

**Universidad Autónoma de Madrid**  
**Facultad de Ciencias**  
**Departamento de Biología Molecular**

**Papel de las p38MAPK en el  
desarrollo del daño hepático  
producido por obesidad**

**Tesis Doctoral**

**María de los Ángeles Verdugo Becerra**

**Madrid, 2013**



**Universidad Autónoma de Madrid**  
**Facultad de Ciencias**  
**Departamento de Biología Molecular**

**Papel de las p38MAPK en el  
desarrollo del daño hepático  
producido por obesidad**

**Tesis Doctoral**

**María de los Ángeles Verdugo Becerra**

El trabajo experimental presentado en esta tesis ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB) y el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Sabio Buzo y la Dra. Nuria Matesanz Parellada y la tutoría del Dr. José María Carrascosa.

**Licenciada en Veterinaria**

**Madrid, 2013**



**“Cien veces al día me recuerdo que mi vida interna y externa depende del trabajo de otros hombres, vivos y muertos, y que he de esforzarme para dar en la misma medida que he recibido y que sigo recibiendo”.**

*Albert Einstein*



# Índice

<b>Summary</b> .....	<b>1</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>4</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>7</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>15</b>
1. Obesidad .....	16
1.1 Prevalencia y predicción.....	16
1.2 Enfermedades asociadas a la obesidad .....	18
1.3 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) .....	19
1.3.1 Insulina.....	19
1.3.1.1 Secreción de la Insulina.....	19
1.3.1.2 Vías de señalización de la insulina .....	21
1.3.2 Mecanismos moleculares de la DM2.....	22
1.3.2.1 Resistencia a la insulina .....	22
1.3.2.2 Ácidos grasos libres , citoquinas y adipocinas .....	24
1.3.2.3 Disfunción mitocondrial.....	27
1.3.2.4 Fallo de células beta pancreáticas .....	27
1.3.2.5 Genes candidatos asociados a DM2.....	28
1.3.2.6 Esteatohepatitis no alcohólica (NAFLD).....	28
1.3.3 Etiopatogenia .....	29
1.3.4 Mecanismos moleculares del desarrollo de NAFLD-NASH .....	29
2. Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) .....	32
2.1. Cascada de activación de las MAPK .....	32
2.1.1. Proteínas quinasas activadas por mitógenos .....	33
2.1.2. Proteínas quinasas activadas por estrés .....	35
2.1.2.1. JNK .....	35
2.1.2.2. p38 MAPK.....	36
2.1.2.3. Estructura de las p38 .....	37
2.1.2.4. Inhibidores de las p38.....	38
2.1.2.5. Sustratos y función de la p38 $\alpha$ y p38 $\beta$ .....	39
2.2. p38 $\gamma$ y p38 $\delta$ .....	40
2.2.1. Sustrato y funciones de la p38 $\gamma$ .....	40
2.2.2. Sustrato y funciones de la p38 $\delta$ .....	41
<b>Objetivos</b> .....	<b>43</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>47</b>
1. Modelos murinos .....	49

1.1	Modelo de diabetes asociada a obesidad .....	50
1.2	Modelo de esteatosis hepática .....	51
1.3	Inhibidores BIRB796 y SB203580 <i>in vivo</i> con dieta MCD .....	51
2.	Pruebas metabólicas <i>in vivo</i> .....	52
2.1	Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) .....	52
2.2	Prueba de tolerancia a la insulina (ITT) .....	52
2.3	Prueba de Piruvato .....	53
2.4	Prueba de la liberación de insulina .....	53
2.5	Determinación de insulina y citoquinas plasmáticas mediante Luminex .....	53
2.6	Cajas Metabólicas y Resonancia magnética nuclear.....	54
2.7	Hematología .....	54
3.	Sacrificios .....	55
4.	Pruebas metabólicas en tejidos y muestras .....	55
4.1	Determinación de la peroxidación lipídica por TBARS.....	55
4.2	Determinación del peróxido de hidrogeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	56
4.3	Determinación de cuerpos cetónicos.....	57
4.4	Determinación de Glucógeno .....	57
4.5	Determinación de Aspartatoaminotransferasa (AST) y Alaninoaminotransferasa (ALT) .....	58
4.6	Extracción de lípidos de hígado .....	58
4.7	Cuantificación de lípidos.....	59
4.8	Cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (FPLC) .....	59
5.	Análisis de cantidad de proteínas por Western blot .....	60
5.1	Lisis de tejidos .....	60
5.2	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....	60
5.3	Electroforesis PAGE-SDS, transferencia e incubación con anticuerpos.....	60
5.4	Inmunoprecipitación .....	61
6.	Análisis de ARN .....	62
6.1	Extracción de ARN .....	62
6.2	Retrotranscripción .....	62
6.3	PCR cuantitativa.....	62
7.	Tinciones histológicas.....	64
7.1	Hematoxilina/Eosina (H/E) .....	65
7.2	Técnica de Schiff (Ácido peryódico de Schiff ;P.A.S) .....	65
7.3	Tricrómica de Masson.....	66
7.4	Tinción Oil red.....	67
8.	Determinación de la infiltración leucocitaria en hígado por citometría.....	68



