 476 ng/µL:

$$[RNA] = \frac{1\mu g}{21\mu L} = \frac{0,0476\mu g}{\mu L} \approx 476 \text{ ng}/\mu L$$

Si se realiza una dilución 1/10 del producto de la retrotranscripción, tendremos una solución de cDNA con una concentración de aproximadamente 5ng/µL y, de este modo, se dispondrá de material de partida suficiente para trabajar dentro del rango recomendado por BIORAD.

A continuación, se prepara un mix con los *primers* de los genes que se quieren estudiar y con los componentes del kit SYBR Premix Ex Taq (Takara). Puede haber uno o más genes de estudio y obligatoriamente un gen de referencia o *housekeeping*. En esta tesis se ha utilizado la ciclofilina de rata y de humano como genes de referencia para los estudios en ratas y para los estudios *in vitro* en HepG2, respectivamente, pues se ha comprobado que la ciclofilina no presenta diferencias significativas entre tratamientos.

Los detalles de la preparación de la mix para cada gen de estudio son mostrados en la tabla siguiente (tabla 3):

Reactivo	Volumen	Concentración final
SYBR® Premix Ex Taq (2X)	12.5 µL	1X
Primer PCR Forward (10 µM)	0.5 µL	0.2 µM
Primer PCR Reverse (10 µM)	0.5 µL	0.2 µM
H <sub>2</sub> O destilada estéril	9.5 µL	
Volumen total	23 µL	

Tabla 3: Preparación de la mix para la PCR cuantitativa.

Para descartar cualquier contaminación se utilizaran los controles negativos NAC y NTC. Las muestras de cDNA se cargan por triplicado y, también se utiliza un NAC y un NTC por cada mix de cada gen. En base a esto, se realizan los cálculos pertinentes para preparar un exceso de mix (aproximadamente un 15% más) para cada gen para asegurarnos que no nos quedaremos sin volumen.

Posteriormente, se pipetea 23  $\mu\text{L}$  de esta mix preparada para analizar el gen que corresponda en una placa de PCR de 96 pozos. Después, se añaden 2  $\mu\text{L}$  de muestra de cDNA, NAC y NTC ( $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril) en los pozos correspondientes. Se tapa la placa con un adhesivo transparente y se realiza un pulso de centrifugación. Se coloca la placa dentro de CFX96 Real-Time PCR Detection System y se utiliza el protocolo de amplificación detallado a continuación (tabla 4):

	Pasos	Temperatura	Tiempo	Detección
	Etapa inicial	50 °C	2 min	OFF
	Desnaturalización inicial del DNA y activación de la polimerasa	95 °C	15 s	OFF
40 ciclos	Desnaturalización del DNA	95 °C	15 s	OFF
	Hibridación	60 °C	1 min	OFF
	Extensión	72 °C	1 min	ON
	Curva de disociación			ON

Tabla 4. Protocolo de amplificación de la PCR cuantitativa a tiempo real.

El resultado de la PCR cuantitativa a tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación (figura 18). En él se representa la fluorescencia detectada por el aparato (durante la etapa de 72 °C) respecto al número de ciclos. Además en este gráfico se establece un valor de fluorescencia umbral, representado con una línea horizontal (línea umbral), que señala la zona de aumento exponencial. El punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral se denomina ciclo umbral, Ct (*Threshold cycle*). El Ct indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral y es calculado automáticamente para cada pozo por el software CFX Manager. Cuanto más cDNA tenga una muestra antes se alcanza este valor, pues será menor el número de ciclos (Ct menor) necesarios para ello.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

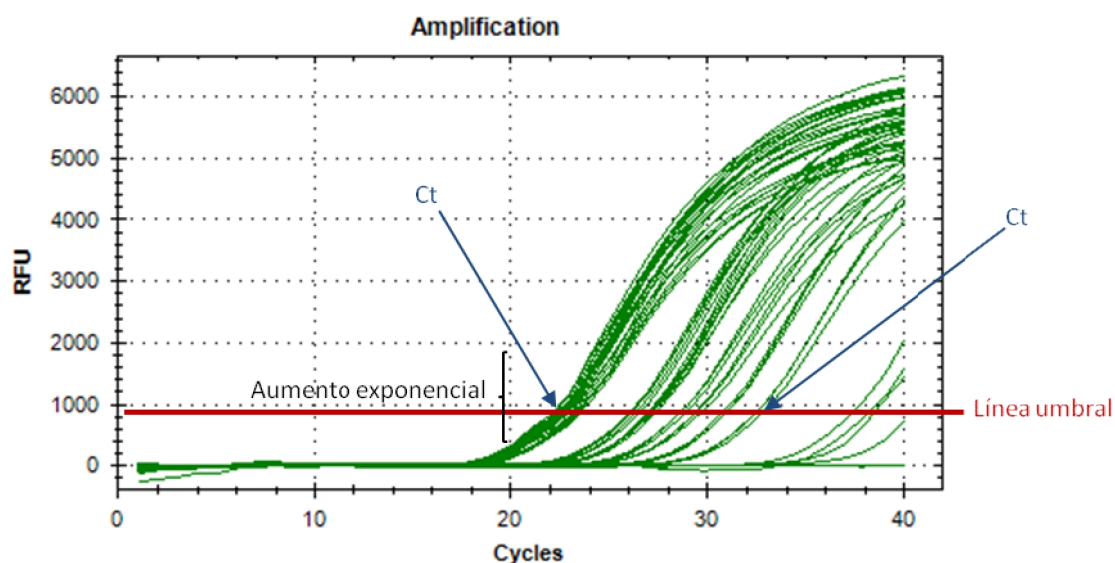


Figura 18. Gráfico de amplificación de una PCR cuantitativa a tiempo real.

Una vez conocidos estos valores de Ct ya se pueden calcular los niveles expresión relativa de los genes diana para cada tratamiento usando el mRNA de la ciclofilina como control interno de acuerdo con el método 2 delta-delta Ct. En el tabla 5 se muestra un ejemplo de cálculo de la expresión relativa de cada gen:

	Ct ATF4	Promedio	Desviación Estándar	Ct ciclofilina	Promedio	Desviación Estándar	$\Delta Ct$	$\Delta \Delta Ct$	$2^{-\Delta \Delta Ct}$
<b>Control</b>	26.14	26.18	0.06	21.74	21.63	0.12	4.55	0	1
	26.25			21.51					
	26.15			21.63					
<b>100<math>\mu</math>M RSV</b>	25.3	25.11	0.37	22.43	22.44	0.15	2.67	-1.88	3.68
	25.35			22.59					
	24.68			22.29					

Tabla 5. Ejemplo de cuantificación de la expresión relativa de cada gen. Se realizaron los siguientes cálculos:  $\Delta Ct$  = promedio Ct ATF4 (gen problema) – promedio Ct ciclofilina (gen de referencia);  $\Delta \Delta Ct$  =  $\Delta Ct$  tratamiento – promedio  $\Delta Ct$  controles; y  $2^{-\Delta \Delta Ct}$ : valor de la expresión realtiva del gen ATF4.

Para asegurar que los datos generados en la PCR son fiables, el investigador debe de realizar un control de calidad de todo el proceso llevado a cabo tanto antes como después de la realización de la PCR. La incorporación de controles negativos (NAC y NTC) en la PCR y la validación de los *primers* diseñados mediante la evaluación por electroforesis en gel de agarosa del tamaño del amplicón producido por PCR clásica (comentado previamente) forman parte de este control de calidad. Pero también es importante determinar la eficiencia de amplificación de nuestros *primers* para poder

realizar comparaciones válidas entre muestras diferentes y evaluar las curvas de disociación generadas después de haber realizado la PCR a tiempo real para distinguir los amplicones de los dímeros de *primers*.

La razón fundamental para llevar a cabo una evaluación de la eficiencia de amplificación es que no todos los conjuntos de *primers* son igual de eficientes en la amplificación. En una reacción óptima de PCR (100 % de eficiencia), cada amplicón será replicado y la cantidad de producto será el doble en cada ciclo. Sin embargo, si la reacción no es eficiente, la cantidad de producto producido no se doblará en cada ciclo y la pendiente del gráfico de la cantidad de producto respecto al número de ciclo será menor que el mismo gráfico asumiendo un 100 % de eficiencia. Por tanto, es importante tener en consideración la eficiencia para no cometer errores en el cálculo de la cantidad de secuencia diana presente en la muestra. Para determinar la eficiencia de un conjunto de *primers* es necesario realizar una PCR a tiempo real de una batería de diluciones de cDNA molde. En teoría, si la eficiencia de la reacción es óptima, cada vez que se diluye una muestra 10 veces el valor de Ct aumenta aproximadamente 3.3 ciclos. La representación de los valores Ct respecto al logaritmo de la concentración de cDNA genera un gráfico cuya pendiente está relacionada con la eficiencia de la reacción (figura 19). La eficiencia de amplificación se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$E = 10^{(-1/pendiente)} - 1$$

donde  $E$  es la eficiencia de la reacción y la *pendiente* se refiere a la pendiente del gráfico que representa el valor de Ct vs la cantidad de cDNA. Una pendiente entre -3.6 a -3.1 corresponde a una eficiencia entre 90 y el 110 % (ejemplo,  $E=0.9-1.1$ ). Se consideran aceptables eficiencias comprendidas entre estos dos porcentajes.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

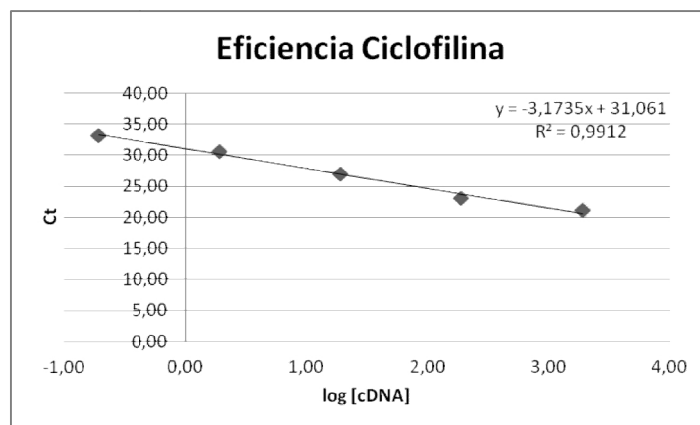


Figura 19. Eficiencia de los *primers* de ciclofilina.

Por otro lado, la lectura de la fluorescencia durante la etapa de disociación permite analizar la temperatura de disociación o de *melting* ( $T_m$ ) de los fragmentos de DNA en función de su tamaño, siendo la  $T_m$  la temperatura a la cual dsDNA se desnaturaliza. En la etapa de disociación se van realizando medidas de fluorescencia a medida que se va aumentando paulatinamente la temperatura de los productos de la reacción (por ejemplo, de 60 a 95°C). Cuando se alcanza la  $T_m$  de un determinado dsDNA, se produce una rápida disminución de la fluorescencia en un corto periodo de tiempo. Esto es detectado por el instrumento y es representado en un gráfico como el diferencial negativo de la fluorescencia respecto a la temperatura, en el cual se pueden observar uno o más picos centrados en diferentes temperaturas. Los diferentes amplicones pueden generar diferentes picos centrados en temperaturas diferentes y, afortunadamente, los artefactos de la PCR como los dímeros de *primers* normalmente poseen  $T_m$  más bajas que los amplicones diana (62) (figura 20).

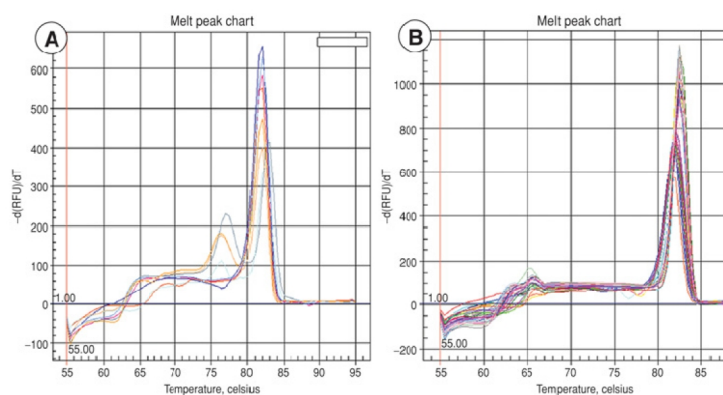


Figura 20. Análisis de las curvas de disociación. El gráfico A muestra dos picos. Los picos más bajos representan fragmentos de DNA que se desnaturalizan a temperaturas más bajas y probablemente corresponden a dímeros de *primers*. El gráfico B representa curvas de disociación con un simple pico a unas temperaturas más altas que en el caso anterior. Esto significa que un solo producto de PCR es detectado por muestra.

## 3.8 Análisis del splicing del mRNA de XBP1

La activación de IRE1 provoca el splicing alternativo del mRNA de XBP1, el cual puede dar lugar a dos transcritos diferentes: la forma no procesada (XBP1u) y la forma procesada de XBP1 (XBP1s). XBP1s es un potente factor de transcripción que estimula la expresión de GRP78/BiP. La expresión del mRNA de XBP1 es potenciada por ATF6. De este modo, se cree que es un marcador importante ya que refleja la señalización de las vías IRE1 y ATF6 en respuesta a estrés de RE.

### 3.8.1 Protocolo splicing XBP1 para células humanas (células HepG2)

Para este ensayo, mediante PCR se amplifica el cDNA de XBP1 usando primers específicos para humano del transcrito de XBP1 (*forward*: 5'-GCT GAA GAG GAG GCG GAA G-3'; *reverse*: 5'-GTC CAG AAT GCC CAA CAG G-3'). Estos primers son útiles para capturar XBP1s (amplicón de 172 pb) al igual que XBP1u (amplicón de 197 pb). Las condiciones de la PCR utilizadas comprendieron una etapa inicial de 50°C durante 2 min, seguida por una etapa de activación de la polimerasa de 95°C durante 10 min y una etapa de ciclos con las siguientes condiciones: 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, hibridación a 54°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 30 s. También se llevó a cabo una extensión final a 72°C durante 10 min. Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 4% (disuelto en tampón TAE 1x) durante 280 min y, posteriormente, se procedió a la tinción del gel con EtBr.

### 3.8.2 Protocolo splicing XBP1 para células hepáticas de rata

Se ha usado el protocolo utilizado por Lim *et al.* 2011 (63). Mediante PCR se amplifica el cDNA de XBP1 usando primers específicos para rata del transcrito de XBP1 (*forward*: 5'-AAA CAG AGT AGC AGC ACA GAC TGC-3'; *reverse*: 5'-TCC TTC TGG GTA GAC CTC TGG GAG -3'). Estos primers son útiles para capturar XBP1s (amplicón de 428 pb) al igual que XBP1u (amplicón de 473 pb). Se utilizó el programa de PCR detallado a continuación: una etapa inicial de activación de la polimerasa de 94°C durante 4 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 s, hibridación a 62°C durante 30 s, y extensión a 72°C durante 30s. También se llevó a cabo una extensión final a 72°C durante 10 min. Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en gel de

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

agarosa al 3 % (disuelto en tampón TAE 1X) y, posteriormente, se procedió a la tinción de este gel con EtBr.

## 3.9 Tinción Oil Red O

La tinción de Oil Red O ha sido utilizada para evaluar la acumulación de triglicéridos en las muestras de HepG2. Esta metodología se fundamenta en que el colorante Oil Red O es poco soluble en el solvente (agua). Antes de su uso, la solución stock Oil Red O es diluida en agua. El colorante Oil Red O, debido a su liposolubilidad, se mueve de la solución hacia los lípidos tiñendo las vacuolas lipídicas de las células en color rojo.

Antes de empezar con el procedimiento se prepara una solución 5 mg/mL de oil red O disuelta en isopropanol que se denomina solución stock de Oil Red.

Las células HepG2 son cultivadas en placas de 12 pozos. Después de la incubación con los tratamientos, se lavan las placas dos veces con PBS 1X y, a continuación, las células son fijadas con 10% formaldehído durante 15 min a temperatura ambiente. Después de la fijación, las células son teñidas con una solución de trabajo oil red O (60% solución stock oil red O + 40% agua destilada), filtrada en papel Whatman (nº1), durante 45 min a temperatura ambiente. Se lavan las células dos veces con PBS 1X para eliminar el exceso de color y posibles precipitados y, se visualiza la placa bajo el microscopio (objetivo 10x). Después del examen microscópico, se cuantifica la cantidad de triglicéridos que hay en cada pozo. Para ello, se añade isopropanol (200 µL/pozo) a las placas teñidas con el colorante oil red O. A continuación, se agitan las placas durante 5 min para que las células liberen el colorante de su interior. Con una micropipeta se recupera el colorante extraído de cada pozo en un eppendorf diferente (previamente rotulado). Se añaden 50 µL de cada eppendorf en un pozo de placa de 96 pozos (se hace triplicado de muestra) y su absorbancia es leída espectrofotométricamente a una longitud de onda de 510 nm.

## 3.10 Medida de la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS)

La formación intracelular de ROS fue detectada usando la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DCFH-DA). El DCFH-DA difunde hacia el interior de las

células y es hidrolizado enzimáticamente por esterasas intracelulares produciéndose una molécula no fluorescente llamada DCFH (2',7'-diclorofluorescina). En presencia de sustancias oxidantes generadoras de ROS, la DCFH es oxidada hasta DCF (2',7'-diclorofluoresceína), la cual es capaz de emitir fluorescencia (64).

Se cultivaron las células HepG2 hasta un 70-80% de confluencia en placas negras de poliestireno de 96 pozos. A continuación, fueron pre-incubadas con o sin 25  $\mu$ M RSV en medio libre de suero durante 28 h. Antes del co-tratamiento palmitato (agente oxidante) + RSV durante 8h, las células fueron incubadas con DCFH-DA (concentración final de 20  $\mu$ M) a 37°C durante 30 min en oscuridad (el DCFH-DA puede fotooxidarse). Para analizar la fluorescencia se usó un lector de placas (FLx800TBID, Biotek Instruments) usando longitudes de onda de excitación y emisión de 475 nm y 525 nm, respectivamente. La producción de ROS fue expresada como unidades relativas de fluorescencia (URF).

### 3.11 Extracción de proteínas totales

Se prepara una solución madre de tampón RIPA. Para preparar 20 mL de "tampón RIPA madre" se añaden: 10 mL 100 mM Tris-Cl pH 7.4, 300 mM NaCl, 2 mL 10 % NP40 en agua MQ, 7.30 mL agua y 0.5 mL 10 % Deoxicolato sódico en agua. Esta solución madre puede ser alicuotada y almacenada a -20°C para su posterior uso. En caso de quererla utilizar inmediatamente, se mantiene a 4°C. Justo antes de su uso, es suplementada con los siguientes componentes: 1/100 PMSF (disuelto en 0.1M en etanol), 1/1000 Cocktail Inhibidor de Proteasas, 1/100 Cocktail 2 de Inhibidores de Fosfatasas y 1/100 Cocktail 3 de Inhibidores de Fosfatasas 3. A esta solución recién preparada se le ha denominado "tampón RIPA suplementado".

#### 3.11.1 Extracción de proteínas de cultivo celular

Una vez las células han llegado a una confluencia aproximadamente del 80-90% en placas de cultivo de 12 pozos, se retira el medio de cultivo y se aclara la monocapa de células con PBS 1X a temperatura ambiente. A partir de este momento, todas las etapas deben de ser realizadas en hielo o a 4°C usando tampones fríos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Añadir 200  $\mu$ L de tampón RIPA suplementado en cada uno de los pozos de la placa. Agitar suavemente en un agitador automático durante 15 minutos, a 4°C. Retirar las células adherentes de la placa con la ayuda de una punta azul de micropipeta de 100-1000  $\mu$ L. Transferir el lisado resultante a un tubo Eppendorf. Pasar el contenido del tubo eppendorf por una jeringuilla con aguja del calibre 21.

El lisado celular se centrifuga a 10000 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante es el lisado celular total. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. Este es el lisado celular entero con el que se trabaja posteriormente.

#### 3.11.2 Extracción de proteínas de muestra de tejido

Recuperar las muestras que están almacenadas a -80°C y poner los tubos en nitrógeno líquido ( $N_{2(l)}$ ). Con antelación, tener preparado en la balanza: papel de aluminio, cuchilla de bisturí, pinzas, un vaso de precipitados con agua y papel de laboratorio. Sacar el trozo de tejido del tubo eppendorf dónde está contenido y una vez esté un poco descongelado, cortar tejido hasta llegar a pesar 100 mg de tejido, pasarlo a un tubo nuevo de 2 mL y guardar en hielo. Limpiar el bisturí cada vez que se cambie de muestra. A continuación, añadir 300  $\mu$ L de tampón RIPA suplementado a cada tubo de 2 mL con tejido pesado.

Homogeneizar el tejido con homogeneizador ultraturax, manteniendo la temperatura a 4°C durante todo el proceso, hasta que no se vean grumos. Incubar en hielo durante 30 minutos.

Centrifugar a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Este es el lisado celular entero con el que se trabaja posteriormente.

#### 3.12 Determinación de la concentración proteica

Se ha utilizado el kit BCA (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit) para la cuantificación proteica de las muestras. En primer lugar, se procede a la extracción de proteínas haciendo uso de uno de los dos protocolos descritos anteriormente. A continuación, se prepara una batería de soluciones de proteína patrón (BSA): 0, 0.250, 0.500, 0.750, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2 y 2.5 mg/mL. Se hace triplicado de cada punto de la

recta patrón, de la muestra y del tampón de lisis utilizado en la extracción proteica (RIPA suplementado) el cual es utilizado como blanco. Todas estas soluciones se cargan en una placa de ELISA de 96 pocillos. En caso de querer cuantificar proteína de muestra de tejido, se debe realizar una dilución 1/20 de las muestras de proteína y del blanco antes de cargar en la placa mientras que los lisados celulares procedentes de cultivo celular pueden ser cargados directamente. En la placa se añadirán 10  $\mu\text{L}$  muestra/patrón/blanco y 200  $\mu\text{L}$  de mezcla BCA, teniendo en cuenta que los reactivos del kit BCA, A y B deben mezclarse en proporción 50:1 (mezcla BCA). Se deja reposar 30 min a 37°C en una estufa. Posteriormente, se lee la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro. Finalmente, se extrapolan los valores de concentración de las muestras a partir de la recta calculada. En caso de cuantificar muestras de tejido hay que corregir por el factor de dilución para conocer la concentración de proteína de cada muestra.

Una vez determinada la concentración para todas las muestras de proteína, estas pueden ser congeladas a -20°C o -80°C para su posterior uso.

### **3.13 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS)**

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, del inglés *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) es una técnica utilizada para la separación de proteínas. Los geles de poliacrilamida (PA) son estables en un amplio intervalo de valores de pH, temperatura y fuerza iónica. La PA se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bisacrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por el persulfato de amonio y el TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina). Los geles de PA pueden prepararse con tamaños de poro muy variado, en función del tamaño de las proteínas a separar. De este modo, para resolver una proteína de bajo peso molecular es conveniente usar un gel con un alto porcentaje de acrilamida porque da lugar a un tamaño de poro (grado de reticulación) reducido y viceversa. Además, en esta electroforesis se utiliza detergente SDS para trabajar en condiciones desnaturizantes por ello recibe el nombre de PAGE-SDS. Mediante la aplicación de calor, este detergente aniónico se une a las proteínas para formar complejos desnaturizados, cargados negativamente. Los complejos SDS-proteína se separan según su tamaño molecular y, así, es posible estimar su masa molecular (65).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se han preparado dos tipos de geles de PA: un gel de empaquetamiento (*staging*) y uno de separación (*resolving*) (tabla 6). El gel de empaquetamiento tiene un menor porcentaje de acrilamida y por tanto tiene un poro mayor. Este gel sirve para alinear las proteínas de la muestra antes de ser separadas. En cambio, el gel separación tiene un porcentaje de acrilamida mayor (entre 6 y 15%, según el rango de resolución que se quiera obtener) que permite la separación de las proteínas por su peso molecular.

Gel separador			Gel de empaquetamiento	
1 gel	10 %	15 %	1 gel	4 %
<b>Acrilamida 30%</b>	2.5 mL	5 mL	<b>Acrilamida 30%</b>	1.61 mL
<b>Tampón LS (Tris-HCl 1,5 M pH 8.8)</b>	3.3 mL	2.5 mL	<b>Tampón MS (Tris-HCl 0,5 M pH 6.8)</b>	2.52 mL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4 mL	2.30 mL	<b>H<sub>2</sub>O</b>	7.22 mL
<b>SDS (10 %)</b>	200 µL	100 µL	<b>SDS (10 %)</b>	100 µL
<b>Persulfato amónico</b>	100 µL	50 µL	<b>Persulfato amónico</b>	100 µL
<b>TEMED</b>	10 µL	5 µL	<b>TEMED</b>	20 µL

Tabla 6. Tampones utilizados para la elaboración del gel separador y gel de empaquetamiento. Para la preparación de un gel son necesarios los volúmenes indicados.

Para la realización de los geles hay que colocar el vidrio corto por delante del vidrio espaciador de 1.5 mm (Biorad) e inmediatamente fijar ambos vidrios en el soporte de manera que el vidrio corto mire hacia delante. Se añade el gel separador entre los vidrios hasta un nivel un poco inferior a la zona verde del marco. A continuación se introduce 1 mL de metanol al 20% para eliminar el posible O<sub>2</sub> y se deja solidificar 45 min. Cuando el gel separador ya ha polimerizado, se retira el metanol al 20% y se seca entre ambos vidrios con un trozo de papel de filtro. Por último, se introduce el gel de empaquetamiento, se coloca un peine (de 10 o 15 pozos) desde un extremo y se deja polimerizar unos 30 min. Por último, es conveniente observar que no haya ninguna imperfección en el gel. Se puede guardar el gel envuelto con un poco de papel de laboratorio humedecido y en papel de aluminio O/N a 4°C.

Una vez realizada la determinación de la concentración proteica de las muestras mediante el método del kit BCA, se calcula el volumen de muestra necesario para cargar posteriormente en la electroforesis entre 20-40 µg de proteína de lisado procedente de cultivo celular o 100 µg de proteína de extracto de tejido. Las muestras se disuelven en tampón de carga (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2% (p/v) SDS, 5 %

(v/v) 2-β-mercaptoetanol, 0.005% azul de bromofenol) y son desnaturalizadas por ebullición a 95-100°C durante 5 min para facilitar la unión del SDS a las proteínas. Entonces, las muestras son separadas por electroforesis en geles de acrilamida al 15% (para western blotting de caspasa-3 procesada) o 10% (para western blotting de SCD1). Se reserva un pozo para cargar el marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat. No.: SM0671.Fermentas) para poder: monitorizar el progreso de la electroforesis y, también, estimar del peso molecular de las bandas de las proteínas que se detecten al final del Western Blotting. La electroforesis se realiza en tampón de electroforesis o *running buffer* 1X (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1 % SDS, pH8.3) a un voltaje constante de 90 V para separar proteínas en el gel de acrilamida al 15 % y 110 V para la electroforesis en geles del 10% acrilamida.

### 3.14 Western blotting

La transferencia de proteínas desde un gel a una membrana se denomina Western blotting. Las proteínas en el gel no están accesibles, mientras que en la membrana pueden interactuar con moléculas específicas (anticuerpos) que permitan su identificación. El Western blotting consta de cuatro fases: transferencia, bloqueo de la membrana, unión del ligando y detección (65).

Después de la electroforesis, se realiza la transferencia. En primer lugar, se activa la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, *polyvinylidene difluoride*) (Amershan Biosciences, GE Healthcare) con metanol al 100% durante 5 min. A continuación, se añade un poco de volumen de tampón de transferencia 1X (25 mM Tris, 192 mM glicina, pH 8.3 y metanol al 20% (v/v)) en una bandeja. Dentro de ésta se introduce un *cassette* abierto de un equipo de trans blot (Biorad) y se van colocando los siguientes elementos ordenados (figura 21): una esponja, 2 papeles Whatman, el gel, la membrana (con una muesca a un lado para conocer el orden de carga de las muestras), 2 papeles Whatman y una esponja. Se pasa un bolígrafo (emulando un rodillo) por encima del sándwich para quitar las posibles burbujas que pueda en su interior y se cierra el *cassette*. Entonces se traslada el *cassette* al módulo que contiene los electrodos (fijándose bien en que la colocación sea la correcta), se pone una placa de hielo en un lado, se llena la cubeta hasta que cubra el *cassette* y se coloca la tapa.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se mueve todo el aparato de trans blot a un porexpan con hielo y, seguidamente, se aplica un campo eléctrico de intensidad constante de 300 mA durante 2 h para que las proteínas migren desde el gel a la membrana de PVDF. La transferencia de los marcadores de peso molecular preteñidos a la membrana indica que la transferencia probablemente se ha realizado de forma correcta.

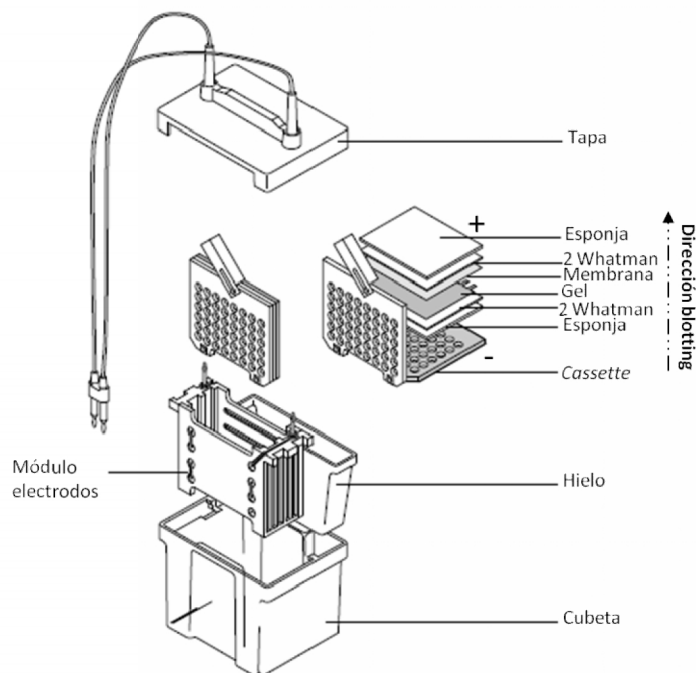


Figura 21. Transferencia electroforética.

La superficie de la membrana no ocupada por las proteínas se bloquea con tampón de bloqueo durante 1 h, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. El tampón de bloqueo utilizado ha sido leche en polvo desnatada (5%, p/v) disuelta en TBS-T (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH8.0 y 0.1% (v/v) Tween20). También los anticuerpos primarios y secundarios son diluidos en TBS-T al 5% de leche. Después, las membranas son incubadas *overnight* con anticuerpo primario contra: eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ -P, caspasa-3 procesada, SCD1, actina o tubulina (tabla 7). Los blots son lavados 4 veces durante 10 minutos con tampón TBS-T. A continuación, la membrana es incubada con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) durante 1 h a temperatura ambiente. En los casos en los que el anticuerpo primario es un monoclonal de conejo (todos los mencionados excepto el primario anti-SCD1), usamos como secundario un anti-rabbit (NA934V; Amersham Biosciences) diluido 1:10000 en TBS-T al 5% de leche. Para anti-SCD1, el anticuerpo secundario es un anti-mouse (NIF825; Amersham

Biosciences) diluido 1:5000 en el mismo tampón. Se realizan 3 lavados de 10 minutos con tampón TBS-T. Inmediatamente, se lleva a cabo el revelado y la detección por quimioluminiscencia. En presencia de peróxido de hidrógeno, la HRP oxida un compuesto fluorescente (luminol) que origina un producto en estado excitado llamado 3-aminofalato, que al pasar a un estado de energía menor, emite fotones de luz que es detectado en un captador de imágenes. En nuestro caso se ha utilizado el kit de sustrato quimioluminiscente (ECL plus; Amersham Biosciences, GE Healthcare). Se añaden 2 mL de la mezcla A + B del kit (2 mL A + 50  $\mu$ L B) sobre una membrana, se protege de la luz y se dejan transcurrir 5 min hasta la realización del revelado. Las imágenes digitales son tomadas con un sistema GBOX Chemi XL 1.4 (Syngene), el cual permite la cuantificación de la intensidad de las bandas. La carga proteica fue monitorizada vía la inmunodetección de actina o tubulina.

Proteína	Anticuerpo	Especificidad	Casa comercial	Referencia	Dilución	Peso molecular (kDa)
Actina	Policlonal de conejo	Humano, ratón, rata.	Sigma	A2066	1/1000	42
Caspasa-3 procesada	Policlonal de conejo	Humano, ratón, rata, mono.	Cell Signal	Asp175; 5A1E	1/750	12, 17 y 19
eIF2 $\alpha$ -P	Policlonal de conejo	Humano, ratón, rata.	Santa Cruz Biotech.	sc-101670	1/500	38
eIF2 $\alpha$	Policlonal de conejo	Humano, ratón, rata, equino, canino, bovino, porcino.	Santa Cruz Biotech.	sc-11386	1/1000	36
SCD1	Policlonal de ratón	Humano, ratón, rata.	Abcam	Ab19862	1/1000	37
Tubulina	Policlonal de conejo	Humano, ratón, aviar.	Sigma	T3526	1/1000	55

Tabla 7. Anticuerpos empleados en los Western blots.

### 3.15 Análisis estadístico

Los datos han sido evaluados mediante T-Student o ANOVA de un factor para identificar diferencias estadísticas entre controles y tratamientos utilizando la versión 15 del programa estadístico SPSS. Se ha considerado que las diferencias son significativas cuando el valor de P ha sido menor que 0.05. Además, los resultados han sido presentados como la media  $\pm$  desviación estándar (SD) de al menos tres ensayos independientes para cada experimento.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

## ***4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

## 4.1 Estudios *In vivo*

### 4.1.1 Experimento crónico con GSPE y/o DHA en ratas alimentadas con dieta de cafetería (modelo de obesidad) durante 21 días.

#### Antecedentes

Se ha descrito con anterioridad que una dieta rica en AG saturados promueve la activación de la UPR y NAFLD *in vivo* (59). En cambio, los AGLs insaturados atenúan el estrés de RE y la muerte celular inducidas por AG saturados (66); en particular, se ha sugerido que los AG poliinsaturados omega-3 podrían mejorar el NAFLD en ratas genéticamente obesas (8) y en humanos (10,66). Por otro lado, se ha observado que algunos polifenoles reducen la acumulación lipídica *in vitro* e *in vivo* (58). Concretamente, el GSPE disminuye la expresión de algunas enzimas que participan en la lipogénesis (31). Debido a la interacción existente entre el estrés de RE y la regulación de la lipogénesis hepática (11), se planteó la posibilidad de que la capacidad del GSPE y el DHA para reducir la acumulación lipídica inducida por una dieta de cafetería podría ser mediada en parte por una disminución en la respuesta a estrés de RE en ratas.

Para comenzar se recordarán algunos de los detalles referentes al experimento crónico de animales (figura 11). Se trabajó con 6 grupos de ratas: Dieta control estándar (STD), Dieta control de cafetería (VEH -), Dieta control de cafetería y tratamiento (VEH +), Dieta de cafetería con 25 mg GSPE/Kg (GSPE), Dieta de cafetería con 500 mg DHA/Kg (DHA) y Dieta de cafetería con 25mg GSPE/Kg + 500 mg DHA/Kg (G + D). Durante dos meses se les administró agua y pienso estándar o dieta de cafetería *ad libitum*. Posteriormente, los animales alimentados con dieta de cafetería (modelo de obesidad) recibieron un tratamiento con GSPE y/o DHA haciendo servir como vehículo goma arábica durante 21 días.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

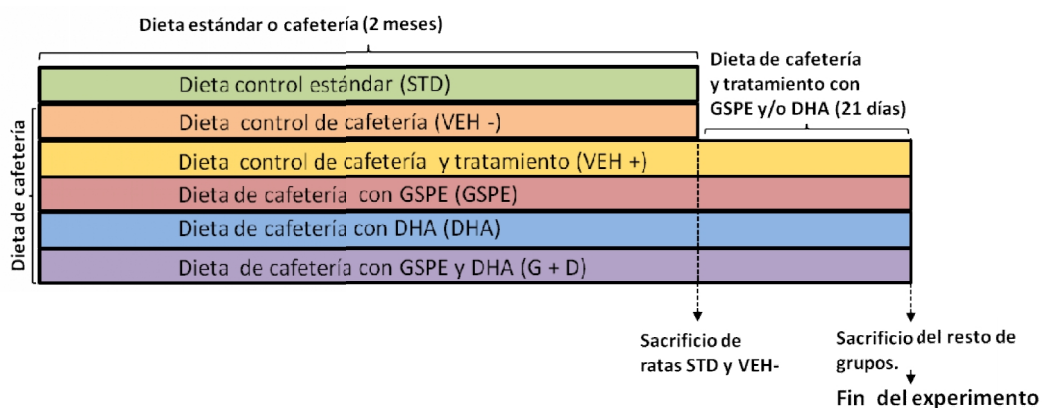


Figura 11. *Planning* del experimento crónico de animales.

## Resultados

Los tratamientos con DHA (500 mg /Kg) con o sin suplementación de GSPE (25 mg /Kg) disminuyeron el nivel de splicing de XBP1 en ratas con obesidad inducida por dieta de cafetería (figura **22a**). De hecho, el producto XBP1s en estos grupos de tratamiento es similar al de las ratas del grupo STD. En cambio, en el resto de animales sometidos a dietas de cafetería, los diferentes tratamientos (controles de cafetería y GSPE) mostraron un aumento del producto de splicing respecto al del grupo STD.

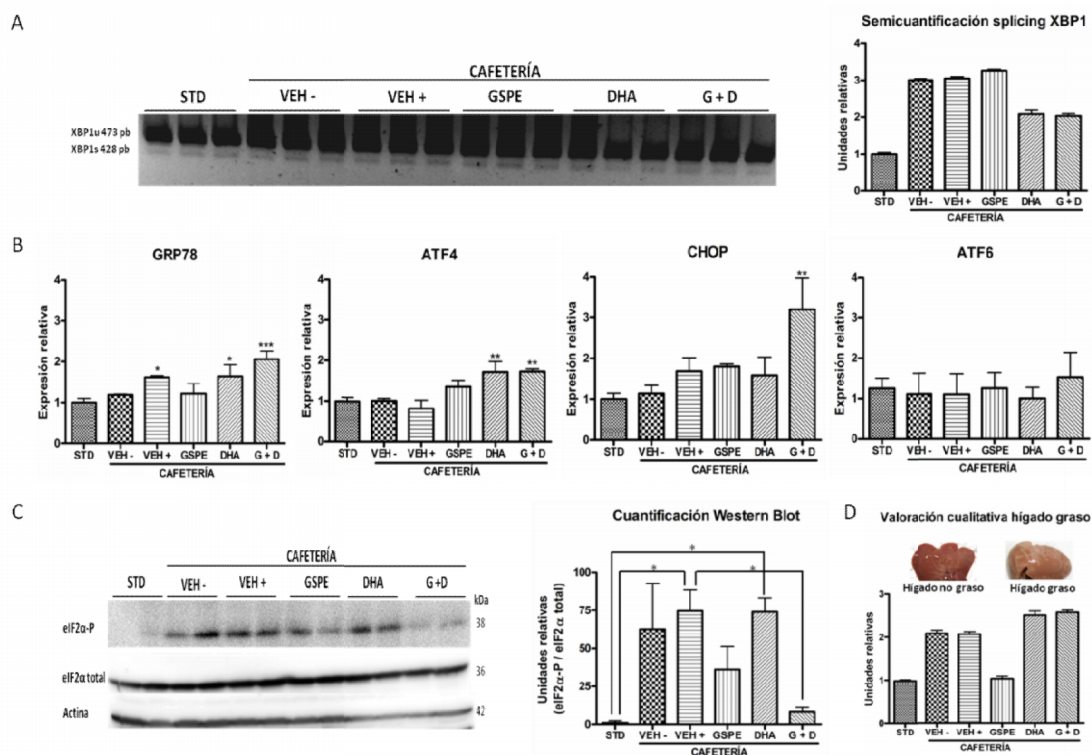
La expresión génica de ATF4 y GRP78 aumentó de manera significativa en las ratas de los grupos DHA y G + D respecto a las ratas del grupo STD (figura **22b**), mientras que la expresión de CHOP sólo se incrementó significativamente en el grupo G + D (expresión relativa  $3.20 \pm 0.78$  vs  $1.01 \pm 0.14$ ;  $P < 0.01$ ). También se observa un aumento de la expresión de ATF4 y CHOP en ratas del grupo GSPE con respecto a las ratas del grupo STD aunque no de manera significativa. En cambio, apenas aumentó la expresión génica de GRP78 en las ratas del grupo GSPE respecto al grupo STD. Por otro lado, no se apreciaron cambios significativos en la expresión de ATF6.

Las ratas pertenecientes a los grupos GSPE y G + D mostraron una disminución del marcador de estrés de RE, eIF2 $\alpha$ -P, respecto al grupo VEH + (figura **22c**). En cambio, el tratamiento con DHA no fue capaz de disminuir eIF2 $\alpha$ -P.

Una vez realizado el sacrificio se observó el aspecto del hígado de las ratas. Se realizó una valoración cualitativa del aspecto graso de dichos hígados asignándoles la

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

siguiente puntuación: 1 punto, hígado no graso; 2 puntos, hígado poco graso; 3 puntos, hígado graso; 4 puntos, hígado muy graso. Se observó la presencia de hígado graso en ratas de los grupos DHA y G + D, siendo más graso que en el de los grupos VEH - y VEH + (figura 22d). En cambio, el hígado de las ratas del grupo GSPE presentó un aspecto menos graso que el de los controles de cafetería.



**Figura 22. Efectos del GSPE y DHA sobre la respuesta a estrés de RE en ratas alimentadas con dieta de cafetería.** Hay 6 grupos de ratas: Control de dieta estándar (STD), Control de cafetería (VEH -), Control de cafetería y tratamiento (VEH +), cafetería con 25 mg GSPE/Kg (GSPE), cafetería con 500 mg DHA/Kg (DHA) y cafetería con 25mg GSPE/Kg + 500 mg DHA/Kg (G + D). A) Splicing de XBP1. XBP1u (XBP1 no procesado) es un amplicón de 473 pb; XBP1s (XBP1 procesado) es un amplicón de 428 pb). Imagen representativa de 3 muestras biológicas por grupo de tratamiento. Representación semicuantitativa de los resultados del splicing de XBP1. B) Niveles de expresión génica de GRP78, ATF4, CHOP y ATF6. Los resultados representan la media de la expresión relativa  $\pm$  DE (Desviación Estándar) de 5 muestras biológicas por grupo. Las diferencias estadísticas respecto al grupo STD han sido analizadas mediante ANOVA de un factor seguido con un test post hoc de DMS para la expresión génica de ATF4 y GRP78 o, seguido de un test post hoc de Dunnet para la expresión génica de CHOP; \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  y \* $P < 0.05$ . No hay diferencias significativas para ATF6. C) Análisis de eIF2 $\alpha$ -P y eIF2 $\alpha$  total por Western Blotting. Los pesos moleculares correspondientes a eIF2 $\alpha$ -P, eIF2 $\alpha$  total y actina son 38, 36 y 42 kDa, respectivamente. Imagen representativa de tres inmunoblots independientes. Se ha utilizado el programa Image J para realizar la cuantificación del western blot. Los resultados mostrados en el gráfico de la cuantificación representan unidades relativas (ratio eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$  total)  $\pm$  DE, vs STD; n=4. Las diferencias significativas han sido analizadas mediante ANOVA de un factor seguido de un test post hoc de Bonferroni; \* $P < 0.05$  vs STD o VEH. D) Valoración cualitativa del aspecto graso de los hígados expresado en unidades relativas.

Por tanto, resumiendo los resultados, los niveles de splicing de XBP1 disminuyeron mientras que la expresión génica de GRP78 y ATF4 aumentó en ratas de los grupos

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DHA y G + D. Además, la expresión de CHOP aumentó solamente en el grupo G + D. Adicionalmente, los niveles de eIF2 $\alpha$ -P descendieron en los animales de los grupos GSPE y G + D. Por último, se observó hígado graso en los grupos DHA y G + D pero no en el grupo GSPE.

#### Discusión

En la figura **22a** se observa que las ratas del grupo GSPE experimentan un aumento del splicing de XBP1 mientras que cuando los animales han recibido DHA se produce una disminución de XBP1s. Es decir, los resultados constatan que el DHA tiene un efecto reductor sobre el splicing de XBP1 en animales modelo de obesidad.

La expresión génica de ATF4 (figura **22b**) está incrementada en los grupos DHA y G + D respecto al grupo VEH +, hecho que se correlaciona con un aumento en la expresión de GRP78/BiP (figura **22b**), debido a que ATF4 controla la transcripción de genes relacionados con el plegamiento de proteínas (como por ej., GRP78/BiP), entre otros. Concretamente, en un estudio reciente se ha demostrado que la estimulación de GRP78/BiP en hígado mejora la homeostasis del RE, la esteatosis hepática y la acción de la insulina en ratones con obesidad genética (9) y, por ello, se considera que el incremento en la expresión de GRP78/BiP podría resultar beneficioso. De hecho, en los grupos DHA y G + D puede que el splicing de XBP1 haya disminuido como consecuencia de la mejora en el plegamiento proteico en contraposición con lo que sucede en el grupo GSPE, en el cual el producto de splicing de XBP1 aumentaría debido a la reducida activación de la chaperona GRP78/BiP.

Por otro lado, el sensor ATF6 requiere ser translocado al Aparato de Golgi para su activación. El retraso en la activación de ATF6 podría explicar porque no se observan diferencias de expresión de ATF6 entre los distintos grupos.

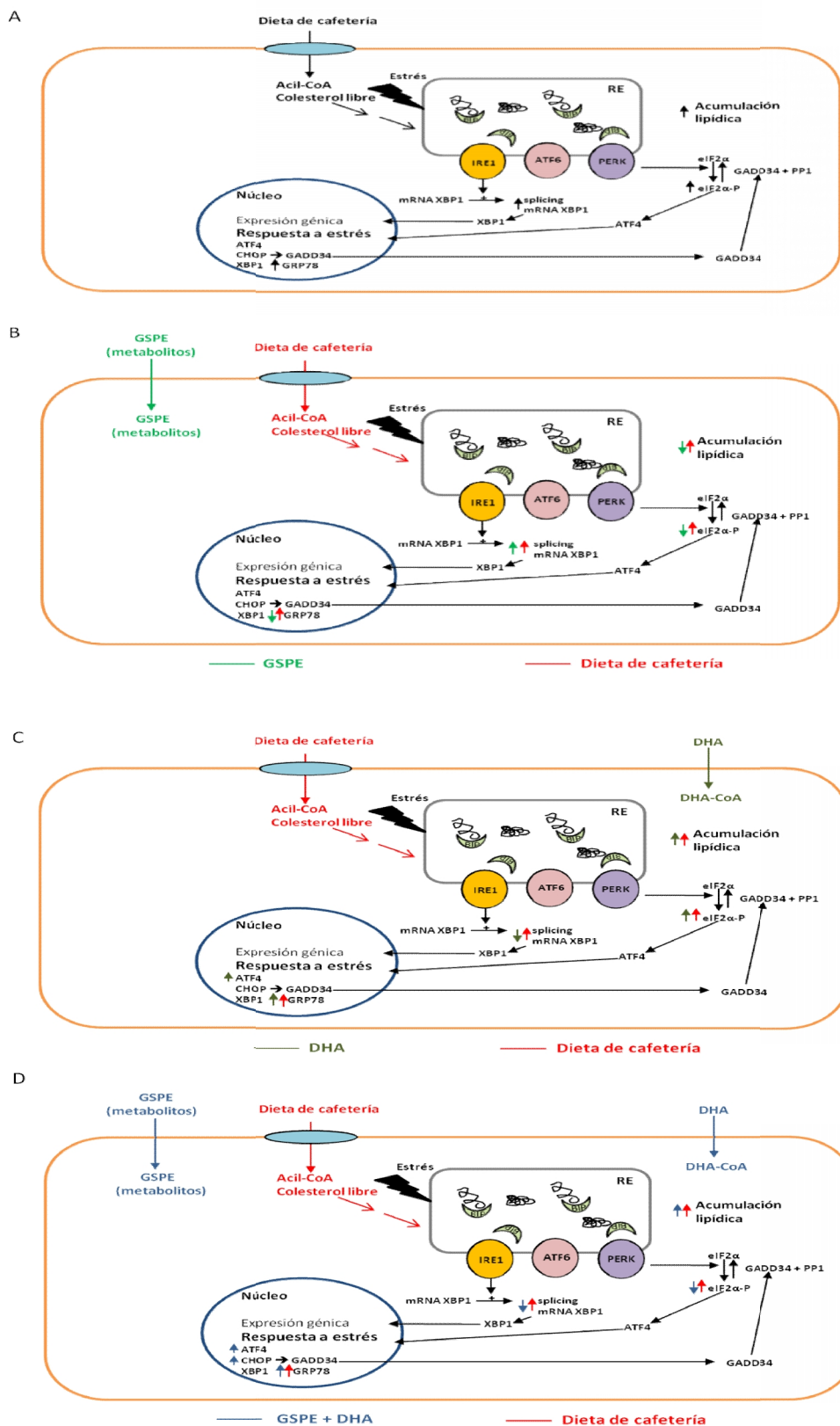
La vía PERK es la principal vía de inducción del factor proapoptótico CHOP, el cual es activado *downstream* de ATF4. La activación de CHOP puede inducir la expresión de GADD34 el cual junto a la proteína fosfatasa 1 (PP1) desfosforila eIF2 $\alpha$  con la finalidad de liberar a la célula de la represión traduccional ejercida por eIF2 $\alpha$ -P y finalizar, de

este modo, la respuesta a estrés de RE, en condiciones fisiológicas (5). Por tanto, el incremento de la expresión de ATF4 y CHOP en el grupo G + D podría correlacionarse con la considerable reducción observada en los niveles de eIF2 $\alpha$ -P para dicho grupo en el Western Blot (figura **22c**). En general, en el Western Blot se observa que la presencia de GSPE en los tratamientos realizados ayuda a reducir la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en animales modelo de obesidad. Curiosamente, la fosforilación de eIF2 $\alpha$ -P en el grupo GSPE es mayor que en el grupo G + D, hecho que podría ser debido a la menor estimulación de CHOP ejercida por el GSPE.

En la figura **23** se propone un modelo para describir y resumir el comportamiento de algunos marcadores de la UPR en función del tratamiento utilizado. La dieta control de cafetería y tratamiento en ratas (VEH +) nos dio idea del splicing basal de XBP1, de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y de la expresión génica de GRP78/BiP (figura **23a**). El grupo GSPE experimentó un incremento del splicing de XBP1 y, un descenso de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y de la expresión de GRP78/BiP (figura **23b**). En cambio, el tratamiento con DHA disminuyó el producto de splicing de XBP1 y, aumentó eIF2 $\alpha$ -P y la expresión génica de ATF4 y GRP78/BiP en ratas modelo de obesidad (figura **23c**). Por último, en el grupo G + D se observó una disminución del splicing de XBP1 y eIF2 $\alpha$ -P, mientras que aumentó la expresión génica de ATF4, GRP78/BiP y CHOP (figura **23d**).