9. Equipos utilizados .....	69
10. Análisis estadístico .....	69
<b>Resultados .....</b>	<b>71</b>
1. Modelos animales en dietas ricas en grasa (HFD) .....	73
1.1 Papel de p38 $\gamma$ y p38 $\delta$ en el desarrollo de la diabetes inducida por la obesidad .....	73
1.1.1 La carencia de p38 $\delta$ protege del desarrollo de diabetes inducida por obesidad .....	73
1.1.2 La carencia de p38 $\gamma$ y p38 $\delta$ altera el metabolismo de lípidos .....	77
1.1.3 Los animales p38 $\gamma^{-/-}$ y p38 $\delta^{-/-}$ desarrollan esteatosis hepática .....	79
1.2 Ratones p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ están protegidos frente a la obesidad .....	80
1.2.1 La carencia de p38 $\gamma/\delta$ incrementa el gasto energético en HFD .....	81
1.2.2 La carencia de p38 $\gamma/\delta$ afecta los niveles de hormonas del eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo .....	83
1.2.3 La carencia de p38 $\gamma/\delta$ protege del desarrollo de intolerancia a la glucosa en HFD .....	84
1.2.4 Los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ poseen mayor sensibilidad a la insulina en el hígado .....	86
1.2.5 Los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ acumulan menos lípidos en hígado tras la HFD .	87
1.2.6 La carencia de p38 $\gamma/\delta$ disminuye los depósitos de lípidos en tejido adiposo tras HFD, disminuyendo también la expresión de citoquinas inflamatorias .....	96
1.2.7 La carencia de p38 $\gamma/\delta$ protege de la inflamación e infiltración hepática .....	98
1.3 p38 $\gamma/\delta$ en tejido mieloide .....	101
2. Modelos animales en dietas carentes de metionina y colina (MCD) .....	104
2.1 La inhibición de las p38 MAPKs reduce la esteatosis hepática y el daño hepático por MCD .....	104
2.2 La carencia de p38 $\gamma$ y p38 $\delta$ no protege del desarrollo de la esteatosis hepática .....	106
2.3 Papel de las p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ en el desarrollo de esteatosis hepática inducida por MCD .....	107
2.3.1 La carencia de p38 $\gamma/\delta$ protege del desarrollo de esteatosis hepática	107
2.3.2 p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ tienen un menor grado de estrés oxidativo y peroxidación de lípidos .....	110
2.3.3 La carencia de p38 $\gamma/\delta$ favorece la protección frente al desarrollo de fibrosis hepática tras MCD .....	112
2.3.4 la carencia de p38 $\gamma/\delta$ disminuye la inflamación e infiltración del hígado. ....	113

2.4	La carencia de p38 $\gamma/\delta$ en tejido mieloide protege del desarrollo de esteatosis hepática .....	115
2.4.1	Los animales p38 $\gamma/\delta$ <sup>Lyz-KO</sup> poseen menos infiltración hepática tras MCD....	117
3.	La adición exógena de TNF- $\alpha$ o IL-6 en animales p38 $\gamma/\delta$ Lyz-KO produce la pérdida del fenotipo de protección .....	121
	<b>Discusión.....</b>	<b>124</b>
1.	Existe un efecto compensatorio en los animales carentes de p38 $\gamma$ o p38 $\delta$ .....	126
2.	La carencia de p38 $\gamma/\delta$ protege de la obesidad.....	128
3.	La carencia de p38 $\gamma/\delta$ protege del desarrollo de dislipidemia.....	131
4.	La carencia de las MAPK p38 $\gamma/\delta$ protege del desarrollo de diabetes.....	132
5.	Papel de p38 $\gamma$ y p38 $\delta$ en el desarrollo de la esteatosis hepática.....	135
6.	La inhibición de p38 $\gamma/\delta$ puede tener un fin terapéutico.....	138
	<b>Conclusiones.....</b>	<b>142</b>
	<b>Agradecimientos.....</b>	<b>145</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>152</b>