Globalmente, los resultados indican que el GSPE y el DHA mejoran algunos marcadores de la UPR, el GSPE reduciendo eIF2-P y el DHA disminuyendo el splicing de XBP1. De acuerdo con Basseri *et al.* combatir el estrés de RE puede representar una nueva estrategia terapéutica contra la obesidad y el NAFLD. Sin embargo, por razones que desconocemos esto no está reflejado en la valoración del aspecto graso del hígado (figura **22d**) ya que las ratas de los grupos DHA y G + D presentaron hígado graso. En cambio, los hígados de los animales del grupo GSPE mostraron un aspecto poco graso, hecho que podría estar relacionado con la desfosforilación de eIF2 $\alpha$ . De hecho, Oyadomari *et al.* observaron en ratones transgénicos que la desfosforilación de eIF2 $\alpha$  protege de la esteatosis hepática inducida por una dieta alta en grasas, debido a una marcada disminución de la lipogénesis hepática (1,11). Por otro lado, Quesada *et al.* observaron que la ingesta oral de GSPE mejora la dislipemia y la esteatosis hepática en

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 23. Resumen de los resultados del experimento crónico de animales.** A) Ratas del grupo VEH +. B) Ratas del grupo GSPE. C) Ratas del grupo DHA. D) Ratas del grupo GSPE + DHA.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ratas alimentadas con dieta de cafetería, principalmente mediante la represión de la expresión de genes involucrados en la lipogénesis (DGAT2 y SREBP1) y de la proteína de transferencia microsomal (MTP, controlador clave en el ensamblaje de VLDL). Por tanto, la mejora del aspecto graso del hígado en animales tratados con GSPE podría ser debida a la disminución de la síntesis de las VLDL debido en primer lugar a una reducción de los niveles de lípidos disponibles en el hígado y, posteriormente también a una disminución del ensamblaje de las lipoproteínas (30). Como consecuencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo podríamos sugerir que la desfosforilación de eIF2 $\alpha$  ejercida por el GSPE en ratas modelo de obesidad podría estar correlacionada con una disminución de la expresión y la actividad de enzimas involucradas en la lipogénesis hepática. En posteriores estudios sería recomendable evaluar con detalle la vía PERK de la UPR, la expresión de genes lipogénicos, la composición lipídica hepática, los lípidos plasmáticos y algunos reguladores clave de la síntesis y secreción de VLDL.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.2 Estudios In vitro

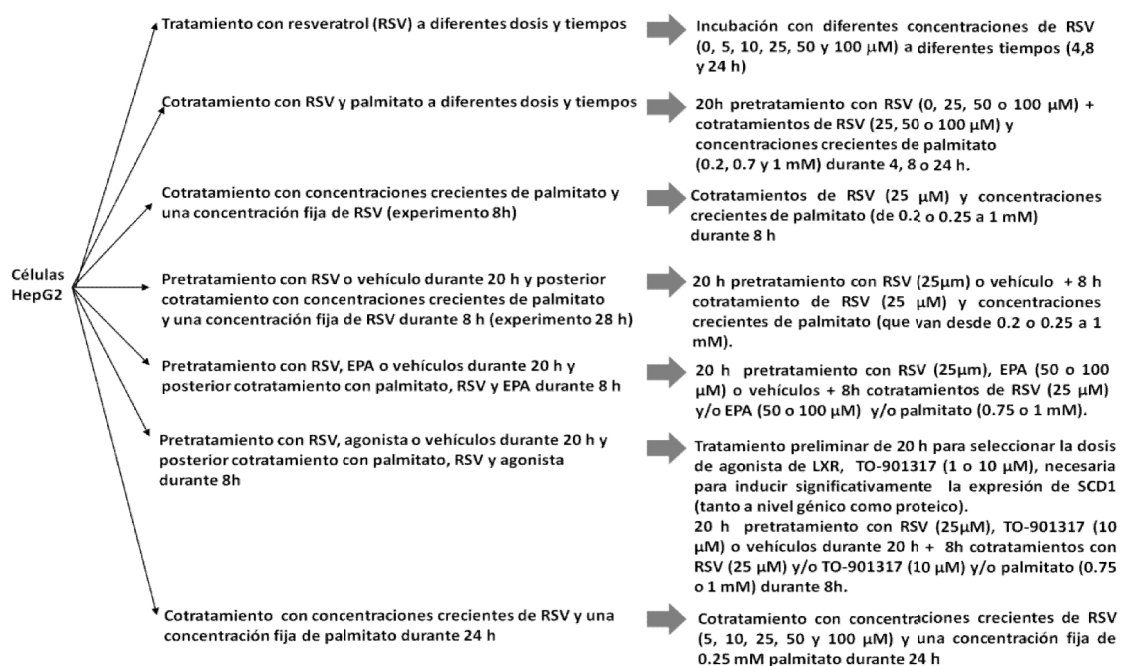
#### 4.2.1 Experimentos agudos en células HepG2

##### 4.2.1.1 Bloque I. Tratamientos agudos con resveratrol y/o palmitato

###### Antecedentes

Existe una intersección molecular entre la señalización vinculada al estrés de RE y a la lipogénesis hepática. De este modo, por ejemplo, las vías de señalización PERK/eIF2 $\alpha$  y IRE1/XBP1 contribuyen a que la lipogénesis hepática sea óptima (11). Se ha observado que el palmitato, un AG saturado, puede inducir toxicidad y muerte celular a través de la activación de la UPR (67). Por otro lado, se ha demostrado que el RSV puede paliar la acumulación excesiva de triglicéridos (TG) inhibiendo la activación de SREBP1 mediante la vía de señalización Sirt1-FOXO1 en un modelo de esteatosis hepática en células HepG2 (68).

La realización del grupo de tratamientos agudos del bloque I pretendía determinar si la capacidad del RSV para reducir la acumulación lipídica inducida por la incubación con AGL saturados podría ser mediada en parte por una hipotética disminución en la respuesta a estrés de RE en células HepG2.



**Figura 12. Experimentos agudos con resveratrol y/o palmitato (bloque I).** El vehículo del RSV fue el etanol al 0.1 %, el del TO-901317 fue el 0.1 % DMSO y, el del palmitato y el EPA fue el BSA al 5 % en medio DMEM sin suero.

En la figura **12** se esquematizan los experimentos realizados en este bloque I. Se realizó un “Tratamiento con RSV a diferentes dosis y tiempos” con la finalidad de seleccionar una dosis de RSV (25  $\mu$ M) que no produjera estrés de RE en los diferentes tiempos evaluados en células HepG2. A continuación, se llevó a cabo un “Cotratamiento con RSV y palmitato a diferentes dosis y tiempos” para escoger una dosis de RSV (25  $\mu$ M) y un tiempo de incubación (8h) en los cuales el RSV no disminuyera la viabilidad en células sobrecargadas con palmitato. Con el “experimento 8 h” (no preincubación con RSV) y el “experimento 28 h” (preincubación con RSV) evaluamos la hipótesis de partida. Inesperadamente, los niveles subtóxicos de RSV (25  $\mu$ M) no rescataron las células ni del estrés de RE ni de la apoptosis, ambas inducidas por la incubación con palmitato. Esto nos hizo pensar que el RSV quizá podía estar afectando la capacidad de metabolizar el palmitato de la célula y dirigimos la investigación a estudiar la acumulación de TG y SCD1, enzima implicada en la desaturación de AG saturados (como por ejemplo, el palmitato). SCD1 tiene un papel protector en la lipotoxicidad inducida por palmitato (69); además, la supresión de esta enzima *in vitro* está relacionada con una disminución de la fluidez de membrana y un aumento de la UPR (70). Posteriormente, para examinar con más profundidad si la inducción del estrés de RE en células cotratadas con RSV y palmitato era debida a cambios en el grado de insaturación de la membrana, se desarrollaron dos experimentos diferentes para disminuir el ratio de SFA (*saturated fatty acids*)/MUFA (*monounsaturated fatty acids*): (a) suplementación con AG poliinsaturados (tratamiento con dos concentraciones crecientes de EPA) y (b) tratamiento con agonista LXR (adición de TO-901317 para estimular la expresión de SCD1). El último tratamiento, el “cotratamiento con concentraciones crecientes de RSV y una concentración fija durante 24 h”, se realizó con el propósito de conocer si la disminución del umbral de activación de estrés de RE en células sobrecargadas con una concentración fija de palmitato (0.25 mM) era dependiente del aumento de la dosis de RSV (efecto dependiente de RSV). A continuación, se detallarán los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos realizados. Finalmente, se realizará una discusión general en la cual se contrastarán los resultados globales con los obtenidos por otros investigadores.

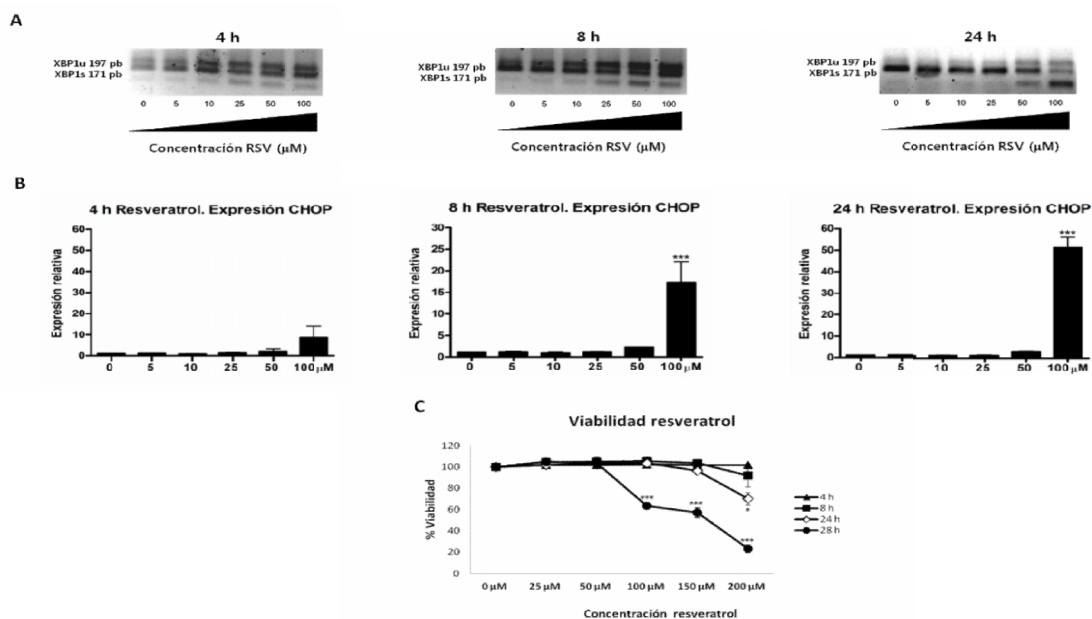
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Resultados

#### Tratamiento con resveratrol (RSV) a diferentes dosis y tiempos

La activación del splicing de XBP1 (figura 24a) y la expresión de CHOP (figura 24b) ejercida por el RSV es dependiente de la concentración de RSV y del tiempo de tratamiento. El máximo aumento tanto en el splicing de XBP1 (prácticamente todo el XBP1 en forma procesada o XBP1s) o en la expresión de CHOP (expresión relativa de  $51.29 \pm 4.81$ ;  $p < 0.001$ ) fue a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de RSV y a un tiempo de incubación de 24 h. Se puede destacar que la concentración 25  $\mu\text{M}$  RSV no indujo estrés de RE, de manera significativa, en ningún tiempo.

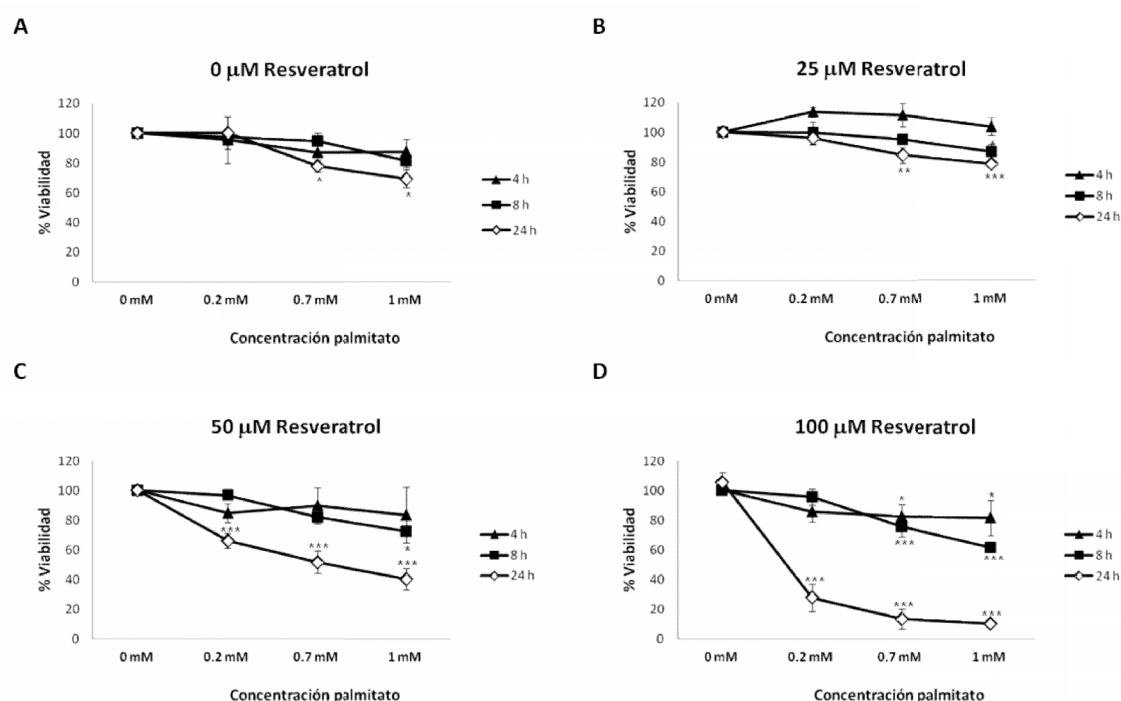
Por otro lado, el RSV disminuye la viabilidad de HepG2 a altas dosis y tiempos de incubación. De hecho, la disminución en la viabilidad aparece en tiempos posteriores a 24 h de tratamiento con RSV (figura 24c), con un valor aproximado del 40 % de viabilidad tras 28 h de tratamiento ( $p < 0.001$ ).



**Figura 24. Efectos de concentraciones crecientes de RSV en el splicing de XBP1, la expresión de CHOP y la viabilidad de células HepG2 a diferentes tiempos.** Las células HepG2 fueron tratadas con vehículo (0.1 % etanol) o con concentraciones crecientes de RSV (5, 10, 25, 50 and 100  $\mu\text{M}$ ) durante diferentes tiempos (4, 8 y 24 h). A) El RSV ejerce una activación del splicing de XBP1 dependiente de la concentración y del tiempo. XBP1u (XBP1 no procesado) es un amplicón de 197 pb; XBP1s (XBP1 procesado) es un amplicón de 171 pb). Estas imágenes son representativas de 3 experimentos independientes. B) El RSV ejerce una activación de la expresión relativa de CHOP dependiente de la concentración y del tiempo. Los datos expresan la media de la expresión relativa  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. C) Efectos del RSV en la viabilidad de células HepG2. Se determinó la viabilidad celular mediante la técnica de MTT. Los datos expresan la media del % Viabilidad  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas son relativas al control (vehículo) y fueron analizadas mediante ANOVA de un factor seguida de test post hoc de Bonferroni: \*\*\* $P < 0.001$  and \* $P < 0.05$ .

**Cotratamiento con RSV y palmitato a diferentes dosis y tiempos**

Concentraciones crecientes de palmitato (de 0.2 a 1 mM) provocaron una disminución de la viabilidad (o aumento de la muerte celular) dependiente de la dosis y del tiempo en células HepG2 (figura 25a). Como puede observarse en la figura 25b-d, esta disminución de la viabilidad es todavía mayor si las células tratadas con palmitato son cotratadas con concentraciones crecientes de RSV (de 25 a 100  $\mu$ M). Los tratamientos de 50  $\mu$ M RSV (~60% disminución máxima en la viabilidad celular;  $p < 0.001$ ) y de 100  $\mu$ M RSV (~80% disminución máxima en la viabilidad celular;  $p < 0.001$ ) durante 24 h fueron los que mostraron efectos más evidentes. En cambio, la dosis de 25  $\mu$ M RSV no produce un aumento significativo de la muerte celular inducida por palmitato en cotratamientos palmitato-RSV de 4 y 8 h; por tanto, ésta será la concentración seleccionada para estudiar exhaustivamente el efecto del RSV sobre el estrés de RE y su relación con la acumulación de grasa inducida por elevados niveles de AGL.

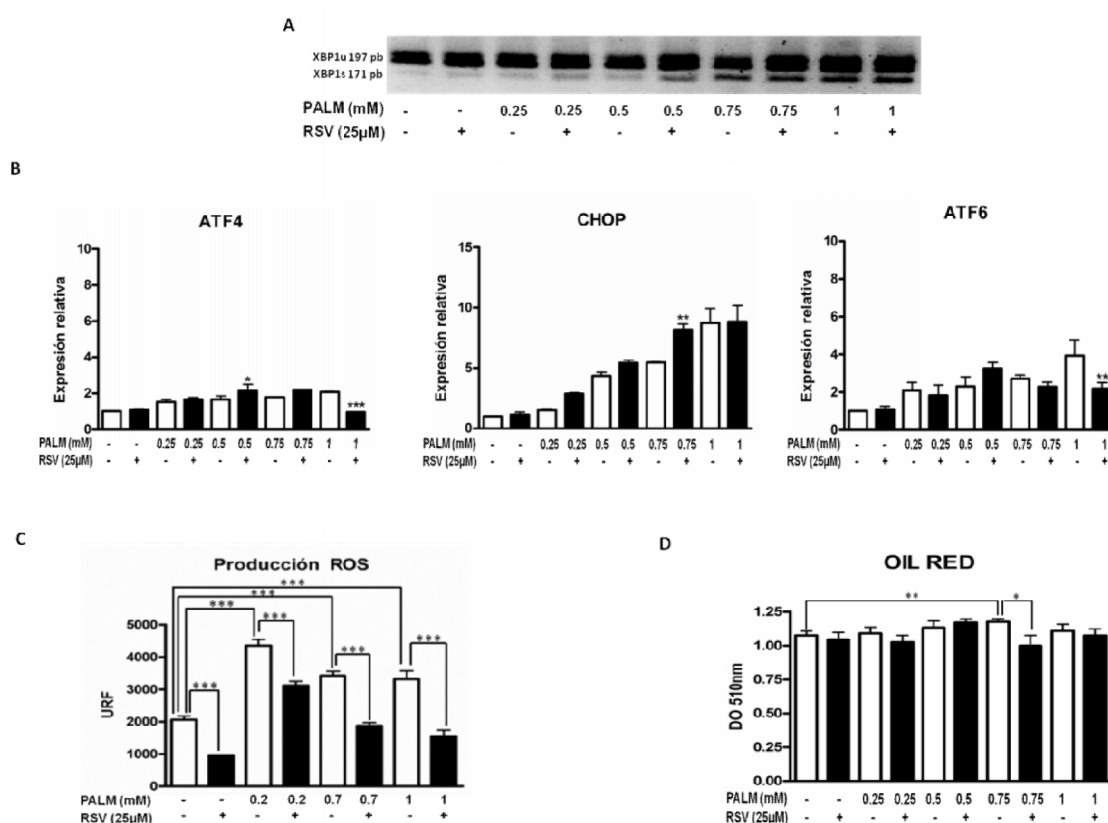


**Figura 25. La muerte celular inducida con palmitato es potenciada por el RSV.** La muerte celular inducida con palmitato (expresado como porcentaje de la viabilidad celular) fue evaluada mediante ensayo de MTT en células HepG2. También se estudió el efecto del RSV en células tratadas con palmitato. A) Concentraciones crecientes de palmitato (0.2-1 mM) causaron una disminución de la viabilidad celular dependiente del tiempo (4, 8 y 24 h) y de la dosis. Las células tratadas con palmitato también fueron coincubadas con concentraciones crecientes de RSV: B) 25  $\mu$ M, C) 50  $\mu$ M y D) 100  $\mu$ M. Los datos expresan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas relativas al control (vehículo) fueron analizadas mediante ANOVA de un factor seguido de test post hoc de Bonferroni: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.001$  y \* $p < 0.05$ .

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### Cotratamiento con concentraciones crecientes de palmitato y una concentración fija de RSV durante 8h (experimento 8h)

En un cotratamiento con una dosis fija de RSV y concentraciones crecientes de palmitato (0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM) durante 8 h, el RSV indujo un aumento palmitato-dependiente en el splicing de XBP1 (figura 26a). Este efecto del RSV fue observado también en la expresión génica de CHOP (8.18±0.48 vs 5.45±0.08; p<0.01); máxima diferencia de expresión relativa entre muestras tratadas y no tratadas con RSV) en la figura 26b. En cambio, se observó una disminución significativa de ATF4 y ATF6 en las muestras cotratadas con 1 mM palmitato y RSV con respecto a las tratadas con 1 mM palmitato.



**Figure 26. Efectos del cotratamiento con palmitato y resveratrol durante 8h en la respuesta a estrés de RE, en la producción de ROS y en la acumulación de TG (Experimento 8h).** Las células HepG2 fueron lavadas dos veces con medio DMEM sin suero e incubadas con dicho tipo de medio O/N. Posteriormente, fueron cotratadas con 25 µM resveratrol (RSV) y concentraciones crecientes de palmitato (PALM) durante 8 h. **A)** Splicing de XBP1. Imagen representativa de 3 experimentos independientes. **B)** Niveles de expresión génica de ATF4, CHOP y ATF6. Los resultados representan la media de la expresión relativa ± DE de 3 experimentos independientes. **C)** Antes del cotratamiento, las células fueron incubadas con DCFH-DA (20 µM de concentración final) a 37°C durante 30 min. La producción de ROS está representada como la media de URF (Unidades Relativas de Fluorescencia) ± DE de 3 experimentos independientes. **D)** Análisis cuantitativo de la acumulación de TG en células HepG2 mediante la técnica Oil Red. Los resultados representan la media de la DO<sub>510nm</sub> ± DE de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas en relación al control (vehículo o palmitato) fueron analizadas con tests T-Student de muestras apareadas. \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01 and \*P<0.05.

También, se evaluó la producción de ROS para conocer la contribución del estrés oxidativo en este experimento. Como se muestra en la figura **26c**, el tratamiento con concentraciones crecientes de palmitato (de 0.2 a 1 mM palmitato) durante 8 h provocó un aumento en la señal de la fluorescencia ( $2056 \pm 116$  vs  $4354 \pm 190$ ;  $p < 0.001$ ; máxima diferencia entre muestras no tratadas y tratadas con palmitato). La incubación con RSV durante 8 h disminuyó la cantidad de ROS intracelular para todas las dosis utilizadas de palmitato ( $3313 \pm 260$  vs  $1549 \pm 190$ ;  $p < 0.001$ ; máxima diferencia entre muestras tratadas con palmitato y muestras tratadas con RSV + palmitato).

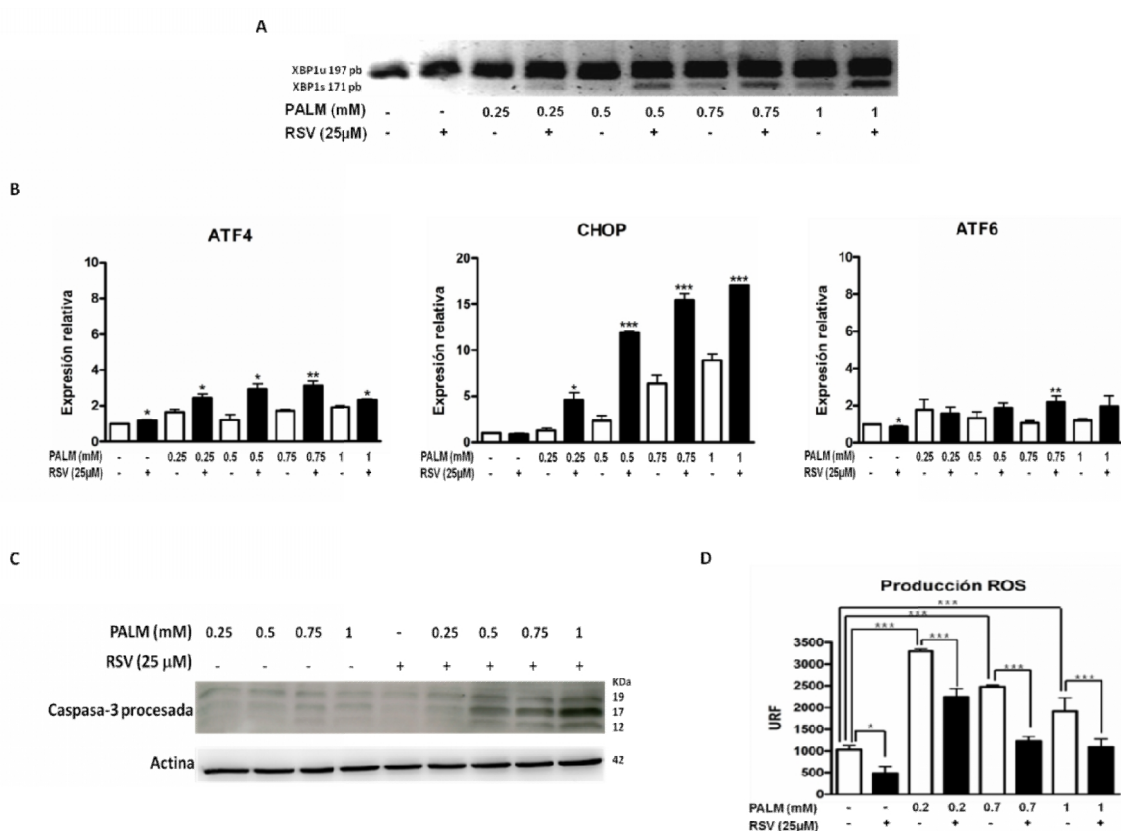
Por otro lado, en la figura **26d** sólo se observa una disminución en la acumulación de TG en células tratadas con 0.75 mM palmitato provocada por el RSV. El tratamiento con 0.75 mM palmitato aumentó de manera significativa la acumulación de TG en células HepG2 ( $1.08 \pm 0.03$  vs  $1.18 \pm 0.02$ ;  $p < 0.01$ ; diferencia máxima entre muestras no tratadas y tratadas con palmitato) mientras que el cotratamiento con RSV la disminuyó ( $1.18 \pm 0.02$  vs  $1 \pm 0.08$ ;  $p < 0.05$ ; diferencia máxima entre muestras tratadas con palmitato y palmitato + RSV).

**Pretratamiento con RSV o vehículo durante 20 h y posterior cotratamiento con concentraciones crecientes de palmitato y una concentración fija de RSV durante 8 h (Experimento 28h)**

En la figura **27** se muestran los resultados de un cotratamiento con dosis crecientes de palmitato y 25  $\mu$ M RSV durante 8h, tras una incubación previa de 20 horas con RSV o vehículo. El RSV (25  $\mu$ M) produjo un aumento del splicing de XBP1 de forma dependiente al incremento de la concentración de palmitato (figura **27a**). Como se observa en la figura **27b**, el RSV provocó el mismo efecto en otros marcadores de la UPR estudiados como CHOP ( $17.03 \pm 0.01$  vs  $8.91 \pm 0.65$ ;  $p < 0.001$ ; máxima diferencia de expresión relativa entre muestras tratadas y no tratadas con RSV) y ATF4 ( $3.13 \pm 0.35$  vs  $1.7 \pm 0.09$ ;  $p < 0.01$ ; máxima diferencia de expresión relativa entre muestras tratadas y no tratadas con RSV). Por otro lado, no está claro si este tratamiento es capaz de afectar la expresión génica de ATF6. Sin embargo, no se puede descartar que este marcador de la UPR no esté afectado por dicho tratamiento debido a la translocación a Golgi necesaria para su activación.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar el efecto del RSV en la lipoapoptosis promovida por palmitato se realizaron Western blots para conocer los niveles de la forma procesada de la caspasa-3 (forma activa de esta enzima proapoptótica). Como se puede observar en la figura 27c, solamente las dosis altas de palmitato (0.75 y 1 mM) indujeron un aumento significativo del procesamiento de la caspasa-3. Por otro lado, el cotratamiento con RSV estimuló: (1) unos niveles más altos de la forma procesada de la caspasa-3 que los observados en tratamientos con palmitato y, (2) una disminución de la concentración de ácidos grasos saturados necesaria para provocar un efecto apoptótico (0.5 mM palmitato vs 0.5 mM palmitato + 25  $\mu$ M RSV).



**Figura 27. El RSV aumenta el estrés de RE y la apoptosis inducidos por palmitato pero disminuye la producción de ROS (Experimento 28h).** Las células HepG2 fueron lavadas dos veces con medio DMEM sin suero y transferidas a medio libre de suero con o sin 25  $\mu$ M de RSV durante 28 h; 8h antes de la finalización del experimento se añadieron dosis crecientes de palmitato (PALM). A) Splicing XBP1. Imagen representativa de tres experimentos independientes. B) Niveles de expresión génica de ATF4, CHOP y ATF6. Los resultados representan la media de la expresión relativa  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. C) Análisis de la forma procesada de la caspasa-3 por Western blotting. El procesamiento de la Caspasa-3 da lugar a 3 fragmentos: 12, 17 y 19 kDa; el peso molecular de la actina es de 42 kDa. El blot mostrado es una imagen representativa de tres experimentos independientes. D) Células HepG2 fueron tratadas con o sin 25  $\mu$ M RSV durante 28h. Antes del cotratamiento de 8 h con palmitato y RSV, las células fueron incubadas con DCFH-DA ( $C_f = 20 \mu$ M) a 37°C durante 30 min. La producción de ROS está expresada como la media de las URF  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas en relación al control (vehículo o palmitato) fueron analizadas con tests T-Student de muestras apareadas. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  and \* $P < 0.05$ .

Por otro lado, células tratadas con concentraciones crecientes de palmitato (0.2 a 1 mM) durante 8 horas (figura **27d**) experimentaron un aumento de la producción de ROS ( $1026\pm 104$  vs  $3294\pm 61$ ;  $p<0.001$ ; máxima diferencia de Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) entre muestras no tratadas y muestras tratadas con palmitato). En cambio, el cotratamiento con RSV disminuyó la cantidad intracelular de ROS en todas las dosis ensayadas de palmitato ( $2478\pm 36$  vs  $1222\pm 108$ ;  $p<0.001$ ; máxima diferencia de URF entre muestras tratadas con palmitato y muestras tratadas con palmitato + RSV).

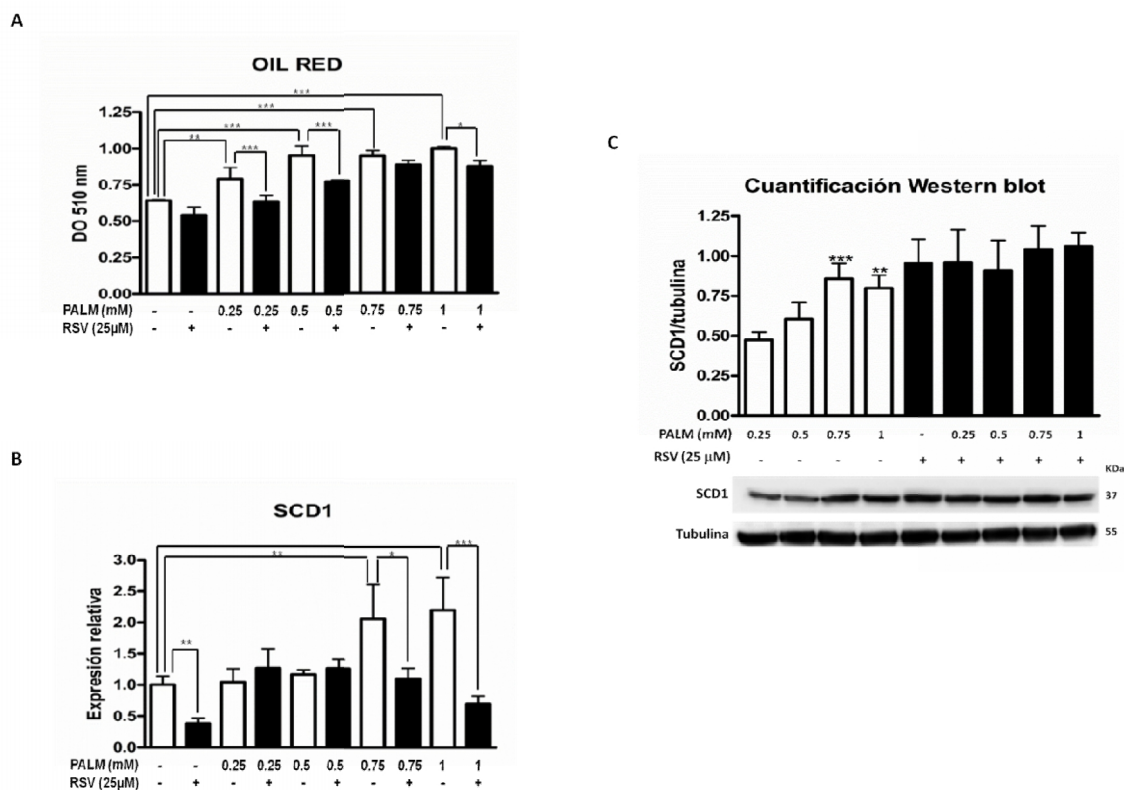
El tratamiento con palmitato durante 8 h indujo un aumento del contenido de TG ( $0.643\pm 0.006$  vs  $0.994\pm 0.015$ ;  $p<0.001$ ; máxima diferencia entre muestras no tratadas y tratadas con palmitato) de manera dosis dependiente en células HepG2 (figura **28a**). En cambio, en células preincubadas con RSV durante 20 h, el contenido intracelular de TG se redujo para todas las dosis ensayadas de palmitato ( $0.951\pm 0.068$  vs  $0.774\pm 0.011$ ;  $p<0.001$ ; diferencia máxima entre muestras tratadas con palmitato y muestras tratadas con palmitato + RSV).

Inesperadamente, pese a que una dosis subtóxica de RSV (25  $\mu$ M) tiene capacidad antilipogénica, se ha observado que este polifenol potencia la toxicidad celular provocada por la incubación con palmitato. Este mecanismo podría estar correlacionado con la inhibición de la enzima residente del RE SCD1 (69). Además de regular el metabolismo lipídico y energético, SCD1 es importante para el equilibrio entre AG saturados y AG monoinsaturados, es decir, en el ratio SFA/MUFA de los fosfolípidos de membrana. De hecho se ha descrito que la ausencia de esta enzima *in vitro* está relacionada con una disminución de la fluidez de membrana y un aumento de la UPR (70).

Como se puede observar en la figura **28b**, el tratamiento de 8 h a elevadas dosis de palmitato (0.75 y 1 mM) indujo una sobreexpresión significativa de SCD1 ( $1\pm 0.14$  vs  $2.21\pm 0.52$ ;  $p<0.001$ ; máxima diferencia de expresión relativa entre muestras no tratadas y tratadas con palmitato). En cambio, se redujo considerablemente la sobreexpresión de SCD1 en células HepG2 pretratadas durante 20 h con RSV. Este hecho sugiere que el RSV podría atenuar el aumento de la expresión de SCD1 inducido

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

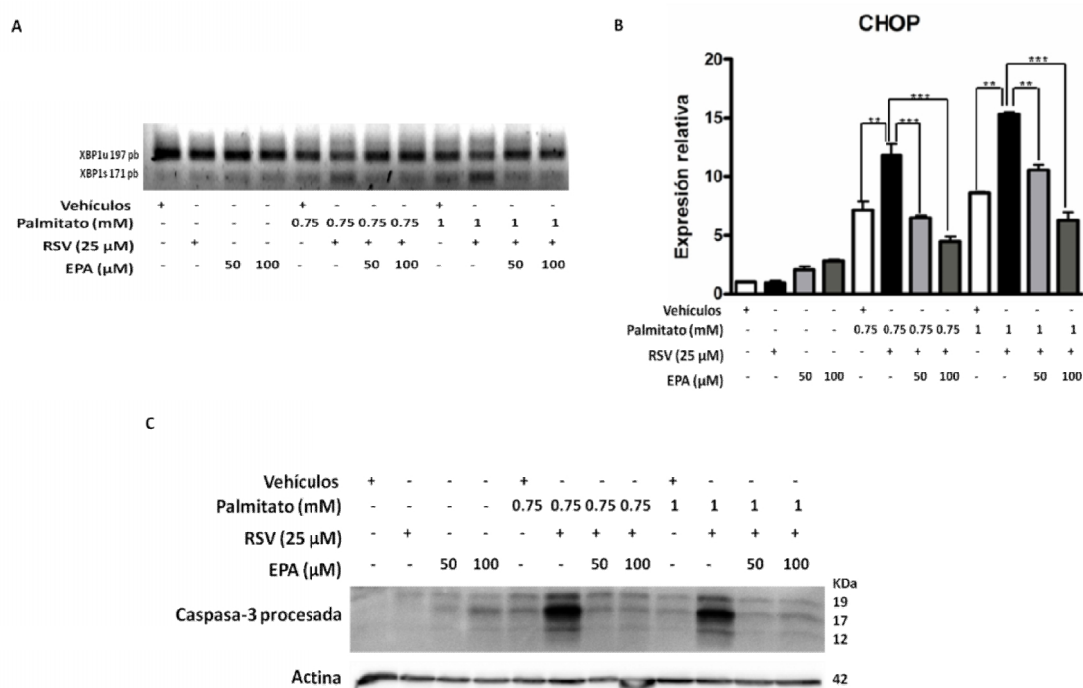
con palmitato ( $2.21 \pm 0.52$  vs  $0.7 \pm 0.12$ ;  $p < 0.001$ ; diferencia máxima de expresión relativa entre muestras tratadas con palmitato y muestras tratadas con palmitato + RSV). En cambio, cuando se estudió SCD1 a nivel proteico se observó solamente una ligera disminución del contenido proteico (figura 28c). Esta falta de correlación entre los niveles proteicos y de mRNA de SCD1 sugiere que otros factores (factores post-traduccionales), en lugar de la expresión génica, podrían ser importantes en la regulación de SCD1 en respuesta a RSV.



**Figura 28. El RSV reduce la expresión génica de SCD1 y la acumulación de TG pero no los niveles de expresión de proteína de SCD1 (Experimento 28h).** Las células HepG2 fueron lavadas dos veces con medio DMEM sin suero y transferidas a medio libre de suero con o sin 25 µM de RSV durante 28 h; 8h antes de la finalización del experimento se añadieron dosis crecientes de palmitato (PALM). A) Cuantificación de la tinción de Oil Red O. La acumulación de TG está expresada como la media de la de la  $DO_{510nm} \pm DE$  de tres experimentos independientes. B) Niveles de expresión génica de SCD1. Los resultados representan la media de la expresión relativa  $\pm DE$  de tres experimentos independientes. C) Niveles proteicos de SCD1. Los lisados celulares fueron preparados y analizados por Western blotting. Los pesos moleculares correspondientes a SCD1 y tubulina son 37 y 55 kDa, respectivamente. Los resultados de los inmunoblots fueron cuantificados por densitometría. Los resultados mostrados en la gráfica representan el ratio de SCD1/tubulina  $\pm DE$ . Debajo de la gráfica se muestra un inmunoblot representativo de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas en relación al control (vehículo o palmitato) fueron analizadas con tests T-Student para SCD1 y por ANOVA de un factor seguido por tests post hoc de Bonferroni para la cuantificación del Western Blot. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  and \* $P < 0.05$ .

**Pretratamiento con RSV, EPA o vehículos durante 20 h y posterior cotratamiento con palmitato, RSV y EPA durante 8 h**

La figura 29 muestra que la suplementación con ambas concentraciones de EPA redujo los niveles de caspasa-3 procesada (figura 29c) en comparación con RSV + palmitato y, por tanto, protegió las células HepG2 del proceso apoptótico. Esta reducción en la apoptosis se correlaciona con una disminución en el splicing de XBP1 (figura 29a) y en la expresión CHOP (16.54±2.16 vs 6.27±0.67; p<0.001; máxima diferencia entre las muestras tratadas con palmitato + RSV y las muestras tratadas con palmitato + RSV + EPA) (figura 29b), sugiriendo una mejora en el funcionamiento del RE.



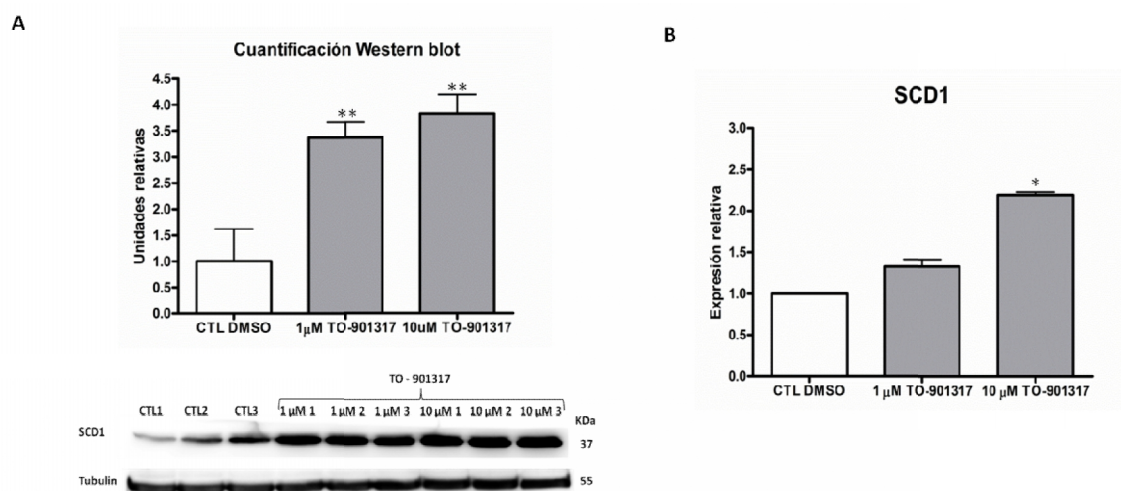
**Figura 29. EPA rescató el estrés de RE y la apoptosis inducidos por el cotratamiento con RSV y palmitato en HepG2.** Las células HepG2 fueron lavadas dos veces con medio DMEM sin suero y transferidas a medio sin suero con vehículos (0.1 % etanol y BSA), 25 μM RSV o EPA (50 o 100 μM) durante 28 h; 8 h antes del final del experimento se añadió palmitato (0, 0.75 o 1 mM) a los pocillos correspondientes. A) Splicing XBP1. Imagen representativa de tres experimentos independientes. B) Expresión génica de CHOP. Se presentan los resultados como la media de la expresión relativa ± DE. de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante ANOVA de un factor seguido por tests post hoc de Bonferroni: \*\*\*p<0.001 y \*\*p<0.01. C) El nivel de caspasa-3 procesada fue determinado mediante Western blotting. El procesamiento de la Caspasa-3 da lugar a 3 fragmentos: 12, 17 y 19 kDa; el peso molecular de la actina es de 42 kDa. El blot mostrado es una imagen representativa de tres experimentos independientes.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### Pretratamiento con RSV, agonista o vehículos durante 20 h y posterior cotratamiento con palmitato, RSV y agonista durante 8 h

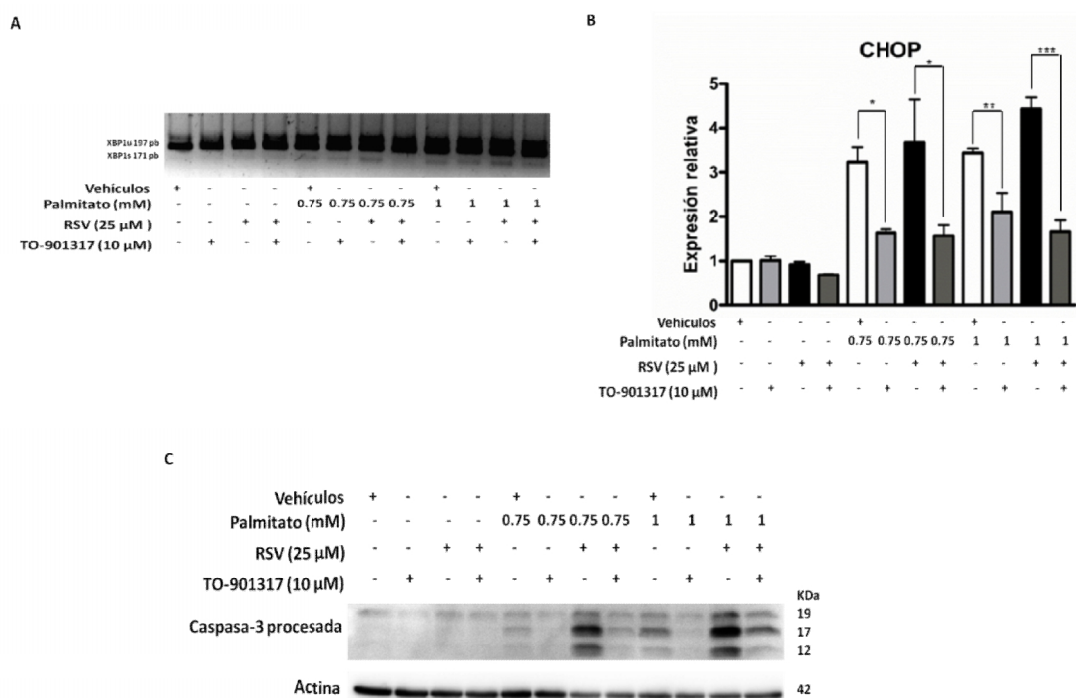
Células HepG2 tratadas con dos concentraciones (1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ) de agonista LXR TO-901317 mostraron un aumento en los niveles de proteína y mRNA de SCD1 (figura 30). La concentración correspondiente a 10  $\mu\text{M}$  agonista fue seleccionada como la dosis de trabajo ya que logró incrementar ambos niveles de manera significativa.

Además, como se muestra en la figura 31, en células cotratadas con palmitato y RSV, el tratamiento con agonista corrigió el aumento de la forma procesada de la caspasa-3 (figura 31c) y, también, revirtió los efectos en el estrés de RE, disminuyendo la expresión de CHOP ( $4.43 \pm 0.26$  vs  $1.67 \pm 0.26$ ;  $p < 0.001$ ; máxima diferencia de expresión relativa entre muestras tratadas con palmitato + RSV y muestras tratadas con palmitato + RSV + TO-901317) y el splicing de XBP1 (figura 31b-a).



**Figura 30. El activador de LXR TO-901317 indujo la expresión génica y proteica de SCD1 en HepG2.** Las células HepG2 fueron tratadas con 0 (0.1 % DMSO), 1 y 10  $\mu\text{M}$  TO-901317 durante 20 h. A) Niveles proteicos de SCD1. Los lisados celulares fueron preparados y analizados por Western blotting. Los pesos moleculares correspondientes a SCD1 y tubulina son 37 y 55 kDa, respectivamente. Los resultados del triplicado de inmunoblots fueron cuantificados por densitometría. Los resultados mostrados en la gráfica representan el ratio de SCD1/tubulina  $\pm$  DE. Debajo de la gráfica se muestra un inmunoblot representativo del experimento. B) Niveles de expresión génica de SCD1. Los resultados son representados como la media de la expresión relativa  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas relativas al control (vehículo) fueron analizadas mediante ANOVA de un factor seguido por tests post hoc de Bonferroni: \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$ .

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



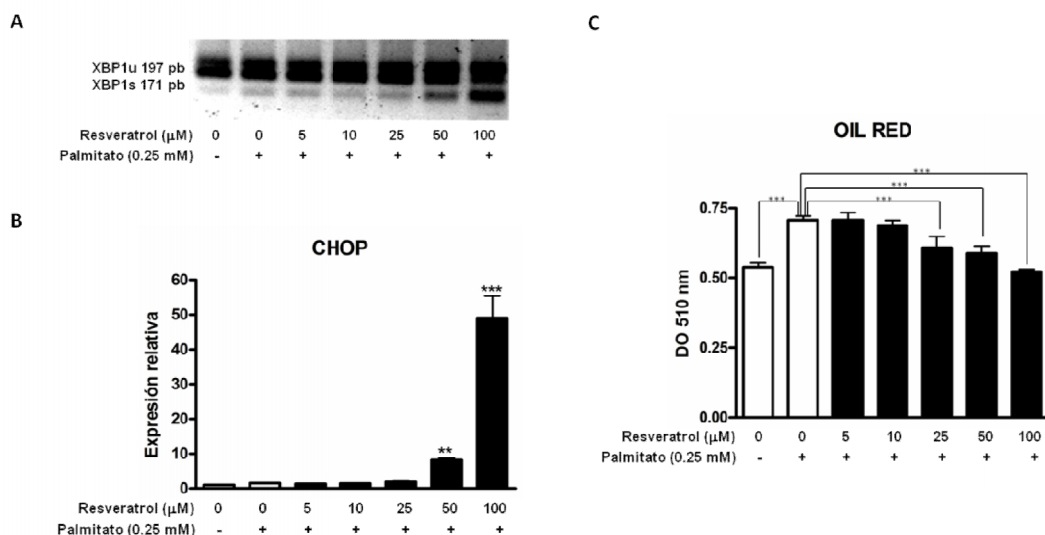
**Figura 31. TO-901317 rescató el estrés de RE y la apoptosis inducidos por el cotratamiento con RSV y palmitato en HepG2.** Las células HepG2 fueron lavadas dos veces con medio DMEM sin suero y transferidas a medio sin suero con vehículos (0.1 % etanol y 0.1 % DMSO), 25 μM RSV o 10 μM TO-901317 durante 28 h; 8 h antes del final del experimento se añadió palmitato (0, 0.75 o 1 mM) a los pocillos correspondientes. A) Splicing XBP1. Imagen representativa de tres experimentos independientes. B) Expresión génica de CHOP. Se presentan los resultados como la media de la expresión relativa ± DE. de tres experimentos independientes. C) El nivel de caspasa-3 procesada fue determinado mediante Western blotting. El procesamiento de la Caspasa-3 da lugar a 3 fragmentos: 12, 17 y 19 kDa; el peso molecular de la actina es de 42 kDa. El blot mostrado es una imagen representativa de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante ANOVA de un factor seguido por tests post hoc de Bonferroni: \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01 y \*p<0.05.

#### Cotratamiento con concentraciones crecientes de RSV y una concentración fija de palmitato durante 24 h

En células tratadas con palmitato, el incremento de la dosis de RSV suministrada es concomitante al aumento del splicing de XBP1 (Figura 32a) y a la expresión de CHOP (49.10±6.26 vs 1.53±0.14; p<0.001; diferencia máxima entre muestras tratadas y no tratadas con RSV) (Figura 32b).

Como se muestra en la figura 32c, el tratamiento con palmitato durante 24 h provocó un aumento del contenido de TG en células HepG2 (0.54±0.01 vs 0.71±0.02; p<0.001; diferencia entre muestras no tratadas y tratadas con palmitato). En cambio, a medida que la concentración de RSV aumenta en las células tratadas con 0.25 mM palmitato, disminuye la acumulación de TG (0.71±0.02 vs 0.52±0.01; p<0.001; diferencia máxima entre muestras tratadas con palmitato y muestras tratadas con palmitato + RSV).

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 32.** Células HepG2 tratadas con concentraciones crecientes de RSV y 0.25 mM palmitato durante 24 h. Las células HepG2 fueron lavadas dos veces con medio DMEM libre de suero e incubadas con medio libre de suero con vehículo (0.1 % etanol), 5, 10, 25, 50 o 100  $\mu\text{M}$  RSV y una concentración fija de palmitato (0,25 mM) o BSA (5 %) durante 24 h. A) Splicing de XBP1. Imagen representativa de tres experimentos. B) Expresión génica de CHOP. Los resultados representan la media de expresión relativa  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas relativas al control (vehículo) fueron analizadas mediante ANOVA de un factor seguida de test post hoc de Bonferroni. : \*\*\* $P < 0.001$  y \*\* $P < 0.01$ . C) Análisis cuantitativo de la acumulación de TG en células HepG2 mediante la técnica Oil Red. Los resultados representan la media de la  $\text{DO}_{510\text{nm}}$   $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas relativas a la muestra tratada con 0  $\mu\text{M}$  RSV y 0.25 mM palmitato fueron analizadas mediante ANOVA de un factor seguida de test post hoc de Bonferroni. : \*\*\* $P < 0.001$ .

#### Discusión general

Las células HepG2 expuestas a concentraciones crecientes de RSV a diferentes tiempos (figura 24) muestran una activación de los marcadores de la UPR estudiados (splicing de XBP1 y expresión de CHOP), resultados que coinciden con las observaciones de Park *et al.* en células humanas de cáncer de colon (55). Sin embargo, no existe una correlación entre el evidente estrés de RE provocado por el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  RSV y la viabilidad celular en esta misma situación, sugiriendo que pese a que la célula debe hacer frente a la pérdida de homeostasis del RE, todavía continúa siendo viable.