# Índice de figuras

Fig. 1: Mapa mundial de la prevalencia de la obesidad en mayores de 20 años, ambos sexos 2008[2].	16
Fig. 2: Secreción de insulina en células beta pancreáticas	20
Fig. 3: Señalización de la insulina	22
Fig. 4: Señalización de la insulina y resistencia a la insulina]	23
Fig. 5: Efecto de la obesidad en tejido adiposo, músculo e hígado	25
Fig. 6: Teoría del doble impacto para el desarrollo del NASH.	30
Fig. 7: Esquema clásico de activación de las MAPK	33
Fig. 8: Esquema de la estructura tridimensional de las p38 [246-248]	38
Fig. 9: Esquema de construcción de animales flox.	49
Fig. 10: Esquema de generación de animales condicionales.	50
Fig.11: Diferencias en la composición corporal entre ratones WT, p38 $\gamma$	74
Fig.12: Determinación de la tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en ratones p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> y p38 $\delta$	75
Fig.13: Determinación de insulina en animales WT, p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> y p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> :	77
Fig.14: Perfil lipídico de animales WT, p38 $\gamma$	78
Fig.15: Comparación del balance energético entre WT y p38 $\gamma$	79
Fig.16: Determinación del daño hepático tras dietas ND o HFD	80
Fig.17: Caracterización corporal de animales WT y p38 $\gamma/\delta$	81
Fig.18: Comparación del balance energético entre WT y p38 $\gamma/\delta$	82
Fig.19: Estudio del eje hipotalámico tiroideo en ratones WT y p38 $\gamma/\delta$	83
Fig.20: Determinación de niveles de glucosa e insulina en ratones WT y p38 $\gamma/\delta$	84
Fig.21: Determinación del estado pancreático	85
Fig.22: Niveles de resistencia a la insulina en animales WT y p38 $\gamma/\delta$	86
Fig.23: Estado de sensibilidad a insulina de tejidos:	88
Fig.24: Expresión de genes de la ruta de insulina en hígado:	89
Fig.25: Determinación de esteatosis hepática de animales WT y p38 $\gamma/\delta$	89
Fig.26: Determinación del contenido lipídico del hígado:	90
Fig.27: Expresión de genes lipogénicos y lipolíticos en hígado:	91
Fig.28: Western blot de lisados hepáticos	91
Fig.29: Perfil lipídico de animales WT y p38 $\gamma/\delta$	93
Fig.30: Estado funcional hepático:	93
Fig.31: Estado de daño hepático en animales WT o p38 $\gamma/\delta$ <sup>-/-</sup> :	94
Fig.32: Determinación del glucógeno hepático:	95

Fig.33: Determinación del nivel de fibrosis hepática:.....	96
Fig.34: Determinación del incremento de lípidos en tejido adiposo:.....	97
Fig.35: Cuantificación de citoquinas y adipoquinas en tejido adiposo epididimal:.....	98
Fig.36: Niveles plasmáticos de citoquinas y quimioquinas: .....	99
Fig.37: Niveles de expresión de genes proinflamatorios en hígado: .....	100
Fig.38: Caracterización corporal de animales Lyz-WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lyz-KO</sup> :.....	102
Fig.39: Comparación del balance energético entre Lyz-WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lyz-KO</sup> : .....	103
Fig.40: Niveles de glucosa en ratones Lyz-WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lyz-KO</sup> .....	104
Fig.41: Determinación del nivel de esteatosis hepática .....	105
Fig.42: Esteatosis hepática de animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> , p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> y WT: .....	106
Fig.43: Cuantificación de triglicéridos hepáticos de animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> , p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> y WT:...	107
Fig.44: Nivel de daño hepático en animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> , p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> y WT.....	107
Fig.45: Nivel de esteatosis hepática tras dietas MCD:.....	109
Fig.46: Análisis de triglicéridos:.....	109
Fig.47: Cuantificación de cuerpos cetónicos:.....	110
Fig.48: Determinación del nivel de necrosis hepática en animales WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ .....	110
Fig.49: Determinación del nivel de estrés oxidativo en hígado de animales WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ .....	112
Fig.50: Determinación del nivel de fibrosis hepática:.....	113
Fig.51: Cuantificación de los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias y marcadores de infiltración: .....	114
Fig.52: Determinación del nivel de esteatosis hepática en animales condicionales de tejido mieloide: .....	115
Fig.53: Cuantificación de triglicéridos hepáticos:.....	116
Fig.54: Determinación del daño hepático en animales Lys-WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lys-KO</sup> : .....	116
Fig.55: Niveles de peroxidación lipídica en hígado de animales Lys-WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lys-KO</sup> .....	117
Fig.56: Niveles de expresión de genes de infiltración: .....	117
Fig.57: Determinación de la Infiltración leucocitaria en hígado:.....	119
Fig.58: Poblaciones leucocitarias en sangre: .....	120
Fig.59: Expresión de genes proinflamatorios en hígado: .....	121
Fig.60: Pérdida de protección mediante citoquinas exógenas:.....	122