Por otro lado, el splicing de XBP1 y la expresión de CHOP siguen una tendencia similar en los experimentos 8 h (figura 26) y 28 h (figura 27). En estos casos, se observa un efecto dependiente de palmitato, es decir, que para una concentración fija de RSV, el estímulo que promueve cambios en los marcadores de UPR estudiados es el aumento del palmitato. Sin embargo, se obtuvo un efecto similar cuando se fijó la concentración de palmitato (0.25 mM) y las concentraciones de RSV fueron crecientes (figura 32). En

conjunto, estos resultados sugieren que el RSV sensibiliza las células hacia la lipoapoptosis, y que una dosis más alta de RSV disminuye la concentración de palmitato necesaria para inducir estrés de RE y posterior apoptosis. En el experimento 28 h se ha observado que el RSV potencia la activación de la caspasa-3 (proteína proapoptótica) en células tratadas con altas dosis de palmitato, disminuyendo de esta manera el umbral de sensibilidad apoptótica. Estos resultados indican que el RSV tiene la capacidad de promover cambios en varios mecanismos moleculares que pueden ser potenciados cuando aumenta la cantidad de palmitato.

Además, el cotratamiento con RSV disminuyó la producción intracelular de ROS en células sobrecargadas con palmitato en los experimentos de 8 h (figura **26d**) y 28 h (figura **27d**), efecto que fue el esperado debido a la naturaleza antioxidante del RSV (71).

No se puede descartar que parte de la señalización apoptótica desencadenada por el palmitato pueda ser mediada por la generación de ROS pero la capacidad antioxidante del RSV y “la reversión del fenotipo” celular inducido por un compuesto no antioxidante, el TO-901317, pone de relieve que una parte importante de la señalización celular activada por la caspasa-3 en respuesta al tratamiento con polifenol + palmitato podría derivarse de mecanismos de estrés de RE. Este hallazgo sugiere que el RSV afecta la capacidad que posee la célula para metabolizar el palmitato. Debido a esto, nos hemos centrado en el estudio de la influencia del RSV, más que en la capacidad de destoxificación del palmitato que poseen las células HepG2.

El primer mecanismo estudiado es la acumulación de TG. Se ha observado que la acumulación del exceso de AGL en *pools* de TG podría proteger a las células no adiposas de la lipotoxicidad inducida por AG (72). Por tanto, puede que la alteración inducida por RSV de este mecanismo sea responsable de la disminución de la resistencia de las células HepG2 a la toxicidad inducida por palmitato. De hecho, algunos estudios previos han mostrado que el RSV es capaz de reducir el contenido de TG en células y animales tratados con palmitato, y que este efecto es mediado por la inhibición de SREBP-1c mediante las vías de señalización Sirt1-FOXO1 (68,73). También hemos observado este efecto antilipogénico descrito anteriormente. En todos los

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cotratamientos RSV-palmitato mencionados (figuras **26d**, **28a** y **32c**), el RSV es capaz de reducir la acumulación lipídica en células HepG2 tratadas con palmitato, resultado que concuerda con el efecto antilipogénico del RSV descrito por otros investigadores (74,75). Además, en células preincubadas con RSV durante 20 h (experimento 28h), el contenido intracelular de TG se redujo para todas las dosis ensayadas de palmitato; en cambio, en el experimento 8 h sólo se redujo significativamente para la dosis de 0.75  $\mu$ M palmitato, sugiriendo que la preincubación con RSV puede ser útil para potenciar su efecto antilipogénico. En definitiva, no se puede descartar la posibilidad de que parte de la toxicidad inducida por este polifenol en células tratadas con palmitato sea debida a una modificación en la capacidad celular para almacenar AGL en forma de TG. No obstante, parece poco probable que un ligero descenso en este mecanismo pueda ser la única explicación del importante impacto que tiene el RSV en la UPR.

Alternativamente, el tipo de AG exógenos aportados por la dieta o la actividad alterada de enzimas metabolizadoras de lípidos, como las desaturasas de AG, podrían afectar a la composición de AG de los fosfolípidos de membrana (70). Concretamente, el palmitato es capaz de inducir citotoxicidad mediante la producción ROS o la síntesis de ceramida y también, actuando directamente a nivel de RE. Se ha observado que el palmitato es incorporado rápidamente a los componentes lipídicos del RE, perjudicando tanto la estructura como la integridad del RE (76); de este modo, el RE tiene un papel importante en la toxicidad inducida por palmitato. Para intentar explicar la contribución del RSV en factores que puedan potenciar los efectos producidos por el palmitato, nos hemos centrado en tratar los factores que modulan el ratio SFA/MUFA en la membrana celular. SCD1 es una desaturasa que se expresa principalmente en el RE y, además, tiene un papel protector en la toxicidad inducida por palmitato (69). Los sustratos de desaturación preferidos por la SCD1 son el palmitoil-CoA y el estearoil-CoA, los cuales son convertidos a palmitoleoil-CoA (16:1) y oleil-CoA (18:1), respectivamente. Estos AG son componentes imprescindibles de fosfolípidos, TG y ésteres de colesterol de la membrana celular. Adicionalmente, alteraciones en la composición de fosfolípidos determinan la fluidez de membrana, y cambios en ésteres de colesterol y TG pueden afectar al metabolismo de lipoproteínas y a la adiposidad (77). Nuestros resultados indican que el RSV perjudica la sobreexpresión

sión del mRNA de SCD1 inducida por palmitato a altas dosis (0.75 y 1 mM) y que este efecto está correlacionado con la fuerte activación de mecanismos de estrés de RE, tales como el splicing de XBP1, CHOP y la posterior activación de mecanismos apoptóticos (figuras 27 y 28). Sin embargo, se observan cambios muy pequeños a nivel proteico. Hay una buena correlación entre el contenido de mRNA y el de proteína de SCD1 en muestras tratadas con palmitato pero una ausencia de cualquier disminución en las muestras proteicas tratadas con palmitato + RSV. Este resultado sugiere que el RSV actúa sobre SCD1 no sólo a nivel transcripcional sino también a nivel posttraduccional. Ajmo *et al.* (78) estudiaron los efectos del RSV en un modelo *in vivo* de esteatosis alcohólica en hígado y revelaron que el RSV (200 y 400 mg/Kg de peso corporal) reducía los niveles de RNA mensajero de SCD1, incluso en los ratones del grupo control. Sin embargo, no se llevaron a cabo estudios de expresión de proteína. Por otro lado, Kato *et al.* han descrito un mecanismo de degradación de SCD1 dependiente del sistema ubiquitina-proteosoma (79). Estos investigadores concluyeron que la proteína SCD1 tiene un tiempo de vida media corto (~ 3 horas) y es degradado constitutivamente en el RE por el sistema ubiquitina-proteosoma, y que la presencia de inhibidores del proteosoma aumentan el tiempo de vida media de SCD1 hasta ~ 6 horas, forzando la acumulación de la desaturasa poliubiquitinada en el RE y la interacción con ATPasa p97, la cual participa en la ERAD. En relación a esto, se ha propuesto que el RSV podría ser un inhibidor del proteosoma (80) y como consecuencia de los resultados obtenidos en este trabajo nos planteamos si la presencia del polifenol podría ejercer un efecto regulador de la enzima adicional al llevado a cabo a nivel transcripcional. Por lo tanto, el destino intracelular de la proteína de SCD1 podría estar alterado debido al tratamiento con RSV, promoviendo la acumulación de la enzima SCD1 en el RE haciéndola menos disponible para interaccionar con su sustrato.

La idea de que el RSV modifica críticamente el grado de insaturación de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana y consiguientemente la UPR en células tratadas con palmitato, fue corroborada con la observación de que la lipotoxicidad puede ser revertida tanto con la suplementación de EPA como con el tratamiento con el agonista de LXR (el cual induce la sobreexpresión de SCD1). Ambos enfoques

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

experimentales restauran la homeostasis de HepG2 pese a la presencia de palmitato, reforzando la idea de que la inhibición de SCD1 mediada por RSV podría ser un factor clave en la agravación de la citotoxicidad inducida por palmitato debida a una posible rigidez de la membrana.

Estos tratamientos también podrían promover otros efectos como la acumulación de TG (también llamados lípidos neutros), canalizando el exceso de AGL hacia el almacenamiento en forma de TG. Sin embargo, hay que tener en cuenta que se ha descrito que tanto RSV como EPA son capaces de inhibir la expresión de SREBP1c, factor de transcripción capaz de reprimir la acumulación de TG. Por lo tanto, se esperaría que la modulación de la rigidez de membrana fuera más importante que el efecto hipotético de los lípidos neutros para explicar el efecto del RSV en las células hepáticas.

Ya se había descrito en otros trabajos que la inhibición de SCD1 lleva a la muerte celular por apoptosis en diferentes células cancerosas (70,81-84) pero, en este trabajo, se describe por primera vez que una dosis subtóxica de RSV promueve estos efectos citotóxicos en células transformadas en un medio celular rico en palmitato y que este efecto es mediado por mecanismos de estrés de RE, los cuales son desencadenados como consecuencia de la inhibición de SCD1 mediada por este polifenol. En la figura **33**, se propone un modelo para describir la situación. Primero, en presencia de sobrecarga de palmitato, las células no adiposas, tales como las células HepG2, son parcialmente capaces de utilizar esta gran cantidad de AGL saturados mediante: (1) el uso de este compuesto vía  $\beta$ -oxidación o (2) la activación de mecanismos de esterificación que pudieran encauzar el palmitato hacia la acumulación de lípidos neutros o la composición de AG de los fosfolípidos de membrana. Además, en esta situación hay una moderada señalización de muerte celular mediada por la síntesis de ceramidas, producción de ROS y estrés de RE (figura **33a**, estado equilibrado SFA/MUFA). Segundo, en presencia de RSV y palmitato, el polifenol inhibe SCD1 (mediado potencialmente por la disminución de SREBP1c), y esto lleva a la alteración de algunos mecanismos compensatorios de la sobrecarga de AGL. Con respecto a la composición de membrana, el RSV estimularía la rigidez de la membrana en este medio rico en AGL mediante la inhibición de SCD1, desencadenando una acentuación

del estrés de RE y una activación posterior del proceso apoptótico, mediado principalmente por esta señalización del RE. En esta situación, se cree que la contribución de ROS en el proceso apoptótico es menos importante debido a la naturaleza antioxidante del RSV (figura **33b**, estado desequilibrado SFA/MUFA). Finalmente, en presencia de AG  $\omega$ -3 EPA o del agonista de LXR TO-901317, el efecto inhibitorio de RSV es omitido principalmente mediante la restauración de la fluidez de membrana, hecho que comporta una disminución importante de la saturación de la membrana debido a: (1) la reactivación de los mecanismos compensatorios por sobrecarga de AGL, tales como la recuperación de los niveles de SCD1 por TO-901317, y (2) el enriquecimiento de la insaturación de la membrana mediante la suplementación con AG  $\omega$ -3 (figura **33c**, estado reequilibrado SFA/MUFA).

A diferencia de los resultados presentados en este trabajo, Jung *et al.* (85) describieron que la acumulación de SIRT-1 reduce el estrés de RE y la resistencia a insulina en células HepG2 tratadas con palmitato. Éstos muestran que dosis crecientes de RSV (que van desde 5 a 100  $\mu$ M) son capaces de disminuir la expresión de CHOP y el concomitante estrés de RE en células HepG2 tratadas con 0.2 mM palmitato durante 24 h. No obstante, en el trabajo de esta tesis, se ha descrito que el tratamiento con 100  $\mu$ M RSV (figura **24**) aumenta considerablemente el splicing de XBP1 y la expresión de CHOP. Además, también se observó una inducción de la UPR (splicing de XBP1 y expresión de CHOP) en coinubaciones con una dosis fija de palmitato (0.25 mM) y concentraciones crecientes de RSV (figura **32**). En relación al ratio palmitato:BSA utilizado, en los experimentos de esta tesis el ratio AGL:BSA fue de 7:1, el cual corresponde a un modelo de estado patofisiológico en el que existe una alta concentración de AGL (86,87). Por otro lado, Juno *et al.* además de otros autores han mostrado que una concentración baja de AGL (ratio AGL:BSA de 2:1) diseñado para mimetizar estados fisiológicos normales es capaz de inducir estrés de RE y procesos apoptóticos. De este modo, el único argumento para explicar estas diferencias, a parte de la manera en la que el palmitato es presentado a la célula, es el tratamiento de RSV. En el trabajo de Juno *et al.*, pese a que los tratamientos con RSV son utilizados únicamente para sobreexpresar la chaperona ORP150, hecho que sirve para justificar la atenuación del efecto del palmitato, ni la citotoxicidad ni los marcadores de estrés

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de RE clásicos son utilizados para estudiar las mismas muestras. Por consiguiente, la falta de datos en referencia a los efectos del RSV en los mecanismos relacionados con estrés de RE y la citotoxicidad en el modelo HepG2 desarrollado por Juno *et al.*, nos lleva a evitar más comparaciones con los resultados del presente trabajo.

Todavía no se han realizado cultivos primarios en hepatocitos para evaluar el efecto del RSV en células no transformadas expuestas a dosis crecientes de palmitato pero otros autores (82) han mostrado evidencias de que células normales y cancerosas no responden de la misma manera a la inhibición de la síntesis de MUFA vía inhibición de SCD1 mediada por siRNA. Estos autores observan que mientras las células cancerosas mueren debido a la disminución de SCD1, las células no cancerosas podrían sobrevivir en esta misma situación, sugiriendo que la viabilidad de células no cancerosas permanecería inalterada porque no requieren un nivel tan intenso de síntesis de MUFA.

En resumen, la interacción de un polifenol con AGL saturados podría inducir un potente efecto citotóxico en una línea celular cancerosa. Pese a que el RSV es capaz de inducir estrés de RE a altas dosis (tales como 100  $\mu$ M), también posee otros efectos a dosis bajas (25  $\mu$ M) como la promoción de la muerte celular en células cancerosas sobrecargadas con palmitato. Estos resultados podrían tener implicaciones clínicas de varios tipos: (a) este efecto aditivo podría explotarse para aprovechar la baja biodisponibilidad del RSV (88,89) porque es posible promover la toxicidad asociada al RSV en células cancerosas expuestas a un medio rico en AGL saturados; y (b) los resultados destacan el hecho de que la inhibición mediada por RSV de la síntesis *de novo* de MUFA mediante la represión específica de SCD1 en un contexto celular de AG saturados pudiera representar una hipotética aproximación anticancerosa que implicara la inducción de la muerte celular mediante la activación de la UPR.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

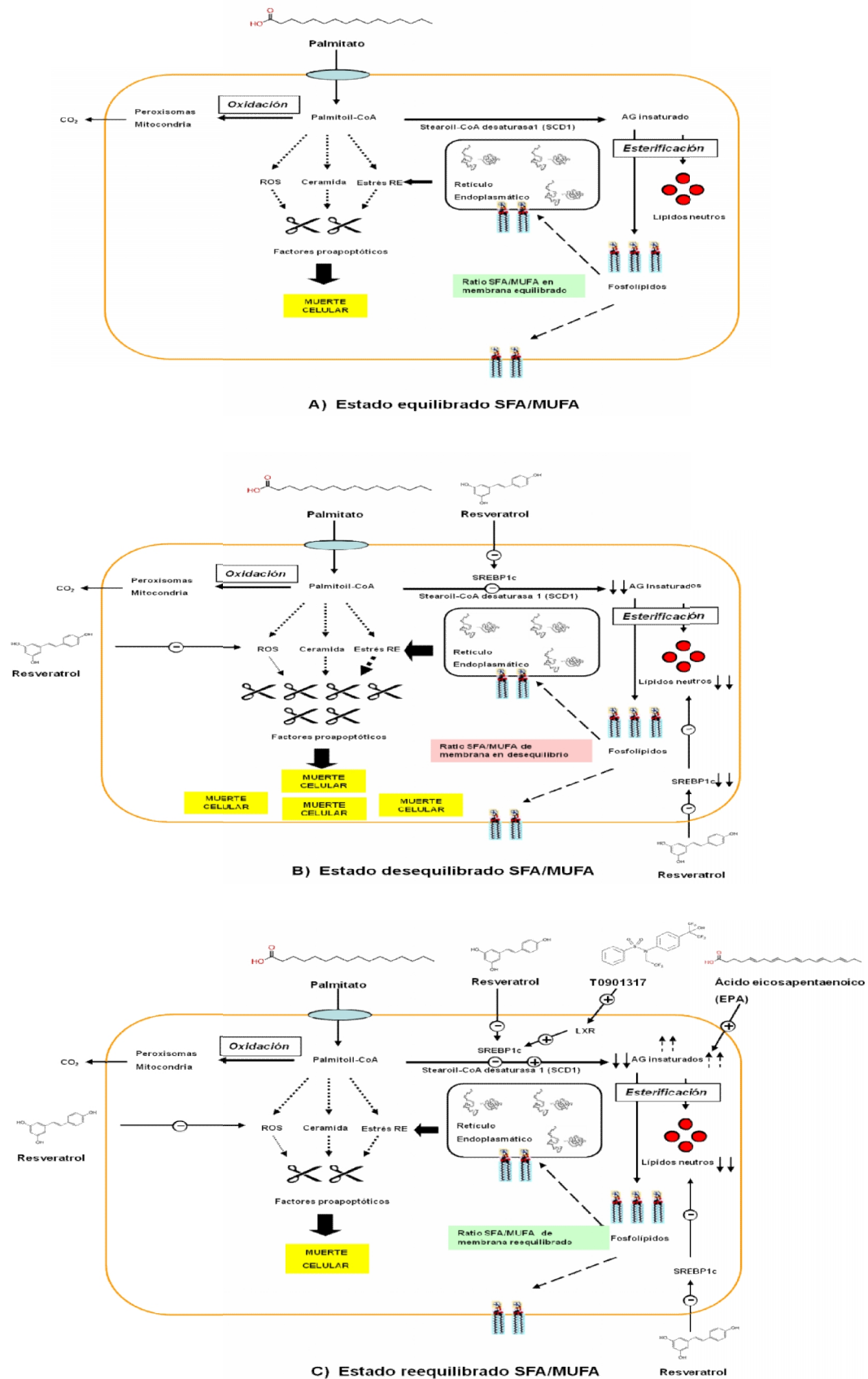


Figura 33. Modelo hipotético del efecto del RSV en el estado SFA/MUFA de células HepG2 tratadas con palmitato.

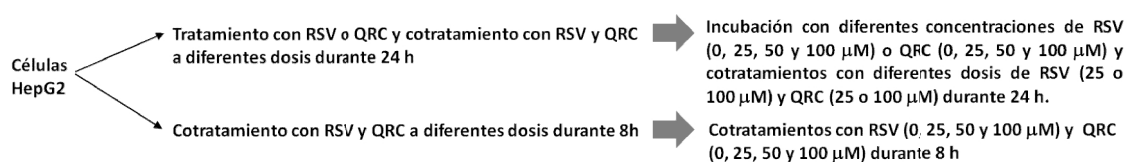
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.2.1.2 Bloque II. Tratamientos agudos con quercetina y/o resveratrol

#### Antecedentes

Se ha descrito previamente que la quercetina (QRC) suprime la inducción de la expresión de GRP78 y el splicing de XBP1 por parte de algunos inductores clásicos de estrés de RE en líneas celulares humanas de cáncer de colon (51). En consecuencia, se ha planteado realizar el bloque II de experimentos con el propósito de conocer si la QRC es capaz de reducir también la UPR inducida por el RSV en células HepG2.

En la figura 13 se esquematizan los experimentos realizados en este bloque II.



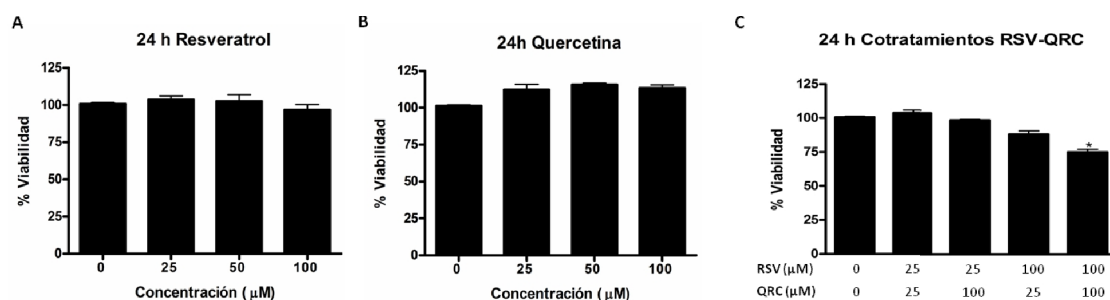
**Figura 13. Experimentos agudos con quercitina y/o resveratrol (bloque II).** El vehículo del RSV fue el etanol al 0,1 % y el de la QRC fue el 0,4 % DMSO.

A continuación, se detallarán los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos realizados y, finalmente, se realizará una discusión general.

## Resultados

### Tratamiento con RSV o QRC y cotratamiento con RSV y QRC a diferentes dosis durante 24 h

Individualmente, ni el RSV ni la QRC disminuyeron la viabilidad de células HepG2 en tratamientos de 24 h (figura 34a-b). Solamente el cotratamiento con 100 µM RSV + 100 µM QRC (Figura 34c) mostró una disminución significativa de la viabilidad celular de aproximadamente un 75 % ( $p < 0.05$ ).



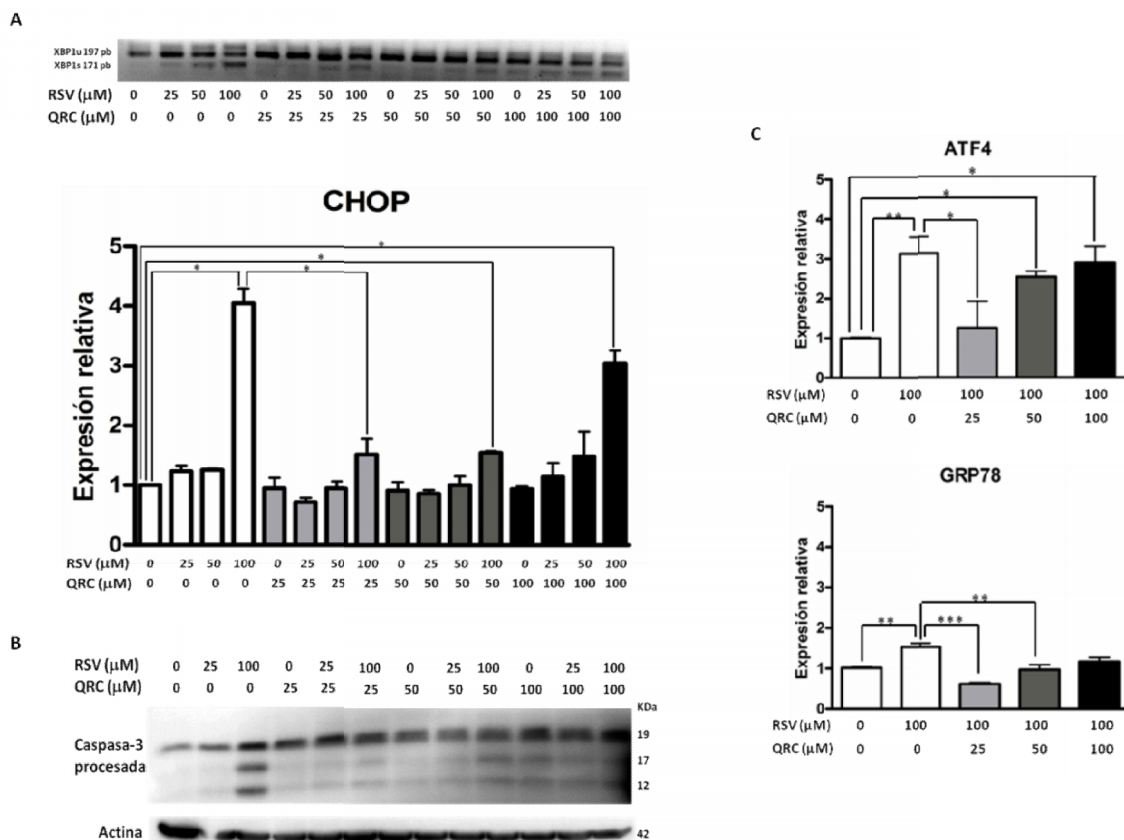
**Figura 34. Efecto del resveratrol (RSV), la quercetina (QRC) y cotratamientos RSV-QRC durante 24 h en la viabilidad de células HepG2.** Se utilizó el ensayo de MTT para evaluar la muerte celular (expresado como porcentaje de la viabilidad celular) de células HepG2 incubadas con dosis crecientes (25-100 µM) de RSV (A), con dosis crecientes (25-100 µM) de QRC (B) o cotratadas con diferentes dosis (25 o 100 µM) de RSV y QRC (C). Los datos expresan la media del % viabilidad celular  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas relativas al control (vehículo o vehículos) fueron analizadas mediante ANOVA de un factor seguido de test post hoc de Bonferroni: \* $p < 0.05$ .

### Cotratamiento con RSV y QRC a diferentes dosis durante 8h

En la figura 35a se observa que dosis de QRC de 25 y 50 µM disminuyeron el splicing de XBP1 inducido por concentraciones crecientes de RSV (25-100 µM). En cambio, la dosis de 100 µM QRC aumentó el producto de splicing. Esta misma figura también muestra que la QRC (25-100 µM) redujo la expresión de CHOP en células tratadas con RSV (25-100 µM). La reducción de la expresión de este marcador génico ( $4.04 \pm 0.43$  vs  $1.52 \pm 0.45$ ;  $p < 0.05$ ; máxima diferencia de expresión relativa entre muestras tratadas con RSV y muestras tratadas con RSV + QRC) fue significativa en células cotratadas con dosis crecientes de QRC (25, 50 y 100 µM) y una dosis fija de 100 µM RSV en comparación con células tratadas solamente con 100 µM RSV.

Asimismo, como se muestra en la figura 35b, en células tratadas con RSV, la QRC revirtió el aumento de la forma procesada de la caspasa-3. Por tanto, se puede recalcar que la QRC (25 o 50 µM), de manera individual, no indujo estrés de RE ni apoptosis en tratamientos de 8 h.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 35. La QRC disminuye el estrés de RE y la apoptosis inducidos por el RSV.** Se realizaron cotratamientos con RSV (0, 25, 50 o 100 μM) y QRC (0, 25, 50 o 100 μM) durante 8h. Como vehículos del RSV y de la QRC se utilizaron 0.1 % etanol y 0.8 % DMSO, respectivamente. A) Splicing de XBP1 (imagen representativa de tres experimentos independientes) y niveles de expresión génica de CHOP. Los resultados de expresión génica representan la media de la expresión relativa ± DE de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas en relación al control (vehículos) o a la muestra 100 μM RSV fueron analizadas mediante ANOVA de un factor seguido por tests post hoc de Games-Howell: \*P<0.05. B) Análisis de la caspasa-3 por Western blotting. Se prescindió de las muestras cotratadas con 50 μM RSV y concentraciones crecientes de QRC. El procesamiento de la Caspasa-3 da lugar a 3 fragmentos: 12, 17 y 19 kDa; el peso molecular de la actina es de 42 kDa. El blot mostrado es una imagen representativa de tres experimentos independientes. C) Niveles de expresión génica de ATF4 y GRP78. Sólo se realizó el análisis de la expresión génica de ATF4 y GRP78 de muestras cotratadas con 100 μM RSV y dosis crecientes de QRC (25-100 μM). Los resultados representan la media de la expresión relativa ± DE de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas en relación al control (vehículos) o a la muestra 100 μM RSV fueron analizadas mediante ANOVA de un factor seguido por tests post hoc de HSD Tukey: \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01 and \*P<0.05.

Por otro lado, células cotratadas con dosis crecientes de QRC (25, 50 y 100 μM) y una dosis fija de 100 μM RSV (figura 35c) experimentaron una reducción de la expresión génica de ATF4 ( $3.13 \pm 0.72$  vs  $1.85 \pm 1.16$ ;  $p < 0.05$ ; máxima diferencia de expresión relativa entre muestras tratadas con RSV y muestras tratadas con RSV + QRC) y GRP78 ( $1.53 \pm 0.16$  vs  $0.62 \pm 0.06$ ;  $p < 0.001$ ; máxima diferencia de expresión relativa entre muestras tratadas con RSV y muestras tratadas con RSV + QRC) en comparación con

células tratadas solamente con 100  $\mu\text{M}$  RSV. De este modo, los resultados de expresión de ATF4 y GRP78 concuerdan con los obtenidos para CHOP (figura 35a).

## Discusión

En general, los resultados sugieren que la QRC reduce el estrés de RE (splicing de XBP1 y expresión de CHOP, ATF4 y GRP78) y la apoptosis (forma procesada de la caspasa-3) inducidas por RSV en células HepG2 (Figura 35 y tabla 8). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Natsume *et al.* y Yu *et al.*, en células de cáncer de colon y células hepáticas Huh7, respectivamente (51)(90).

Parámetro estudiado	Tratamientos				
	100	100	100	100	RSV ( $\mu\text{M}$ )
	0	25	50	100	QRC ( $\mu\text{M}$ )
CHOP	▲▲▲	▲	▲	▲▲	
GRP78	▲▲	▼	▲	▲	
ATF4	▲▲▲	▲	▲▲	▲▲▲	
Splicing XBP1	▲▲▲	▲	▲▲	▲▲	
Caspasa-3 procesada	▲▲▲	▲	▲▲	▲▲	

Tabla 8. Resumen de los resultados obtenidos en el bloque II.

En el presente trabajo se ha observado también que una baja concentración de QRC (25 y 50  $\mu\text{M}$ ) inhibe los marcadores de la UPR de una manera más potente que una alta dosis (100  $\mu\text{M}$ ). Por tanto, el efecto de la QRC sobre el estrés de RE y la apoptosis depende de la dosis aplicada a las células. En este contexto, se ha descrito que una alta concentración de QRC (100-150 $\mu\text{M}$ ) puede tener un efecto adverso (aumento de los niveles de splicing de XBP1, eif2 $\alpha$ -P y GRP78) (51). Adicionalmente, Granados *et al* observaron un efecto de prosupervivencia en células HepG2 tratadas con una baja concentración de QRC debido a un aumento de AKT-P (molécula antiapoptótica) (91). Al parecer la QRC podría ejercer dos efectos diferentes en la célula en función de la dosis utilizada: i) una mejora en la regulación del Ca<sup>2+</sup> a concentraciones bajas de QRC (vía de prosupervivencia) o, ii) una inhibición de la bomba ATPasa de Ca<sup>2+</sup> del

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RE/sarcoplásmico (SERCA) a altas concentraciones que podría ser irreversible en caso de que la inducción de estrés de RE fuera prolongada (vía proapoptótica). Por otro lado, la estimulación de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) puede reprimir SERCA y promover la activación posterior de IP3R, provocando la liberación de iones  $\text{Ca}^{2+}$  del RE y, en consecuencia, la activación de la UPR. En referencia a este hecho se ha descrito que la QRC inhibe la vía PI3K-Akt/PKB mejorando la regulación de la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  de manera similar al inhibidor comercial de PI3K, LY294002 (tiene una estructura similar a la QRC) (51). Por tanto, a dosis bajas de QRC se observa una reducción del estrés de RE y esto podría conducir a la supervivencia celular debido a una mejora en la regulación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la inhibición de PI3K en células HepG2. Para corroborar esta hipótesis, en un futuro, se podrían realizar cotratamientos con dosis crecientes de LY294002 y RSV para comprobar si LY294002, al igual que la QRC, es capaz de disminuir la UPR inducida por RSV.

#### 4.2.1.3 Bloque III. Experimento agudo con quercetina y/o resveratrol y/o palmitato

##### Antecedentes

En el bloque II se ha observado que la QRC se opone a la UPR desencadenada por el RSV en células HepG2. Por otro lado, se ha descrito que la QRC es capaz de reducir la acumulación de TG en el hígado de animales modelo de SM (92-94). Teniendo en cuenta la interacción de la lipogénesis con la UPR (1,2,4,11), se plantea la posibilidad de que la QRC pudiera mejorar tanto la UPR inducida por palmitato como también la desencadenada por el cotratamiento con palmitato y RSV en células HepG2.

En la figura 14 se esquematiza el experimento realizado en este bloque III.



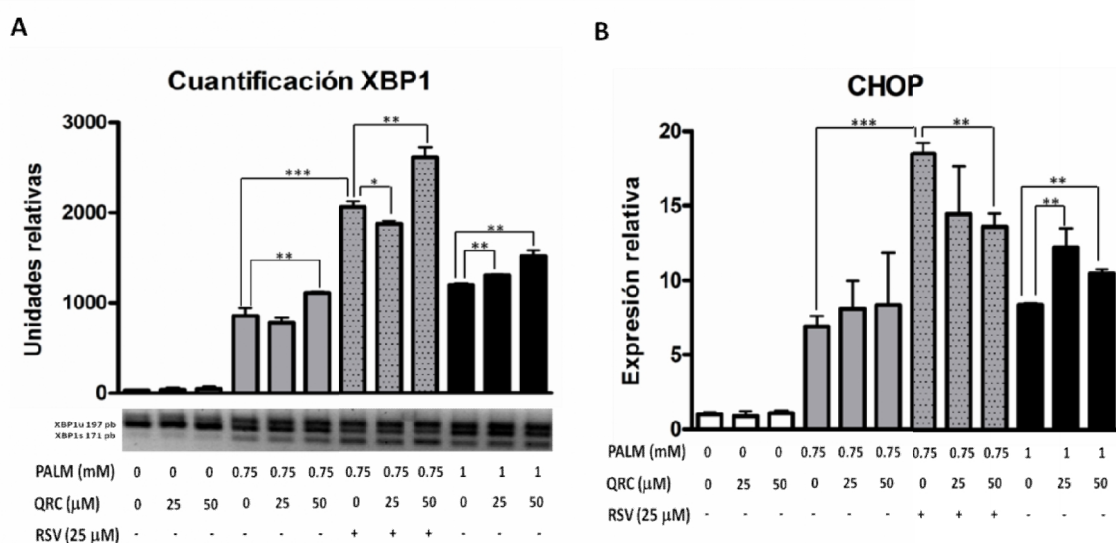
**Figura 14. Experimento agudo con quercetina y/o resveratrol y/o palmitato (bloque III).** El vehículo del RSV fue el etanol al 0,1 %, el de la QRC fue el 0,4 % DMSO y el del palmitato fue el BSA al 5 % en medio DMEM sin suero.

A continuación, se detallarán los resultados obtenidos en este experimento y, a continuación, se realizará una discusión.

## Resultados

### Cotratamiento con palmitato, QRC y RSV durante 8 h

La QRC (25 y 50  $\mu$ M) aumenta el splicing de XBP1 (figura 36a) y la expresión de CHOP (figura 36b) en células HepG2 tratadas con 1 mM palmitato. Además, la dosis de 50  $\mu$ M QRC también amplifica el splicing de XBP1 inducido por 0.75 mM palmitato ( $857.40 \pm 85.30$  vs  $1110.27 \pm 11.75$ ;  $p < 0,01$ ; máxima diferencia en unidades relativas entre muestras tratadas con 0.75 mM palmitato y tratadas con 0.75 mM palmitato + 50  $\mu$ M QRC). En cambio, la dosis de 25  $\mu$ M QRC no produce un aumento del estrés de RE en células tratadas con 0.75 mM palmitato.



**Figura 36. Efectos de la QRC en el estrés de RE inducido por palmitato y por cotratamiento palmitato-RSV.** Las células HepG2 fueron lavadas dos veces con medio DMEM sin suero e incubadas con dicho tipo de medio O/N. Posteriormente, fueron cotratadas con QRC (25 o 50  $\mu$ M) y/o RSV (25 $\mu$ M) y concentraciones crecientes de palmitato (0.75 y 1 mM palmitato) durante 8 h. Como vehículos del RSV, de la QRC y del palmitato se utilizaron 0.05 % etanol, 0.4 % DMSO y 5 % BSA, respectivamente. A) Splicing XBP1. Imagen representativa de tres experimentos independientes. Cuantificación densitométrica del splicing de XBP1. Los resultados representan la media de las unidades relativas  $\pm$  SD. B) Niveles de expresión génica de CHOP. Los resultados representan la media de la expresión relativa  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas fueron analizadas con tests T-Student de muestras apareadas: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$ .

También se ha observado que la dosis de 25  $\mu$ M QRC reduce significativamente el splicing XBP1 inducido por palmitato + RSV ( $2063.53 \pm 63.34$  vs  $1871.02 \pm 38.46$ ;  $p < 0.05$ ;

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

máxima diferencia en unidades relativas entre muestras tratadas con 0.75 mM palmitato + RSV y tratadas con 0.75 mM palmitato + RSV + 25  $\mu$ M QRC). En cambio, la dosis de 50  $\mu$ M QRC, por un lado, incrementa el splicing de XBP1 y, por el otro, disminuye la expresión de CHOP (21.14 $\pm$ 4.65 vs 13.57 $\pm$ 0.89;  $p < 0,01$ ; máxima diferencia de expresión relativa entre muestras tratadas con 0.75 mM palmitato + RSV y tratadas con 0.75 mM palmitato + RSV + 50  $\mu$ M QRC).

#### Discusión

La QRC no ejerce efectos atenuantes sobre la UPR inducida por el palmitato como se esperaba (figura 36 y tabla 9). De hecho, se ha observado que la QRC amplifica el estrés de RE inducido por 1 mM palmitato, al igual que se observó con el RSV en el bloque I. No obstante, sólo la dosis de 50  $\mu$ M de QRC incrementó el estrés de RE inducido por 0.75 mM palmitato. De estos resultados se desprende que la QRC disminuye el umbral de sensibilidad a UPR en células tratadas con palmitato y, que cuanto mayor es la dosis utilizada de este polifenol, menor es la concentración de palmitato necesaria para inducir estrés de RE.

No está claro el efecto que tiene la QRC en el cotratamiento palmitato-RSV ya que mientras que en la incubación con 25  $\mu$ M QRC se observa una tendencia a la reducción en los marcadores de estrés de RE estudiados, en la incubación con 50  $\mu$ M QRC estos parámetros siguen sentidos opuestos. Esto podría apuntar a que esta dosis de QRC podría estar estimulando una respuesta de prosupervivencia (o adaptativa) ya que el producto de splicing de XBP1 aumenta y también reprimiendo una respuesta pro-apoptótica debido a que la expresión de CHOP disminuye en comparación con el cotratamiento palmitato-RSV (6).

Algunos investigadores han observado que algunos flavonoides son capaces disminuir la expresión de la enzima SCD1 (95,96). Asimismo, Zhou *et al.* han hallado que la combinación de polifenoles QRC-RSV reduce la expresión génica de esta enzima en ratas tratadas con una dieta alta en grasas (información suplementaria del artículo) (94). Por otra parte, se ha descrito que niveles reducidos de SCD1 pueden potenciar el estrés de RE inducido por palmitato en células beta de páncreas (97) y adicionalmente,

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

en el bloque I de esta tesis se describió que el RSV aumenta el estrés de RE y la apoptosis mediada por palmitato mediante la represión de SCD1. Por tanto, se plantea la hipótesis de que el aumento de los marcadores de estrés de RE en los cotratamientos QRC+palmitato y RSV+QRC+palmitato respecto a las células tratadas con palmitato podría ser debido a una disminución de SCD1 al igual que se observó con el cotratamiento RSV+palmitato en el bloque I.

La sobreexpresión de CHOP indica que las células pueden estar sensibilizadas a la apoptosis, la cual podría proceder de la liberación sostenida de  $Ca^{2+}$  del RE desencadenada por el tratamiento con palmitato (inductor de estrés de RE) (66). Por otro lado, existe una relación entre la regulación de los niveles de  $Ca^{2+}$  y la actividad de PI3K. De hecho, se ha descrito que la QRC podría mejorar la dinámica intracelular de  $Ca^{2+}$  a través de la inhibición de la quinasa PI3K, la cual está involucrada en la UPR (51). Además, se ha observado que la supresión de la subunidad p110 $\alpha$  de PI3K previene la esteatosis hepática inducida por dieta alta en grasas en ratas (98). En este trabajo, la QRC no ha contrarrestado el estrés de RE inducido por el palmitato como se esperaba *a priori* y se sugiere que esto podría ser debido a un aumento de la actividad PI3K, hecho que podría desencadenar la liberación de  $Ca^{2+}$  del RE. Curiosamente, mientras que concentraciones bajas de QRC permitieron observar un efecto reductor de la UPR en células tratadas con RSV en el bloque II, este mismo efecto no ha podido ser observado en células sobrecargadas con palmitato debido, posiblemente, a una disminución del umbral de inducción de la respuesta a estrés de RE mencionado anteriormente.

Parámetro estudiado	Tratamientos						
	0	0	0	25	25	25	RSV ( $\mu$ M)
	0	25-50	50	0	25	50	QRC ( $\mu$ M)
	.75-1	1	0.75	0.75	0.75	0.75	PALM(mM)
CHOP	^	^^	^	^^^	^^^	^^	
Splicing XBP1	^	^^	^^	^^^	^^	^^^	

Tabla 9. Resumen resultados bloque III.

## 4.2.2 Experimento crónico en células HepG2

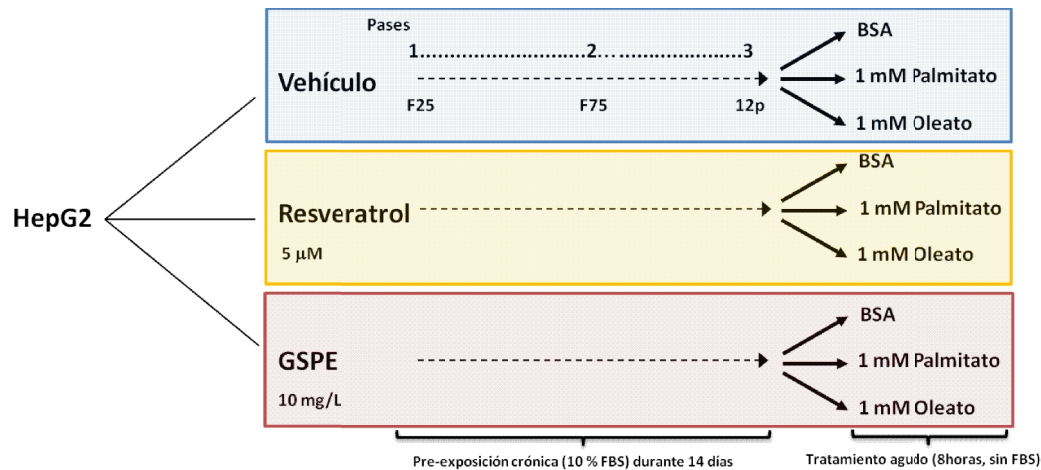
### Antecedentes

Hay estudios que avalan que el acondicionamiento con polifenoles protege a las células frente a un posterior daño por estrés oxidativo. En concreto, se ha desvelado que las proantocinidinas tienen capacidad para eliminar las ROS generadas después de isquemia-reperfusión hepática *in vitro e in vivo* (99). También, se ha observado que el acondicionamiento con algunos polifenoles como el trans-resveratrol y la QRC protege de isquemia-reperfusión hepática debido al mantenimiento de los niveles de GSH y, a la inducción de los enzimas SOD y catalasa (100).

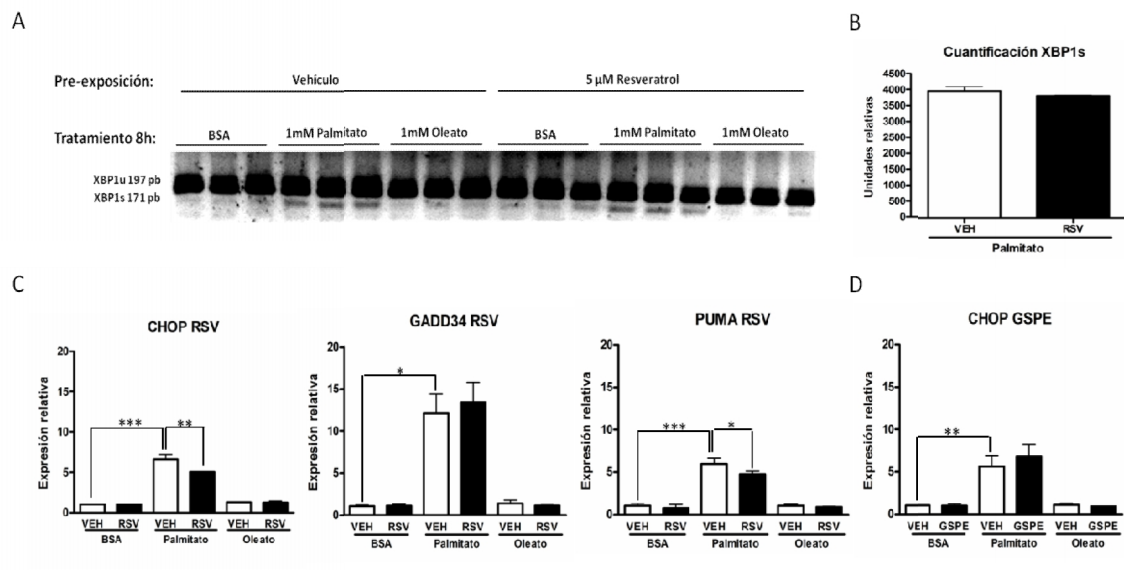
El objetivo de este experimento ha sido estudiar si el acondicionamiento crónico con dosis fisiológicas de polifenoles puede servir para proteger a células HepG2 de la respuesta a estrés de RE ocasionada por un posterior tratamiento agudo inductor de estrés de mayor magnitud (en este caso, el palmitato). Rutkowski *et al.* demostraron que la exposición crónica de las células a bajas dosis de inductores de la UPR clásicos (tunicamicina y thapsigargina) protegía a éstas de la respuesta a estrés de RE y apoptosis inducida por un daño agudo posterior (101). Posteriormente, otros autores observaron una reducción de la respuesta a estrés de RE a palmitato tras la exposición crónica a bajas dosis de AG en células HepG2 (102).

En este experimento crónico (figura 15), se dividieron las células en 3 grupos en función del tipo de pretratamiento a las que fueron sometidas durante 14 días: vehículo (0.05 % de etanol), 5 µM de resveratrol o 10 mg/L de GSPE. Posteriormente, cada uno de estos grupos de células fueron divididos en 3 subgrupos dependiendo del tipo de tratamiento agudo de 8h que recibirían posteriormente: BSA (albúmina de suero bovino), 1 mM de Palmitato o 1 mM de Oleato. Los grupos BSA y Oleato son controles negativos de este experimento. El Oleato es un AG monoinsaturado que no induce estrés de RE (60).

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 15. Diseño experimental.** F25 y F75 son frascos de cultivo de células de 25 mL y 75 mL, respectivamente; 6p, placa de cultivo de 12 pozos.



**Figura 37. Experimento crónico en células HepG2.** Tratamiento crónico de 14 días con una concentración fisiológica de polifenol (GSPE o resveratrol) y un posterior tratamiento agudo inductor de estrés de RE (palmitato) durante 8 h. A) Splicing de XBP1. XBP1u (XBP1 no procesado) es un amplicón de 197 pb; XBP1s (XBP1 procesado) es un amplicón de 171 pb). Imagen representativa de 3 experimentos independientes. B) Cuantificación densitométrica del splicing de XBP1; VEH y RSV corresponden a vehículo y resveratrol, respectivamente. Los resultados representan la media de las unidades relativas  $\pm$  DE. No hay diferencias significativas. C) Niveles de expresión génica de CHOP, GADD34 y PUMA de células HepG2 precondicionadas con resveratrol. Los resultados representan la media de la expresión relativa  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticas entre Palmitato VEH vs BSA VEH y entre Palmitato RSV vs Palmitato VEH han sido analizadas mediante ANOVA de un factor seguido con un test post hoc de T3 de Dunnet para la expresión génica de CHOP y GADD34 o, seguido de un test post hoc de DMS para la expresión génica de PUMA; \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*  $p < 0.05$ . D) Niveles de expresión génica de CHOP de células HepG2 precondicionadas con GSPE. Los resultados mostrados representan la media de la expresión relativa  $\pm$  DE, de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticas entre Palmitato VEH vs BSA VEH y entre Palmitato GSPE vs Palmitato VEH han sido analizadas mediante ANOVA de un factor seguido de un test post hoc de T3 de Dunnet; \*\*  $P < 0.01$ .

## Resultados

Las células HepG2 preexpuestas con vehículo (VEH) y posteriormente tratadas durante 8 h con palmitato mostraron un aumento del splicing de XBP1 y de la expresión génica de CHOP (expresión relativa  $6.61 \pm 0.56$  vs  $1.02 \pm 0.01$ ;  $p < 0.001$ ), GADD34 (expresión relativa  $12.14 \pm 2.21$  vs  $1.01 \pm 0.15$ ;  $p < 0.05$ ) y PUMA (expresión relativa  $6.01 \pm 0.63$  vs  $1.03 \pm 0.29$ ;  $p < 0.001$ ) respecto a las preexpuestas con VEH y tratadas durante 8 h con BSA (figura **37a, b y c**).

En cambio, las células preconditionadas con resveratrol (RSV) y tratadas de forma aguda con palmitato no mostraron cambios en los niveles de splicing respecto a las células preexpuestas con VEH y tratadas durante 8 h con palmitato (figura **37a y b**). Como era de esperar, apenas se observa producto de splicing XBP1 (no cuantificable) en el resto de grupos, BSA y Oleato, preconditionados con VEH y RSV.

Un resultado muy interesante es que en células preexpuestas con RSV y tratadas durante 8 h con palmitato (figura **37c**) disminuyó la expresión de CHOP (expresión relativa  $5.05 \pm 0.02$  vs  $6.61 \pm 0.56$ ;  $p < 0.01$ ) y PUMA (expresión relativa  $4.77 \pm 0.36$  vs  $6.01 \pm 0.63$ ;  $p < 0.05$ ) respecto a células preexpuestas con VEH y tratadas durante 8 h con palmitato; en cambio, se observó una tendencia ascendente en la expresión de GADD34.

Por otro lado, tras el tratamiento con palmitato, la expresión génica de CHOP aumentó pero no de manera significativa en las células preconditionadas con GSPE respecto a las preconditionadas con VEH (figura **37d**). En este caso, la expresión de CHOP también aumentó en células pretratadas con VEH y tratadas de forma aguda con palmitato respecto a las controles (expresión relativa  $5.60 \pm 1.27$  vs  $1.01 \pm 0.05$ ;  $p < 0.01$ ).