# Índice de tablas

Tabla 1: Enfermedades asociadas a la obesidad. ....	18
Tabla 2: Anticuerpos utilizados en la técnica de Western blot.....	61
Tabla 3: Genes y secuencias de los oligonucleótidos utilizados.....	63
Tabla 4: Proceso de hidratación inicial en histología.....	64
Tabla 5: Proceso de deshidratación final de muestras en histología.....	64
Tabla 6: Protocolo de tinción con hematoxilina/eosina.....	65
Tabla 7: Protocolo de tinción técnica P.A.S.....	66
Tabla 8: Protocolo de tinción de la técnica tricrómica de Masson.....	67
Tabla 9: Protocolo de la tinción de Oil red.....	67
Tabla 10: Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.....	69
Tabla 11: Genes analizados en hígados de animales en HFD mediante PCR cuantitativa.....	90



# Summary

---

Obesity is a pathology that involves a multitude of associated diseases that diminish the quality of life of those people who suffer them. Nowadays it is considered to be a pandemic; therefore the study of the signaling pathways affected by this disease can be useful to find new pharmacological targets that can mitigate their effects.

MAPK are a family of proteins with multiple functions such as proliferation, cell growth, apoptosis and inflammation, among others. In this family we can find four types of p38 kinases, p38 $\alpha$  and p38 $\beta$  are ubiquitous, while p38 $\gamma$  and p38 $\delta$  express themselves in a selective way within certain body tissues. In this thesis we study the role of the isoforms **p38 $\gamma$  and p38 $\delta$  related to obesity**. Currently the function of these kinases in the regulation of the metabolism is unknown. We don't know specifically the role they play in the development of the **obesity, diabetes type 2 (DM2) and hepatic steatosis**.

In our study we have confirmed that the absence of only one of these isoforms (p38 $\gamma$  or p38 $\delta$ ) fails to protect against obesity, DM2 or hepatic steatosis. However, dual absence protects against these diseases. So, the absence of p38 $\gamma/\delta$  partially protects the development of obesity, after which a secondary protection against hepatic steatosis and DM2 is observed. In addition, the absence of these kinases protects against the development of steatosis in a diet model that does not include obesity, which indicate that these kinases play a role in the protection against steatosis regardless of obesity. Our results indicate that the absence of these kinases in the myeloid tissue protects against inflammation induced by feeding methionine and choline deficient diet. At the same time, we confirmed that the absence of these isoforms in the myeloid tissue protect against the inflammatory effects induced by the obesity, resulting in the development of DM2.

The collected and analyzed data of this doctoral thesis indicate that these kinases have an active function in regulating metabolism; therefore, are affected by obesity. Thus, it is a possible candidate to develop drugs for these diseases.





# Resumen

---

La obesidad es una patología que involucra una multitud de enfermedades asociadas que disminuyen la calidad de vida de quien las padece. Actualmente se considera una pandemia, por lo que el estudio de las vías de señalización afectadas por esta enfermedad puede ser útil para encontrar nuevas dianas farmacológicas que logren paliar sus efectos.

Las MAPK son una familia de proteínas con múltiples funciones como la proliferación, el crecimiento celular, la apoptosis o la inflamación, entre otras. Dentro de esta familia, nos encontramos cuatro p38 quinasas, siendo p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  ubicuas mientras que p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  se expresan de manera selectiva en determinados tejidos del organismo. En esta tesis concretamente, se estudió el papel de las isoformas **p38 $\gamma$**  y **p38 $\delta$  en obesidad**. Actualmente se desconoce cuál es la función de estas quinasas en la regulación del metabolismo y específicamente no se sabe el papel que puedan tener en el desarrollo de la **obesidad, la diabetes tipo 2 (DM2) y la esteatosis hepática**.