## Discusión

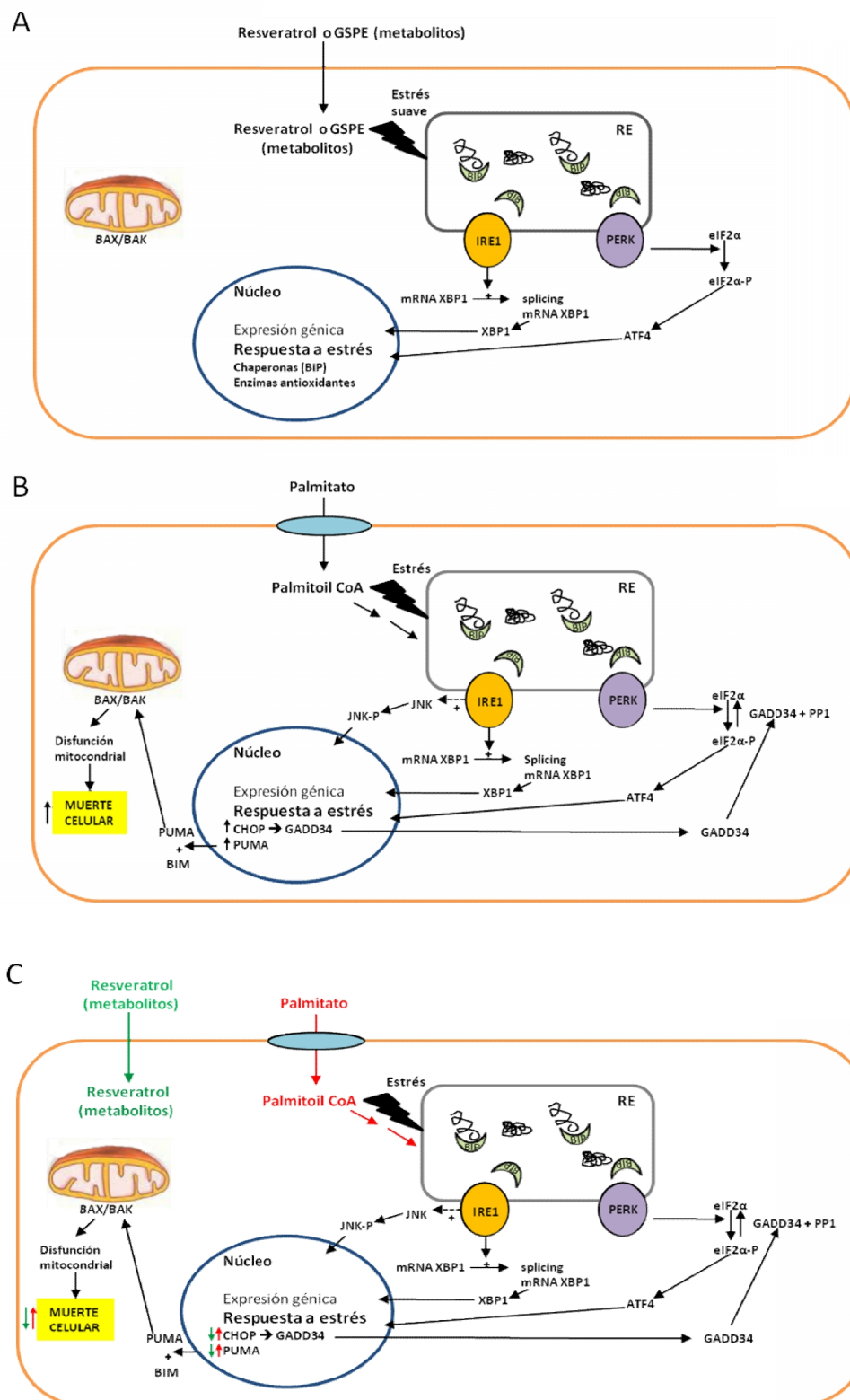
El fenómeno del acondicionamiento se basa en que la preexposición a una forma de estrés determinada (estrés oxidativo, estrés de RE...) es capaz de proteger a la célula frente a un estrés posterior de mayor magnitud (101). Por ejemplo, se ha descrito que células epiteliales de riñón LLC-PK<sub>1</sub> preexpuestas a diferentes inductores clásicos de estrés de RE resultaron resistentes al posterior daño celular inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (103). También se ha observado que la exposición a repetidas dosis subtóxicas de ozono contribuye a la adaptación de las células a estrés oxidativo. Gultekin *et al.* pusieron en evidencia que el acondicionamiento oxidativo con ozono en ratas aumenta la actividad de enzimas antioxidantes como GSH (glutati6n), SOD (super6xido dismutasa) y CAT (catalasa), y protege al huésped del daño ocasionado por la producci6n de ROS debido a la exposici6n posterior a radiaci6n ionizante (104). En nuestro caso, el acondicionamiento con polifenoles pretendi6 desencadenar un tipo de respuesta adaptativa en la c6lula, de manera que se permitiera una inducci6n suave de los sensores de estrés de RE (figura 38a). La se1alizacion *downstream* de cada uno de estos sensores converge en el n6cleo para inducir la expresi6n g6nica de prote6nas implicadas en el plegamiento proteico en el RE (chaperonas como GRP78/BiP) y de enzimas con capacidad antioxidante con la finalidad de suprimir la activaci6n de la UPR (atenuaci6n de los sensores) y facilitar la adaptaci6n a las sustancias suministradas (101). Por tanto, la respuesta adaptativa a estrés de RE se basa en el mantenimiento de la expresi6n de prote6nas que facilitan la supervivencia celular y en la disminuci6n de los niveles de las prote6nas proapopt6ticas CHOP y de sus dianas (como por ejemplo, GADD34), a la vez que se atenúa la activaci6n de la UPR.

Despu6s del est6mulo agudo con palmitato en c6lulas HepG2 preexpuestas con VEH se observ6 un aumento de todos los marcadores de estrés de RE estudiados: el splicing de XBP1 y, las mol6culas proapopt6ticas CHOP, GADD34 y PUMA (figura 37). En este caso, los factores de transcripci6n XBP1 y ATF4 activan la expresi6n de genes relacionados con la adaptaci6n a la respuesta a estrés de RE pero esta acci6n resulta insuficiente para contrarrestar la respuesta proapopt6tica desencadenada por el palmitato, el cual es un potente inductor de estrés. En la figura 38b se esquematizan las dos v6as proapopt6ticas estudiadas: la v6a de CHOP y la v6a IRE1 $\alpha$ . En la v6a de CHOP,

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ATF4 estimula la expresión de CHOP y éste, a su vez, induce transcripcionalmente la expresión génica de GADD34, molécula capaz de desfosforilar eIF2 $\alpha$  y, de este modo, reanudar la traducción normal de proteínas (6). En la vía de IRE1 $\alpha$ , la activación de JNK también contribuye a la lipoapoptosis en el hepatocito. Concretamente, JNK-P activa PUMA y BIM (también puede ser inducido por CHOP), los cuales actúan conjuntamente para estimular la activación de BAX/BAK, desencadenando la apoptosis o muerte celular (105).

En células estimuladas de forma aguda con palmitato, el preconditionamiento con RSV no produjo cambios en el producto de splicing de XBP1 pero, en cambio, disminuyó la expresión génica de CHOP y PUMA (figura 38c; los efectos del RSV están representados en color verde). La reducción en la expresión de estas moléculas proapoptóticas refleja una atenuación de la UPR y, por tanto, una mejora en la capacidad adaptativa de estas células frente a posibles inductores de estrés. Además, la tendencia ascendente en la expresión génica de GADD34 podría conducir posteriormente a la reanudación de la síntesis proteica. Estos efectos podrían ser claves para la resolución del estrés de RE. Por lo tanto, se podría decir que el preconditionamiento con RSV ejerce un efecto protector frente al estrés de RE inducido con palmitato. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Rutkowski et al 2008 y Das *et al.* 2010. Ambos autores demostraron que la exposición crónica de las células a bajas dosis de inductores de estrés de RE es útil para proteger a éstas de la respuesta a estrés de RE y apoptosis inducidas por un daño agudo posterior (101,102). Además, según Rutkowski *et al.* el mRNA de algunas proteínas vinculadas con el plegamiento y el procesamiento proteico como GRP78/BiP tienen un tiempo de vida media más largo que CHOP y GADD34 y esto podría contribuir a la persistencia de GRP78/BiP incluso cuando la activación de UPR ha disminuido en células de cultivo primario MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) (101). De este modo, sería interesante poder realizar en un futuro una cinética de la expresión génica de CHOP, GADD34 y GRP78/BiP en células HepG2 para corroborar si los mRNA proapoptóticos son en efecto más inestables que el de GRP78/BiP, hecho que explicaría en parte la atenuación de la UPR provocada por el RSV.



**Figura 38. Resumen de los resultados del experimento crónico en células HepG2.** A) Posible pre-condicionamiento a estrés de RE con polifenoles. B) Efectos del tratamiento agudo con palmitato. C) Efectos correctores del pre-condicionamiento con resveratrol en células tratadas con palmitato; los efectos del resveratrol están representados en color verde y los del palmitato en color rojo.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por último, se ha observado una tendencia ascendente en la expresión génica de CHOP en células pretratadas con GSPE y tratadas durante 8 h con palmitato respecto a las pretratadas con VEH y tratadas de forma aguda con palmitato. CHOP fue utilizado como marcador predictivo de estrés de RE en el experimento y, por tanto, debido a que el pretratamiento con GSPE no mostró ningún efecto estadísticamente significativo a nivel de expresión de CHOP, se decidió no evaluar el resto de marcadores de la UPR. En este caso, se preconditionó las células con una mezcla compleja de diferentes compuestos puros, el extracto GSPE. En ocasiones, las combinaciones de diferentes sustancias puras o fracciones de las que está compuesto un extracto pueden tener efectos diferentes a los de una molécula pura o aislada. Por ejemplo, en experimentos agudos en células HepG2 tanto el GSPE (50 mg/mL) (28) como la forma trimérica C1 y oligómeros de proantocianidinas (25 mg/mL) inhibieron la secreción de triglicéridos y ApoB en el medio; mientras que los monómeros y dímeros B1-4 de las proantocianidinas (25 mg/mL) no produjeron cambios en estos parámetros (57,106). Por otro lado, Chuang *et al.* concluyeron que el liofilizado de uva (300 µg/mL), el cual es una matriz compleja, no previene apoptosis inducida por estrés de RE en la línea células de hepatoma humano (células Huh7) y en hepatocitos primarios de ratón; en cambio, algunas sustancias puras que conforman este extracto atenúan el estrés de RE (50). De este modo, a pesar de los resultados obtenidos con el preconditionamiento crónico con GSPE en este experimento, no se puede descartar que el preconditionamiento con las diferentes sustancias puras o fracciones que constituyen el GSPE pudiera tener algún efecto corrector sobre la UPR en células HepG2.

## ***5. RECAPITULACIÓN***



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

El estrés de retículo endoplasmático (RE) que se da debido a la dificultad de la célula de procesar el plegamiento de las proteínas recién sintetizadas lleva a la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) con la finalidad de restablecer la homeostasis en el RE. La UPR es mediada por tres sensores proteicos ubicados en la membrana del RE: PERK (*double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase*), IRE1 (*inositol-requiring protein 1 $\alpha$* ) y ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*). En ausencia de estrés de RE, los tres sensores de estrés de RE son mantenidos en un estado inactivo mediante su asociación con la chaperona GRP78/BiP. En cambio, cuando hay estrés de RE en la célula, GRP78/BiP se disocia de los sensores de estrés y se une a proteínas insuficientemente glicosiladas, mal plegadas, o no ensambladas, de este modo desencadenando la UPR. Estas tres ramas de la UPR desencadenan respuestas protectoras que sirven para limitar la carga proteica y reducir el estrés (fase adaptativa). Si el estrés de RE es excesivo o prolongado, entonces la célula activa mecanismos de muerte celular programada (apoptosis) o fase de apoptosis. La cascada apoptótica puede ser iniciada por: la vía intrínseca, la vía extrínseca y la vía de estrés de RE. Algunos mediadores de apoptosis implicados en la muerte celular asociada a estrés de RE son activados por sensores de la UPR mientras que otros están relacionados con el calcio y la homeostasis redox.

La UPR tiene un papel muy destacado en el metabolismo lipídico hepático y, en la esteatosis hepática o hígado graso no alcohólico (NAFLD), patología considerada como la manifestación hepática del síndrome metabólico (SM). La relación entre estrés de RE y NAFLD ha sido demostrada en ratones con modificaciones genéticas en: las vías de señalización de PERK/eIF2 $\alpha$ , IRE1/XBP1 y ATF6 y, en el plegamiento y en la vía de secreción de proteínas del RE. Ratones con una mutación de GADD34 en hígado (provoca reducción de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ ) mostraron una disminución de la lipogénesis hepática y una protección frente al NAFLD inducido por una dieta rica en grasas (vía PERK/eIF2 $\alpha$ ). Tras ser sometidos a estrés de RE, los hígados de animales Ire1 $\alpha$ <sup>Hep<sup>fe</sup>/-</sup> (mutación que suprime IRE1 $\alpha$ ) exhibieron esteatosis hepática y una disminución de los lípidos plasmáticos debido a la supresión la secreción de lipoproteínas que contienen ApoB. También se ha observado que la pérdida de ATF6 predispone a NAFLD inducido por estrés. La sobreexpresión de GRP78/BiP en ratones

## 5. RECAPITULACIÓN

ob/ob lleva a la mejora del estrés de RE en el hígado, asociado a una inhibición de la activación de SREBP1c mejorando la sensibilidad a la insulina y reduciendo la esteatosis hepática, mientras que la mutación de la proteína Sec61alfa1, importante en la vía de secreción del RE, provoca NAFLD en ratones alimentados con dieta alta en grasas.

Por otro lado, los polifenoles o compuestos fenólicos son compuestos que poseen uno o más anillos aromáticos unidos a grupos hidroxilo. Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados principalmente en dos grupos: en compuestos fenólicos flavonoides y no flavonoides (14). En la presente tesis nos centraremos en estudiar del grupo de los flavonoides, la quercetina y las proantocianidinas procedentes de un extracto de pepita de uva (GSPE) y, del grupo de los no flavonoides, el resveratrol. Antes de ser absorbidos, la mayoría de los polifenoles deben ser hidrolizados por enzimas intestinales o por la microflora del colon. Durante el transcurso de la absorción, los polifenoles son sometidos a diversas modificaciones; de hecho, son conjugados en las células intestinales y más tarde en hígado por metilación, sulfación y/o glucuronidación. Como consecuencia, las formas que llegan a los tejidos y a la sangre son diferentes de las que hay en los alimentos y, por ello, es difícil de identificar todos los metabolitos y de evaluar sus actividades biológicas (15). Se ha descrito que la ingestión de alimentos ricos en polifenoles está asociada a la prevención y mejora de los factores de riesgo asociados al SM (obesidad, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión y resistencia a la insulina)(19). Además, también poseen efectos anticancerosos y antiinflamatorios. Por ejemplo, en nuestro grupo de investigación se ha observado que el GSPE (25m/Kg de peso corporal/día durante 10 días) es capaz de reducir los niveles de triglicéridos postprandiales en ratas y ratones normolipidémicos, y en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas, además de disminuir también la expresión de SREBP-1 en hígado y de enzimas involucradas en la lipogénesis(57). También se ha descrito que la QRC y el RSV, entre otros polifenoles, exhiben capacidad antiproliferativa en células cancerosas. Por último, recientemente se ha publicado que los polifenoles activadores de SIRT1, como el RSV, podrían ser útiles para el tratamiento de enfermedades en las que la UPR está activada como en el NAFLD, la obesidad y la Diabetes Mellitus tipo 2 (11). A pesar del hallazgo de este

artículo, la bibliografía no es muy clara acerca del efecto que tienen los polifenoles en la respuesta a estrés de RE. Hay estudios que apoyan que los polifenoles aumentan la activación de la UPR, mientras que otros respaldan lo contrario.

En esta tesis se planteó estudiar si la capacidad de los polifenoles para reducir la acumulación lipídica inducida por el tratamiento con ácidos grasos saturados podría estar mediada en parte por una disminución en la respuesta a estrés de RE *in vivo* e *in vitro*. Por tanto, se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro* para intentar conocer mejor el efecto que tienen los polifenoles en la respuesta a estrés de RE en un contexto celular de esteatosis hepática. Dentro de los estudios *in vivo* se ha llevado a cabo un experimento crónico con GSPE y/o DHA en ratas alimentadas con dieta de cafetería (modelo de obesidad) durante 21 días. Por otro lado, se han llevado a cabo diversos experimentos *in vitro*, en células HepG2, que pueden ser clasificados en experimento crónico y en experimentos agudos. La sección de experimentos agudos ha sido subdividida en 3 bloques: Bloque I (Tratamientos agudos con resveratrol y/o palmitato), Bloque II (Tratamientos agudos con quercetina y/o resveratrol) y, Bloque III (Tratamiento agudo con quercetina y/o resveratrol y/o palmitato).

Se realizó un experimento crónico con GSPE y/o DHA en ratas alimentadas con dieta de cafetería durante 21 días. Hubo 6 grupos de ratas: Control de dieta estándar (STD), Control de cafetería (VEH-), Control de cafetería y tratamiento (VEH +), cafetería con 25 mg GSPE/Kg (GSPE), cafetería con 500 mg DHA/Kg (DHA) y cafetería con 25mg GSPE/Kg + 500 mg DHA/Kg (G + D). Se hipotetizó que la capacidad del GSPE y el DHA para reducir la acumulación lipídica inducida por una dieta de cafetería podría ser mediada en parte por una disminución en la respuesta a estrés de RE en ratas. Se obtuvieron resultados diferentes en función del tratamiento suministrado. En general, los niveles de splicing de XBP1 disminuyeron mientras que la expresión génica de GRP78, ATF4 y CHOP aumentó en ratas de los grupos DHA y G + D. Por otro lado, los niveles de eIF2 $\alpha$ -P descendieron en los animales de los grupos GSPE y G + D, hecho que podría indicar la reanudación de la síntesis proteica y la inactivación de la UPR. Por tanto, los resultados indican que el GSPE y el DHA mejoran algunos marcadores de la UPR *in vivo*, el GSPE reduciendo eIF2-P y el DHA disminuyendo el splicing de XBP1.

## 5. RECAPITULACIÓN

La realización del grupo de tratamientos agudos del bloque I pretendía determinar si la capacidad del RSV para reducir la acumulación lipídica inducida por la incubación con AGL saturados podría ser mediada en parte por una hipotética disminución en la respuesta a estrés de RE en células HepG2. Inesperadamente, pese a que una dosis subtóxica de RSV (25  $\mu\text{M}$ ) tiene capacidad antilipogénica, se ha observado que este polifenol potencia la toxicidad y la muerte celular provocadas por la incubación con palmitato. Este mecanismo está correlacionado con la inhibición de la enzima residente del RE SCD1. Además de regular el metabolismo lipídico y energético, SCD1 es importante para el equilibrio entre AG saturados y AG monoinsaturados, es decir, en el ratio SFA (*saturated fatty acids*)/MUFA (*monounsaturated fatty acids*) de los fosfolípidos de membrana. Adicionalmente, el RSV disminuye la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células tratadas con palmitato pero lleva a una amplificación del splicing de XBP1 y de la expresión de CHOP. Estos efectos moleculares son inducidos a la par que el procesamiento de la caspasa-3, sugiriendo que el RSV promueve lipoapoptosis mediante un mecanismo dependiente de estrés de RE. Además, la reversión de la lipotoxicidad inducida tanto con el AG poliinsaturado EPA o indirectamente por el agonista LXR TO-901317 sugiere que la inhibición de SCD1 mediada por RSV podría ser un factor clave en la agravación de la citotoxicidad inducida por palmitato debido a una disminución de la fluidez de membrana.

Se ha descrito que la QRC podría reducir el estrés de RE inducido por algunos inductores de estrés. Por tanto, en el bloque II se propuso que la QRC podría contrarrestar la UPR inducida por RSV. La QRC reduce el estrés de RE (splicing de XBP1 y expresión de CHOP, ATF4 y GRP78) y la apoptosis (forma procesada de la caspasa-3) inducidas por RSV en células HepG2. Se ha observado también que una baja concentración de QRC (25 y 50  $\mu\text{M}$ ) inhibe los marcadores de la UPR de una manera más potente que una alta dosis (100  $\mu\text{M}$ ). Por tanto, el efecto de la QRC sobre el estrés de RE y la apoptosis depende de la dosis aplicada a las células. De hecho, a dosis bajas de QRC se observa una reducción del estrés de RE y esto podría conducir a la supervivencia celular debido a una mejora en la regulación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la inhibición de PI3K en células HepG2.

En el bloque III se planteó la posibilidad, una vez obtenidos los resultados del bloque II, que la QRC pudiera mejorar tanto la UPR inducida por palmitato como también la desencadenada por el cotratamiento con palmitato y RSV en células HepG2. Se ha obtenido que la QRC no ejerce efectos atenuantes sobre la UPR inducida por el palmitato y no está claro el efecto que tiene la QRC en el cotratamiento palmitato-RSV pero, en general parece que la QRC disminuya el umbral de sensibilidad a UPR en células tratadas con palmitato. Estos resultados podrían ser debidos a varios factores implicados con el efecto ejercido por la QRC en la célula. Por un lado a la capacidad de algunos flavonoides como la QRC o el cotratamiento QRC+RSV para disminuir la actividad de la enzima SCD1; de este modo, el aumento de los marcadores de estrés de RE en los cotratamientos QRC+palmitato y RSV+QRC+palmitato respecto a las células tratadas con palmitato podría ser debido a una disminución de SCD1. Por el otro, la sobreexpresión de CHOP observada podría indicar que se ha producido una liberación sostenida de  $Ca^{2+}$  del RE desencadenada por el tratamiento con palmitato+QRC debido a un aumento en la actividad de PI3K, la cual está involucrada en la regulación de la UPR.

En el experimento crónico realizado en células HepG2, se indujo un suave estrés de RE mediante la administración de GSPE y RSV durante 14 días con la finalidad de que las células desarrollaran mecanismos adaptativos que les permitieran hacer frente al estrés de RE inducido por un tratamiento agudo posterior con palmitato. Se ha hallado que el acondicionamiento con RSV tiene un efecto protector frente al estrés de RE inducido con palmitato. Se cree que la reducción en la expresión de las moléculas proapoptóticas CHOP y PUMA refleja una atenuación de la UPR y, por tanto, una mejora en la capacidad adaptativa de estas células frente a posibles inductores de estrés. En cambio, las células no acondicionadas con RSV, después del tratamiento agudo con palmitato, exhibieron marcadores muy aumentados de la UPR y, en particular, mostraron una fuerte respuesta proapoptótica.

En resumen, el GSPE y el DHA mejoran algunos marcadores de la UPR *in vivo*, el GSPE reduciendo eIF2-P y el DHA disminuyendo el splicing de XBP1. Además, el RSV media represión de SCD1 en células transformadas sobrecargadas con palmitato principalmente mediante un proceso apoptótico mediado por CHOP y, por tanto, esto

## 5. RECAPITULACIÓN

podría representar una estrategia anticancerosa. Por otro lado, bajas dosis de QRC pueden disminuir la UPR inducida por el RSV pero no la inducida por palmitato o por cotratamiento palmitato-RSV. Sorprendentemente, el preconditionamiento con RSV tiene un efecto protector en células HepG2 con estrés de RE inducido por palmitato.

## ***6. CONCLUSIONES***



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

## Estudios *in vivo*

- En ratas modelo de obesidad, el DHA y el GSPE mejoran algunos marcadores de la UPR. Por un lado, el DHA reduce el splicing de XBP1 puede que debido a una mejora del plegamiento proteico. Por el otro, el GSPE disminuye la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , hecho que contribuye a la reanudación de la síntesis proteica y a la inactivación de la UPR.

## Estudios *in vitro*

### Experimentos agudos

- El RSV amplifica la respuesta a estrés de RE (splicing de XBP1 y expresión de CHOP) en células HepG2 tratadas con palmitato. Este efecto molecular es inducido a la par que el procesamiento de la caspasa-3, sugiriendo que el RSV promueve lipoapoptosis mediante un mecanismo dependiente de estrés de RE.
- La reversión de la lipotoxicidad inducida tanto con el AG poliinsaturado EPA o indirectamente por el agonista LXR TO-901317 sugiere que la inhibición de SCD1 mediada por RSV podría ser un factor clave en la agravación de la citotoxicidad inducida por palmitato debido a una disminución de la fluidez de membrana.
- En tratamientos agudos en células HepG2, la activación de la UPR desencadenada por el RSV es diferente de la ejercida por el palmitato y por el cotratamiento RSV-Palmitato ya que la QRC es capaz de disminuir el estrés de RE inducido por el RSV, de forma individual, pero no el provocado por el palmitato y por dicho cotratamiento sugiriendo que, en estos casos, pueden haber otras vías de señalización alteradas que también afecten a la UPR.

### **Experimento crónico**

- **Experimentos crónicos en células HepG2 muestran que el precondicionamiento crónico con RSV tiene un efecto protector frente al estrés de RE inducido de forma aguda con palmitato. La reducción en la expresión de las moléculas proapoptóticas CHOP y PUMA refleja una atenuación de la UPR y, por tanto, una mejora en la capacidad adaptativa de estas células frente a posibles inductores de estrés.**

## ***7. BIBLIOGRAFÍA***



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

- (1) Basseri S, Austin RC. *Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential. Biochem Res Int* 2012;2012:841362.
- (2) Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. *Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. Trends Mol Med* 2012 Jan;18(1):59-68.
- (3) Moo-Young M. *Comprehensive biotechnology. 2nd ed. Amsterdam ;Boston: Elsevier; 2011.*
- (4) Malhi H, Kaufman RJ. *Endoplasmic reticulum stress in liver disease. J Hepatol* 2011 Apr;54(4):795-809.
- (5) Ji C, Kaplowitz N. *ER stress: can the liver cope? J Hepatol* 2006 Aug;45(2):321-333.
- (6) Hetz C. *The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol* 2012 Jan 18;13(2):89-102.
- (7) Fresco P, Borges F, Marques MP, Diniz C. *The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. Curr Pharm Des* 2010 Jan;16(1):114-134.
- (8) Gonzalez-Periz A, Horrillo R, Ferre N, Gronert K, Dong B, Moran-Salvador E, et al. *Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. FASEB J* 2009 Jun;23(6):1946-1957.
- (9) Pagliassotti MJ. *Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease. Annu Rev Nutr* 2012 Aug 21;32:17-33.
- (10) Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, et al. *Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. J Nutr Biochem* 2007 Mar;18(3):184-195.
- (11) Lee AH, Glimcher LH. *Intersection of the unfolded protein response and hepatic lipid metabolism. Cell Mol Life Sci* 2009 Sep;66(17):2835-2850.
- (12) Kammoun HL, Hainault I, Ferre P, Foufelle F. *Nutritional related liver disease: targeting the endoplasmic reticulum stress. Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009 Nov;12(6):575-582.
- (13) Rutkowski DT, Wu J, Back SH, Callaghan MU, Ferris SP, Iqbal J, et al. *UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. Dev Cell* 2008 Dec;15(6):829-840.
- (14) Fraga CG. *PLANT PHENOLICS and HUMAN HEALTH Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. 1st ed. United States of America: Wiley; 2010.*

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- (15) D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita* 2007;43(4):348-361.
- (16) Stevenson DE, Hurst RD. Polyphenolic phytochemicals--just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci* 2007 Nov;64(22):2900-2916.
- (17) Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Murthy V, Ramassamy C. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J Agric Food Chem* 2008 Jul 9;56(13):4855-4873.
- (18) Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med* 2010 Dec;31(6):435-445.
- (19) Galleano M, Calabro V, Prince PD, Litterio MC, Piotrkowski B, Vazquez-Prieto MA, et al. Flavonoids and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2012 Jul;1259:87-94.
- (20) Phung OJ, Baker WL, Matthews LJ, Lanosa M, Thorne A, Coleman CI. Effect of green tea catechins with or without caffeine on anthropometric measures: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2010 Jan;91(1):73-81.
- (21) Rains TM, Agarwal S, Maki KC. Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. *J Nutr Biochem* 2011 Jan;22(1):1-7.
- (22) Kawaguchi K, Mizuno T, Aida K, Uchino K. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997 Jan;61(1):102-104.
- (23) Sbarra V, Ristorcelli E, Petit-Thevenin JL, Teissedre PL, Lombardo D, Verine A. In vitro polyphenol effects on activity, expression and secretion of pancreatic bile salt-dependent lipase. *Biochim Biophys Acta* 2005 Sep 5;1736(1):67-76.
- (24) Peng CH, Liu LK, Chuang CM, Chyau CC, Huang CN, Wang CJ. Mulberry water extracts possess an anti-obesity effect and ability to inhibit hepatic lipogenesis and promote lipolysis. *J Agric Food Chem* 2011 Mar 23;59(6):2663-2671.
- (25) Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ, et al. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci* 2008 May 7;82(19-20):1032-1039.
- (26) Vazquez-Prieto MA, Renna NF, Diez ER, Cacciamani V, Lembo C, Miatello RM. Effect of red wine on adipocytokine expression and vascular alterations in fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 2011 Feb;24(2):234-240.
- (27) Terra X, Pallares V, Ardevol A, Blade C, Fernandez-Larrea J, Pujadas G, et al. Modulatory effect of grape-seed procyanidins on local and systemic inflammation in diet-induced obesity rats. *J Nutr Biochem* 2011 Apr;22(4):380-387.

- (28) Del Bas JM, Ricketts ML, Baiges I, Quesada H, Ardevol A, Salvado MJ, et al. Dietary procyanidins lower triglyceride levels signaling through the nuclear receptor small heterodimer partner. *Mol Nutr Food Res* 2008 Oct;52(10):1172-1181.
- (29) Del Bas JM, Ricketts ML, Vaque M, Sala E, Quesada H, Ardevol A, et al. Dietary procyanidins enhance transcriptional activity of bile acid-activated FXR in vitro and reduce triglyceridemia in vivo in a FXR-dependent manner. *Mol Nutr Food Res* 2009 Jul;53(7):805-814.
- (30) Quesada H, del Bas JM, Pajuelo D, Diaz S, Fernandez-Larrea J, Pinent M, et al. Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver. *Int J Obes (Lond)* 2009 Sep;33(9):1007-1012.
- (31) Baiges I, Palmfeldt J, Blade C, Gregersen N, Arola L. Lipogenesis is decreased by grape seed proanthocyanidins according to liver proteomics of rats fed a high fat diet. *Mol Cell Proteomics* 2010 Jul;9(7):1499-1513.
- (32) Honda K, Kamisoyama H, Tominaga Y, Yokota S, Hasegawa S. The molecular mechanism underlying the reduction in abdominal fat accumulation by licorice flavonoid oil in high fat diet-induced obese rats. *Anim Sci J* 2009 Oct;80(5):562-569.
- (33) Guo HX, Liu DH, Ma Y, Liu JF, Wang Y, Du ZY, et al. Long-term baicalin administration ameliorates metabolic disorders and hepatic steatosis in rats given a high-fat diet. *Acta Pharmacol Sin* 2009 Nov;30(11):1505-1512.
- (34) Kamisoyama H, Honda K, Tominaga Y, Yokota S, Hasegawa S. Investigation of the anti-obesity action of licorice flavonoid oil in diet-induced obese rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008 Dec;72(12):3225-3231.
- (35) Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J Nutr* 2008 Sep;138(9):1677-1683.
- (36) Shabrova EV, Tarnopolsky O, Singh AP, Plutzky J, Vorsa N, Quadro L. Insights into the molecular mechanisms of the anti-atherogenic actions of flavonoids in normal and obese mice. *PLoS One* 2011;6(10):e24634.
- (37) Ihm SH, Lee JO, Kim SJ, Seung KB, Schini-Kerth VB, Chang K, et al. Catechin prevents endothelial dysfunction in the prediabetic stage of OLETF rats by reducing vascular NADPH oxidase activity and expression. *Atherosclerosis* 2009 Sep;206(1):47-53.
- (38) Yokozawa T, Kim HJ, Cho EJ. Gravinol ameliorates high-fructose-induced metabolic syndrome through regulation of lipid metabolism and proinflammatory state in rats. *J Agric Food Chem* 2008 Jul 9;56(13):5026-5032.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- (39) Soulat T, Philippe C, Bal dit Sollier C, Brezillon C, Berge N, Teissedre PL, et al. Wine constituents inhibit thrombosis but not atherogenesis in C57BL/6 apolipoprotein E-deficient mice. *Br J Nutr* 2006 Aug;96(2):290-298.
- (40) Whitman SC, Kurowska EM, Manthey JA, Daugherty A. Nobiletin, a citrus flavonoid isolated from tangerines, selectively inhibits class A scavenger receptor-mediated metabolism of acetylated LDL by mouse macrophages. *Atherosclerosis* 2005 Jan;178(1):25-32.
- (41) Mink PJ, Scrafford CG, Barraj LM, Harnack L, Hong CP, Nettleton JA, et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2007 Mar;85(3):895-909.
- (42) Sivakumar AS, Anuradha CV. Effect of galangin supplementation on oxidative damage and inflammatory changes in fructose-fed rat liver. *Chem Biol Interact* 2011 Sep 5;193(2):141-148.
- (43) Tzeng YM, Chen K, Rao YK, Lee MJ. Kaempferitrin activates the insulin signaling pathway and stimulates secretion of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol* 2009 Apr 1;607(1-3):27-34.
- (44) Pinent M, Blay M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L, Ardevol A. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology* 2004 Nov;145(11):4985-4990.
- (45) Vittal R, Selvanayagam ZE, Sun Y, Hong J, Liu F, Chin KV, et al. Gene expression changes induced by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in human bronchial epithelial 21BES cells analyzed by DNA microarray. *Mol Cancer Ther* 2004 Sep;3(9):1091-1099.
- (46) Kim AL, Zhu Y, Zhu H, Han L, Kopelovich L, Bickers DR, et al. Resveratrol inhibits proliferation of human epidermoid carcinoma A431 cells by modulating MEK1 and AP-1 signalling pathways. *Exp Dermatol* 2006 Jul;15(7):538-546.
- (47) Brusselmans K, Vrolix R, Verhoeven G, Swinnen JV. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J Biol Chem* 2005 Feb 18;280(7):5636-5645.
- (48) Hsieh TC, Wu JM. Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and gamma-tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. *Int J Oncol* 2008 Oct;33(4):851-859.
- (49) Schindler R, Mentlein R. Flavonoids and vitamin E reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells. *J Nutr* 2006 Jun;136(6):1477-1482.

- (50) Chuang CC, McIntosh MK. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annu Rev Nutr* 2011 Aug 21;31:155-176.
- (51) Natsume Y, Ito S, Satsu H, Shimizu M. Protective effect of quercetin on ER stress caused by calcium dynamics dysregulation in intestinal epithelial cells. *Toxicology* 2009 Apr 28;258(2-3):164-175.
- (52) Li Y, Xu S, Giles A, Nakamura K, Lee JW, Hou X, et al. Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *FASEB J* 2011 May;25(5):1664-1679.
- (53) Magyar JÉ, Gamberucci A, Konta L, Margittai É, Mandl J, Bánhegyi G, et al. Endoplasmic reticulum stress underlying the pro-apoptotic effect of epigallocatechin gallate in mouse hepatoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2009 3;41(3):694-700.
- (54) Liu BQ, Gao YY, Niu XF, Xie JS, Meng X, Guan Y, et al. Implication of unfolded protein response in resveratrol-induced inhibition of K562 cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 Jan 1;391(1):778-782.
- (55) Park JW, Woo KJ, Lee JT, Lim JH, Lee TJ, Kim SH, et al. Resveratrol induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human colon cancer cells. *Oncol Rep* 2007 Nov;18(5):1269-1273.
- (56) Liu KC, Yen CY, Wu RS, Yang JS, Lu HF, Lu KW, et al. The roles of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptotic signaling pathway in quercetin-mediated cell death of human prostate cancer PC-3 cells. *Environ Toxicol* 2012 Mar 20.
- (57) Blade C, Arola L, Salvado MJ. Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 2010 Jan;54(1):37-59.
- (58) Lin CL, Huang HC, Lin JK. Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells. *J Lipid Res* 2007 Nov;48(11):2334-2343.
- (59) Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 2006 Feb;147(2):943-951.
- (60) Karaskov E, Scott C, Zhang L, Teodoro T, Ravazzola M, Volchuk A. Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 2006 Jul;147(7):3398-3407.
- (61) Mayer CM, Belsham DD. Palmitate Attenuates Insulin Signaling and Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Hypothalamic Neurons: Rescue of Resistance and Apoptosis through Adenosine 5 ' Monophosphate-Activated Protein Kinase Activation. *Endocrinology* 2010 FEB;151(2):576-585.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

(62) Fraga D, Meulia T, Fenster S. *Real-Time PCR. Current Protocols Essential Laboratory Techniques: John Wiley & Sons, Inc.; 2008; 2008.*

(63) Lim MP, Devi LA, Rozenfeld R. *Cannabidiol causes activated hepatic stellate cell death through a mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. Cell Death Dis 2011 Jun 9;2:e170.*

(64) Wang H, Joseph JA. *Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. Free Radic Biol Med 1999 Sep;27(5-6):612-616.*

(65) Garcia-Segura J., Gavilanes J. *Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica. 1st ed. Madrid: Síntesis; 1999.*

(66) Ibrahim SH, Kohli R, Gores GJ. *Mechanisms of lipotoxicity in NAFLD and clinical implications. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2011 Aug;53(2):131-140.*

(67) Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. *Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. Am J Physiol Endocrinol Metab 2006 Aug;291(2):E275-81.*

(68) Wang GL, Fu YC, Xu WC, Feng YQ, Fang SR, Zhou XH. *Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1-FOXO1 signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun 2009 Mar 13;380(3):644-649.*

(69) Peter A, Weigert C, Staiger H, Rittig K, Cegan A, Lutz P, et al. *Induction of stearoyl-CoA desaturase protects human arterial endothelial cells against lipotoxicity. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008 Aug;295(2):E339-49.*

(70) Ariyama H, Kono N, Matsuda S, Inoue T, Arai H. *Decrease in Membrane Phospholipid Unsaturation Induces Unfolded Protein Response. J Biol Chem 2010 JUL 16 2010;285(29):22027-22035.*

(71) de la Lastra CA, Villegas I. *Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. Biochem Soc Trans 2007 Nov;35(Pt 5):1156-1160.*

(72) Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr, Ory DS, et al. *Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 2003 Mar 18;100(6):3077-3082.*

(73) Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. *Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature 2006 Nov 16;444(7117):337-342.*

(74) Kim S, Jin Y, Choi Y, Park T. *Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. Biochem Pharmacol 2011 Jun 1;81(11):1343-1351.*

- (75) Chen PL, Easton AS. *Anti-angiogenic effects of resveratrol on cerebral angiogenesis. Curr Neurovasc Res* 2011 Feb;8(1):14-24.
- (76) Borradaile NM, Han X, Harp JD, Gale SE, Ory DS, Schaffer JE. *Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. J Lipid Res* 2006 Dec;47(12):2726-2737.
- (77) Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, et al. *Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Aug 20;99(17):11482-11486.
- (78) Ajmo JM, Liang X, Rogers CQ, Pennock B, You M. *Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008 Oct;295(4):G833-42.
- (79) Kato H, Sakaki K, Mihara K. *Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of mammalian ER stearoyl-CoA desaturase. J Cell Sci* 2006 Jun 1;119(Pt 11):2342-2353.
- (80) Landis-Piowar KR, Milacic V, Chen D, Yang H, Zhao Y, Chan TH, et al. *The proteasome as a potential target for novel anticancer drugs and chemosensitizers. Drug Resist Updat* 2006 Dec;9(6):263-273.
- (81) Morgan NG, Dhayal S, Diakogiannaki E, Welters HJ. *The cytoprotective actions of long-chain mono-unsaturated fatty acids in pancreatic beta-cells. Biochem Soc Trans* 2008 Oct;36(Pt 5):905-908.
- (82) Minville-Walz M, Pierre AS, Pichon L, Bellenger S, Fevre C, Bellenger J, et al. *Inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 expression induces CHOP-dependent cell death in human cancer cells. PLoS One* 2010 Dec 16;5(12):e14363.
- (83) Fritz V, Benfodda Z, Rodier G, Henriquet C, Iborra F, Avances C, et al. *Abrogation of de novo lipogenesis by stearoyl-CoA desaturase 1 inhibition interferes with oncogenic signaling and blocks prostate cancer progression in mice. Mol Cancer Ther* 2010 Jun;9(6):1740-1754.
- (84) Scaglia N, Igal RA. *Stearoyl-CoA desaturase is involved in the control of proliferation, anchorage-independent growth, and survival in human transformed cells. J Biol Chem* 2005 Jul 8;280(27):25339-25349.
- (85) Jung TW, Lee KT, Lee MW, Ka KH. *SIRT1 attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in HepG2 cells via induction of oxygen-regulated protein 150. Biochem Biophys Res Commun* 2012 Jun 1;422(2):229-232.
- (86) Kurien VA, Oliver MF. *Serum-free-fatty-acids after acute myocardial infarction and cerebral vascular occlusion. Lancet* 1966 Jul 16;2(7455):122-127.
- (87) Kleinfeld AM, Prothro D, Brown DL, Davis RC, Richieri GV, DeMaria A. *Increases in serum unbound free fatty acid levels following coronary angioplasty. Am J Cardiol* 1996 Dec 15;78(12):1350-1354.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- (88) Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 2004 Dec;32(12):1377-1382.
- (89) Boocock DJ, Patel KR, Faust GE, Normolle DP, Marczylo TH, Crowell JA, et al. Quantitation of trans-resveratrol and detection of its metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007 Apr 1;848(2):182-187.
- (90) Jing Y, Yumin X, Khaoustov V, Yoffe B. Identification of components of grape powder with anti-apoptotic effects. *Toxicol Ind Health* 2011 Feb;27(1):19-28.
- (91) Granado-Serrano AB, Martin MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Nutr* 2006 Nov;136(11):2715-2721.
- (92) Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Oike H. Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. *Mol Nutr Food Res* 2011 Apr;55(4):530-540.
- (93) Panchal SK, Poudyal H, Brown L. Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Nutr* 2012 Jun;142(6):1026-1032.
- (94) Zhou M, Wang S, Zhao A, Wang K, Fan Z, Yang H, et al. Transcriptomic and metabolomic profiling reveal synergistic effects of quercetin and resveratrol supplementation in high fat diet fed mice. *J Proteome Res* 2012 Oct 5;11(10):4961-4971.
- (95) Nichols LA, Jackson DE, Manthey JA, Shukla SD, Holland LJ. Citrus flavonoids repress the mRNA for stearoyl-CoA desaturase, a key enzyme in lipid synthesis and obesity control, in rat primary hepatocytes. *Lipids Health Dis* 2011 Feb 23;10:36-511X-10-36.
- (96) Hess D, Igal RA. Genistein downregulates de novo lipid synthesis and impairs cell proliferation in human lung cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011 Jun 1;236(6):707-713.
- (97) Thorn K, Hovsepian M, Bergsten P. Reduced levels of SCD1 accentuate palmitate-induced stress in insulin-producing beta-cells. *Lipids Health Dis* 2010 Sep 29;9:108.
- (98) Chattopadhyay M, Selinger ES, Ballou LM, Lin RZ. Ablation of PI3K p110-alpha prevents high-fat diet-induced liver steatosis. *Diabetes* 2011 May;60(5):1483-1492.
- (99) Song X, Xu H, Feng Y, Li X, Lin M, Cao L. Protective effect of grape seed proanthocyanidins against liver ischemic reperfusion injury: particularly in diet-induced obese mice. *Int J Biol Sci* 2012;8(10):1345-1362.

(100) Jaeschke H, Woolbright BL. *Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. Transplant Rev (Orlando) 2012 Apr;26(2):103-114.*

(101) Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, et al. *Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. PLoS Biol 2006 Nov;4(11):e374.*

(102) Das SK, Mondal AK, Elbein SC. *Distinct gene expression profiles characterize cellular responses to palmitate and oleate. J Lipid Res 2010 Aug;51(8):2121-2131.*

(103) Hung CC, Ichimura T, Stevens JL, Bonventre JV. *Protection of renal epithelial cells against oxidative injury by endoplasmic reticulum stress preconditioning is mediated by ERK1/2 activation. J Biol Chem 2003 Aug 1;278(31):29317-29326.*

(104) Gultekin FA, Bakkal BH, Guven B, Tasdoven I, Bektas S, Can M, et al. *Effects of ozone oxidative preconditioning on radiation-induced organ damage in rats. J Radiat Res 2013 Jan;54(1):36-44.*

(105) Akazawa Y, Cazanave S, Mott JL, Elmi N, Bronk SF, Kohno S, et al. *Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. J Hepatol 2010 Apr;52(4):586-593.*

(106) Montagut G, Blade C, Blay M, Fernandez-Larrea J, Pujadas G, Salvado MJ, et al. *Effects of a grapeseed procyanidin extract (GSPE) on insulin resistance. J Nutr Biochem 2010 Oct;21(10):961-967.*

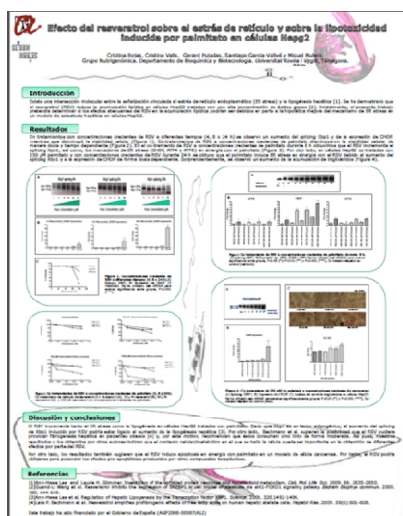
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

## **8. ANEXO**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013

## Contribuciones a congresos



*Efecto del resveratrol sobre el estrés de retículo y sobre la lipotoxicidad inducida por palmitato en células HepG2*

Cristina Rojas, Cristina Valls, Gerard Pujadas, Santi Garcia-Vallvé, Miquel Mulero

XXXIV congreso de la SEBBM (Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular)

Barcelona (2010)

### PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN

Premio a la mejor comunicación dentro del Grupo de Regulación Metabólica presentado en el XXXIV congreso de la SEBBM.

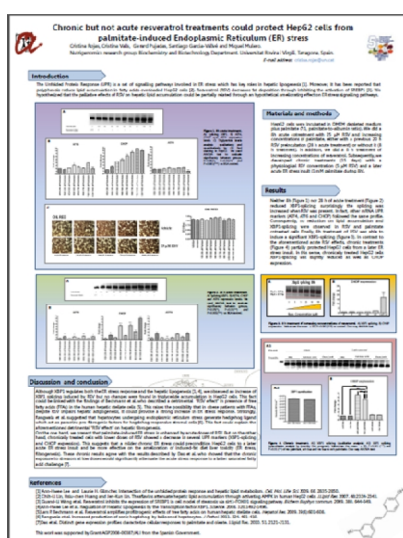
CONCEDIDO A

**CRISTINA ROJAS**

Por su póster **EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE EL ESTRÉS Y SOBRE LA LIPOTOXICIDAD INDUCIDA POR PALMITATO EN CELULAS HepG2**, presentado en el XXXIV Congreso SEBBM celebrado en Barcelona del 5 al 8 de septiembre de 2011 dentro del Grupo de Regulación Metabólica de la SEBBM

Concedido el día 7 de Septiembre, 2011

Marta Casado Pina y Miguel Angel Medina Torres  
 Coordinadores del Grupo de Regulación Metabólica SEBBM

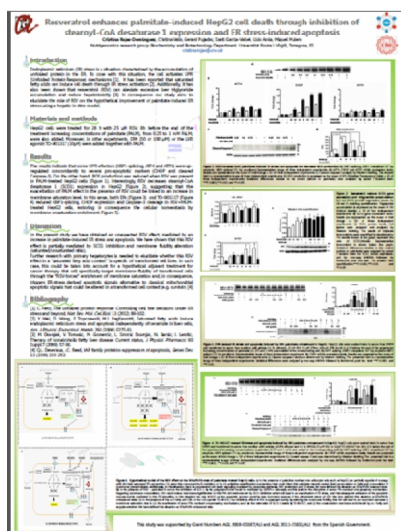


*Chronic but not acute resveratrol treatments could protect HepG2 cells from palmitate-induced Endoplasmic Reticulum (ER) stress*

Cristina Rojas, Cristina Valls, Gerard Pujadas, Santi Garcia-Vallvé, Miquel Mulero

5th International Conference on Polyphenols and Health congress

Sitges, Barcelona (2010)



*Resveratrol enhances palmitate-induced HepG2 cell death through inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 expression and ER stress-induced apoptosis*

Cristina Rojas, Cristina Valls, Gerard Pujadas, Santi Garcia-Vallvé, Lluís Arola, Miquel Mulero

37th FEBS (Federation of European Biochemical Societies) and 22nd IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) congress.

Sevilla (2012)

## Artículo enviado a PLoS ONE

PLOS ONE

Resveratrol enhances palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in HepG2 cells

--Manuscript Draft--

Manuscript	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Resveratrol enhances palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in HepG2 cells
Short Title:	Resveratrol enhances palmitate-induced apoptosis
Corresponding Author:	Miquel Mulero URV Tarragona, SPAIN
Keywords:	ER-stress; Apoptosis; Resveratrol; Palmitate; XBP1; CHOP; SCD1

Abstract:	<p>Background: Palmitate, a saturated free fatty acid (FFA), has long been shown to induce toxicity and cell death in various types of cells. Resveratrol (RSV), a naturally occurring polyphenolic compound, is able to prevent the pathogenesis and/or slow the progression of a variety of diseases. Several in vitro and in vivo studies have also shown a protective effect for RSV on fat accumulation induced by FFAs. Additionally, endoplasmic reticulum (ER) stress mechanisms have recently been linked to cellular adipogenic responses. To address the hypothesis that the effect of RSV on excessive fat accumulation induced by elevated FFAs could be partially mediated by a reduction in ER stress, we experimentally induced ER stress using palmitate in the human HepG2 liver cell line and studied RSV action.</p> <p>Principal findings: We demonstrate that although RSV is able to induce a decrease in triglyceride content, it unexpectedly promotes an amplification of palmitate toxicity and cell death; this function correlates with an inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) expression. Additionally, RSV decreases radical oxygen species (ROS) generation in palmitate-treated cells but leads to enhanced XBP1 splicing and CHOP expression. These molecular effects are induced simultaneously with caspase-3 cleavage, suggesting that RSV promotes palmitate lipoapoptosis mainly through an ER stress-dependent mechanism. Moreover, the lipotoxicity reversion induced both directly by EPA or indirectly by LXR agonist TO-901317 suggests that RSV-mediated SCD1 inhibition could be a key factor in the aggravation of palmitate-induced cytotoxicity, due to the decrease in membrane phospholipid unsaturation.</p> <p>Conclusions: Our results suggest that RSV-mediated SCD1 repression in the presence of a saturated fatty acid induces cell death mainly through a CHOP-mediated apoptotic process and might be an original and interesting research avenue that could reveal interesting possibilities for targeting and destroying transformed cell lines.</p>
Order of Authors:	Cristina Rojas
	Cristina Valls
	Gerard Pujadas
	Santi Garcia-Vallve
	Lluís Arola
	Miquel Mulero
Suggested Reviewers:	Andreu Palou UIB andreu.palou@uib.es
	Jaap Keijer Wageningen University jaap.keijer@wur.nl
Opposed	

### Comentarios de los *reviewers* (12/10/2012)

PONE-D-12-28372

Resveratrol enhances palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in HepG2 cells

PLOS ONE

*Dear Dr Mulero,*

*Thank you for submitting your manuscript to PLOS ONE. After careful consideration, we*

## 8. ANEXO

*feel that it has merit, but is not suitable for publication as it currently stands. Therefore, my decision is "Major Revision."*

*We invite you to submit a revised version of the manuscript that addresses all the points raised by the reviewers. Specifically, it would be important to provide experimental evidence obtained by genetic manipulation (silencing or over-expression) of the direct involvement of SCD-1 on the effects observed in your system.*

*We encourage you to submit your revision within forty-five days of the date of this decision.*

*When your files are ready, please submit your revision by logging on to <http://pone.edmgr.com/> and following the Submissions Needing Revision link. Do not submit a revised manuscript as a new submission.*

*If you would like to make changes to your financial disclosure, please include your updated statement in your cover letter.*

*Please also include a rebuttal letter that responds to each point brought up by the academic editor and reviewer(s). This letter should be uploaded as a Response to Reviewers file.*

*In addition, please provide a marked-up copy of the changes made from the previous article file as a Manuscript with Tracked Changes file. This can be done using 'track changes' in programs such as MS Word and/or highlighting any changes in the new document.*

*If you choose not to submit a revision, please notify us.*

*Yours sincerely,*

*Guillermo Velasco, Ph.D  
Academic Editor  
PLOS ONE*

*Reviewers' comments:*

*Reviewer #1: This study used liver cell model to investigate the role of resveratrol in ER stress. The initial hypothesis was that RSV reduces ER stress. However, authors found some unexpected RSV effect, as it promotes palmitate-mediated toxicity and induces apoptosis. Authors provided evidence to demonstrate that this RSV's effect is mediated*

*through regulation of SCD-1, ROS, triglyceride and XBP1 in the liver cells.*

*Comments:*

- 1. Please define the abbreviation in a note appearing immediately after the first use, such as XBP1, etc.*
- 2. Only using XBP1 and CHOP might not be enough to show ER stress. It would be more convincing if author can validate RSV-induced ER stress with a few more markers, like GRP78 or TRB3.*
- 3. It needs more clarification why this study used a RSV that does not induce apoptosis.*
- 4. Figure 4B showed that RSV suppresses SCD1 mRNA expression and decreased palmitate-induced SCD1 expression. However, RSV does not suppress SCD1 in the presence of low dose palmitate. Why?*
- 5. RSV suppresses SCD1 transcription but, after all, SCD1 protein levels are upregulated after RSV treatment. Authors have discussed that this may be due to the posttranslational regulation, which does exist in some cases. However, it is SCD1 protein, not mRNA, which associates with ER stress. It remains a big concern that SCD1 may not be a major pathway for RSV-induced ER stress.*

*Reviewer #2: 1. The 'Introduction' section is too descriptive. This needs to be trimmed down and focused.*

- 2. Similarly, 'Discussion' is also too long and needs to be more focused and succinct.*
- 3. The choice of HepG2 cells is not clear. Authors need to properly justify the choice of this cell line. Also, single cell line studies are never very convincing and the results (atleast a few preliminary ones) need to be replicated in atleast one more cell line.*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN CÉLULAS HEPÁTICAS.  
ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO.  
Cristina Rojas Domínguez  
DL: T. 987-2013