En nuestro estudio hemos comprobado que la carencia de solo una de estas isoformas (p38 $\gamma$  o p38 $\delta$ ) no logra proteger frente a la obesidad, DM2 o la esteatosis hepática. Sin embargo, la doble carencia protege frente a estas enfermedades. Así la carencia de p38 $\gamma/\delta$  protege parcialmente del desarrollo de la obesidad, tras lo cual se observa una protección secundaria frente a la esteatosis hepática y la DM2. Además, la carencia de estas quinasas protege del desarrollo de esteatosis en un modelo de dieta que no induce obesidad, lo que nos indica que estas quinasas cumplen un papel independiente de la obesidad en la protección contra la esteatosis. Nuestros resultados indican que su carencia en tejido mieloide protege de la inflamación que desencadena la alimentación con dieta carente en metionina y colina. A su vez, comprobamos que en la carencia de estas isoformas en el tejido mieloide protege de los efectos inflamatorios inducidos por la obesidad y que resultan en el desarrollo de la DM2.

Los datos recolectados y analizados en esta tesis doctoral indican que estas quinasas poseen una activa función en la regulación del metabolismo y que por lo tanto se ven afectadas por la obesidad. Siendo por lo tanto, esta vía una posible candidata para desarrollar fármacos para estas enfermedades.



# Abreviaturas

---



**ACC-2:** Acetil-coA carboxilasa 2  
**ACOX1:** Acil-coenzima A oxidasa 1  
**ACS-2:** Acetil-coA sintasa 2  
**ADIPR2:** Receptor de adiponectina 2  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario  
**AKT:** Proteína quinasa b  
**ALT:** Alaninoaminotransferasa  
**AMPK:** Proteína quinasa activada por AMP  
**AP-1:** Proteína activadora 1  
**APC-Cy7:** Tandem conjugado de aloficocianina-cianina  
**ARG-1:** Arginasa 1  
**ARN:** Ácido ribonucleico  
**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero  
**AS160:** Sustrato de AKT de 160kDa  
**ASK1:** Quinasa regulada por señales de apoptosis 1  
**AST:** Aspartatoaminotransferasa  
**ATF:** Factor activador de transcripción  
**ATP:** Adenina trifosfato  
**BMK1:** BigMAPK 1 o ERK5  
**BSA:** Albúmina sérica bovina  
**Cbl:** Proteína del linfoma del linaje Casitas B  
**CD36:** Grupo de diferenciación 36  
**CD68:** Grupo de diferenciación 68  
**CHOP/GADD:** Proteína de homología C/EBP  
**ChREBP:** Proteína de respuesta a la unión a carbohidratos  
**CoA:** Coenzima A  
**CPT-1:** Carnitina palmitil transferasa 1  
**Cre:** Enzima tirosina recombinasa proveniente del bacteriofago P1  
**CT:** Ciclo umbral  
**DM2:** Diabetes mellitus tipo 2  
**DMEM:** Medio Eagle modificado por Dulbecco  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**dNTP:** Disoxirribonucleosidos trifosfatos  
**ECL:** Potenciador de quimioluminiscencia  
**EDTA:** Ácido etilendiamina tetracético  
**EEM:** Error estándar de la media  
**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico  
**EGTA:** Ácido etilengliol tetracético  
**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas  
**Elk-1:** Proteína con dominio ets como el gen 1  
**ER:** Retículo endoplásmico  
**ERK:** Quinasas reguladas por señales extracelulares  
**F4/80:** Receptor de macrófagos F4/80  
**FA:** Ácidos grasos

- FACS:** Citometría de flujo  
**FFA:** Ácidos grasos libres  
**FGF-2:** Factor de crecimiento de fibroblastos 2  
**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína  
**FPLC:** Cromatografía líquida de separación rápida de proteínas  
**GAPDH:** Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa  
**GLUT:** Transportador de glucosa  
**GPR30:** Receptor de estrógeno 30 acoplado a proteína G  
**Grb-2:** Receptor del factor de crecimiento de la proteína unida 2  
**GTP:** Guanidina trifosfato  
**GTT:** Prueba de tolerancia a la glucosa  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno  
**HDL:** Lipoproteínas de alta densidad  
**HFD :** Dieta rica en grasa  
**HFN4:** Factor nuclear de hepatocitos 4  
**HGP:** Producción de glucosa hepática  
**HK:** Hexoquinasa  
**HMW:** Alto peso molecular  
**HNF1B:** Factor nuclear de hepatocitos 1-beta  
**HO-1:** Hemoxigenasa 1  
**HRP:** Peroxidasa de rábano  
**HSF-1:** Factor de choque térmico 1  
**HSP27:** Proteína de choque térmico 27  
**i.p.:** Intraperitoneal  
**IASO:** Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad  
**IFN $\gamma$ :** Interferón  $\gamma$   
**IGF-1R:** Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1  
**IKK:** Quinasa I kappa Beta  
**IL:** Interleuquina  
**IMC:** Índice de masa corporal  
**INOS:** Óxido nítrico sintasa inducible  
**IOTF:** Grupo de trabajo para la obesidad internacional  
**IRAK:** Quinasa 1 asociada al receptor de interleuquina 1  
**ITT:** Prueba de tolerancia a la insulina  
**JNK:** Quinasa c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal  
**KIR6:** Canales de K<sup>+</sup> rectificadores a la cantidad de ATP interna  
**KO:** *Knockout*, ratones modificados genéticamente a los que se les ha quitado una proteína específica  
**LAR:** Proteína tirosina fosfatasa asociada al antígeno de leucocitos común  
**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad  
**LIPC:** Lipasa triacilglicerol hepática  
**loxP:** Locus de X en P1, sitio de reconocimiento de la enzima Cre del bacteriófago P1  
**LPS:** Lipopolisacárido  
**LRP:** Proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas  
**MAP3K/MEKK:** Proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos



- MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos
- MAPKAP:** Proteína quinasa activada por MAP quinasa
- MAPKK/MAP2K:** Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos
- MCD:** Dieta deficiente en metionina y colina
- Mcl-1:** Proteína inductora de la diferenciación celular de la leucemia mieloide
- MCP-1:** Proteína quimioatrayente de monocitos 1
- MDA:** Malondialdehído
- MEF2A:** Factor potenciador específico de miocito 2A
- MEF2C:** Factor potenciador específico de miocito 2C
- MEFs:** Fibroblastos embrionarios de ratón
- MEK1/2:** Doble especificidad de la proteína quinasa activada por mitógenos quinasa 1
- MLK:** Quinasa de linaje mixto
- MLTK:** Proteína activada por mitógenos triple quinasa tipo-MLK
- MNK1:** Quinasa 1 que interactúa con MAP quinasa
- MSK1:** Proteína quinasa activada por mitógenos y estrés 1
- mTOR:** Diana en mamíferos de la rapamicina
- NAD:** Nicotinamida y adenina dinucleótido
- NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato de hidrógeno
- NAFLD:** Enfermedad del hígado graso no alcohólico
- NASH:** Esteatohepatitis no alcohólica
- NCBI:** Centro Nacional de Información sobre Biotecnología
- ND:** Dieta normal
- NFAT4:** Factor nuclear de células T activadas
- NFATC1:** Factor nuclear de células T activadas, citoplasmático, dependiente de calcineurina 1
- NFκB:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- NP40:** Nonidet P-40
- O/N:** Toda la noche.
- O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Anión superóxido
- OCT:** Medio de congelación para obtener una temperatura óptima de corte
- OH:** Radical hidroxilo
- p53:** Proteína 53
- PAGE-SDS:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
- PBS:** Tampón fosfato salino
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas
- PDK:** Proteína quinasa dependiente de PIP3
- PE:** Ficoeritrina
- PE-Cy7:** Conjugado de ficoeritrina-cianina
- PEPCK:** Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
- PERCP:** Complejo proteico peridina-clorofila
- PFA:** Paraformaldehído
- PGC-1:** Coactivador 1 de PPARγ
- PH:** Homología a Pleckstrina
- PI3K:** Fosfatidil inositol 3 quinasa

- PIP2:** Fosfatidil inositol 3,4-bifosfato  
**PIP3:** Fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato  
**PK:** Proteína quinasa  
**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
**PPAR:** Receptores activados por la proliferación de los peroxisomas  
**PTB1B:** Proteína tirosina fosfatasa 1B  
**PtdCho:** Fosfatidilcolina  
**PtdEtn:** Fosfatidiletanolamina  
**PtdIns:** Fosfatidilinositol  
**PTEN:** Proteína fosfatasa de homología a tensina  
**PTPN11/SHP-2:** Proteína tirosina fosfatasa tipo no receptor 11  
**RAB10:** Proteína relacionada con Ras  
**RAB-GTPasa:** Proteína relacionada con Ras de unión a GTP  
**Raf:** Proteína del fibrosarcoma rápidamente acelerado  
**RAS:** Oncogen del sarcoma de rata  
**RI:** Receptor de insulina  
**ROCK1:** Proteína quinasa 1 asociada a Rho conteniendo el motivo hélice-hélice  
**ROS:** Especies reactivas de oxígeno  
**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute Medium  
**RQ:** Cociente respiratorio  
**RT:** Temperatura ambiente  
**S6K:** Proteína ribosomal S6 quinasa  
**Sap-1:** Proteína asociada al estrés 1  
**SAP:** Proteína asociada a la sinapsis  
**SAPK:** MAPK activadas por estrés  
**SCD-1:** Esteroil CoA desaturasa 1  
**SDS:** Dodecilsulfato sódico  
**SFB:** Suero fetal bovino  
**SHC:** Proteína transformadora conteniendo dominios SH2  
**SHIP2:** Inositol fosfatasa 2 conteniendo el dominio SH2  
**SMAD4:** Supresión de la diana del carcinoma pancreático 4  
**SOCS3:** Supresor de la señalización de citoquinas 3  
**SOD-1:** Superóxido dismutasa 1  
**SREBP:** Proteína de unión al elemento regulador de esteroil  
**SRF:** Factor de respuesta a suero  
**SRI-1:** Sustrato del receptor de insulina 1  
**STAT3:** Transductor de señal y activador de la transcripción 3  
**SUR1:** Receptor de sulfonilurea 1  
**TAK1:** Proteína quinasa 1 activada por TGF- $\beta$   
**TAO:** Proteína de mil y un aminoácidos  
**TBA:** Ácido tiobarbiturico  
**TBARS:** Sustancias reactivas a ácido tiobarbiturico  
**TBS:** Tampon tris salino  
**TBS-T:** Tampon tris salino con tween  
**TEY:** Motivo treonina-ácido glutámico-tirosina

- TGF $\beta$** : Factor de crecimiento transformador  $\beta$
- TGY**: Motivo treonina-glicina-tirosina
- Th**: Linfocito T cooperador
- Thr**: Treonina
- Timp-1**: Inhibidor de metalopeptidasa 1
- TNFR**: Receptor del factor de necrosis tumoral
- TNF- $\alpha$** : Factor de necrosis tumoral alfa
- TPL2 proto oncogen**: Proto-oncogen del locus 2 de progresión tumoral
- TPY**: Motivo treonina-prolina-tirosina
- TRAIL**: Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF
- Tris-HCL**: Tris(hidroximetil)aminometano hidrocioruro
- Tyr**: Tirosina
- U.V**: Ultravioleta
- UTR**: Región no traducida de los genes
- VEGF**: Factor de crecimiento endotelial vascular
- VLDL**: Lipoproteínas de muy baja densidad
- WT**: Ratones silvestres, sin modificaciones genéticas
- XCdc25C**: Proteína fosfatasa del ciclo de división celular de *Xenopus laevis*



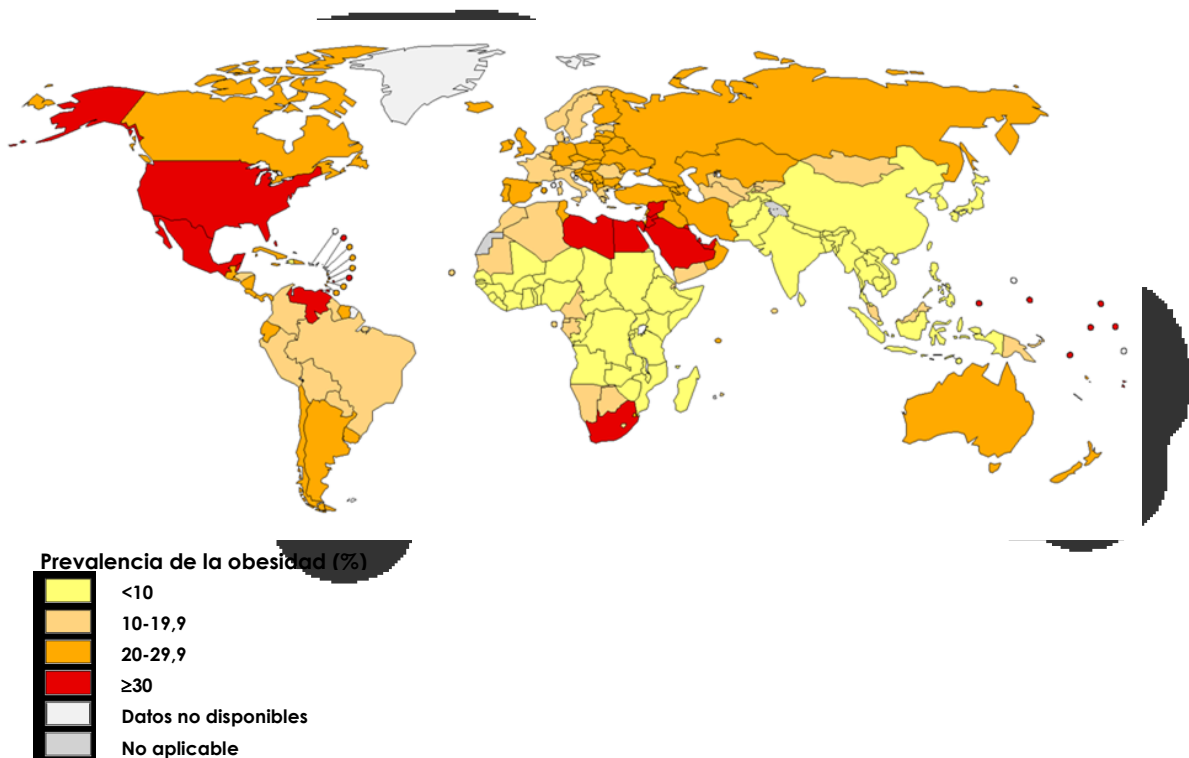
# Introducción

---

## 1. Obesidad

La obesidad y el sobrepeso son definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un acúmulo de grasa excesiva en el organismo, que puede tener complicaciones para la salud. Generalmente, se utiliza el IMC (índice de masa corporal o BMI de sus siglas en inglés) para estimar la obesidad o el sobrepeso, parámetro que es la relación entre el peso en kg dividido por el cuadrado de su altura en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Un IMC mayor de 25 indica sobrepeso y uno mayor de 30 se define como obesidad[1].

### 1.1 Prevalencia y predicción



**Fig. 1:** Mapa mundial de la prevalencia de la obesidad en mayores de 20 años, ambos sexos 2008[2].

La obesidad es una enfermedad no infecciosa considerada actualmente por la OMS como pandemia[3]. Esta enfermedad hasta los años 70 y principios de los 80 no representaba un problema para la mayoría de países. A partir de ese momento, en los

países desarrollados se comenzó a cambiar el estilo de vida, gastando más en alimentos, incrementando el consumo de alimentos menos saludables y disminuyendo el ejercicio físico, lo que resultó en un incremento de la obesidad. En países con menores recursos, la obesidad comenzó a propagarse después, pero lo ha hecho más rápido, gracias a la existencia de la denominada "comida basura", mucho más barata que la comida sana[1].

En el año 2008, se estimó que la obesidad había aumentado un 5% en hombres y un 6% en mujeres respecto a 1980. En cifras, 205 millones de hombres y 297 millones de mujeres eran obesos[4] (Fig.1). La IASO/IOTF (International Association for the Study of Obesity/International Obesity Taskforce) en su análisis del 2010 estimó que aproximadamente 1000 millones de adultos tenía sobrepeso[5]. Por su parte, la Organización Mundial de la Salud estima que para el año 2015 2300 millones de personas adultas tendrán sobrepeso y 700 millones serán obesos, por lo que el incremento de la obesidad en el mundo es evidente, así como también lo son sus consecuencias[1].

El claro incremento de la obesidad mundial ha producido un incremento de la investigación en esta área, aumentándose de esta manera las publicaciones relacionadas con la obesidad. Así, en el año 2000, según el NCBI (National Center for Biotechnology Information), estas no superaban los 4.000 artículos, mientras que en el año 2012 se publicaron más de 15.000 relacionados con obesidad

## 1.2 Enfermedades asociadas a la obesidad

Los cambios en el metabolismo y el exceso de acúmulo de grasa en ciertos tejidos desencadenan numerosas enfermedades relacionadas con la obesidad que se muestran a continuación (tabla 1).

Clasificación de enfermedad	Tipo de enfermedad
Metabólicas	Diabetes tipo 2[6-8]
	Ovario poliquístico[9, 10]
	Dislipidemia[11]
	Síndrome metabólico[12-14]
Cardiovasculares	Hipertensión arterial[15]
	Enfermedad coronaria[16, 17]
	Insuficiencia cardiaca[18, 19]
	Trombosis venosa profunda[20]
Respiratorias	Apnea del sueño[21]
Digestivas	Cálculos vesiculares [22]
	Hígado graso[23]
	Reflujo gastro-esofágico[24]
	Hernia hiatal[24]
Osteo-articulares	Artrosis[25]
	Artritis, gota[26]
	Osteoartritis[27]
	Enfermedad articular[25, 26]
	Menor movilidad[28]
Hormonales	Alteraciones menstruación[29]
	Disminución de la fertilidad[30]
Piel	Úlceras varicosas[31]
	Micosis[31]
	Dermatitis[32]
Cáncer	Endometrio[33]
	Próstata[34]
	Colon[35]
	Mama[36]
psicológicas	Disminución de la autoestima[37]
	Ansiedad[38]
	Depresión[38]
	Trastornos cognitivos[39]
oculares	Glaucoma[40]
	Cataratas[41]
	Degeneración macular[42]
	Ceguera[40]

**Tabla 1: Enfermedades asociadas a la obesidad.**

En esta tesis nos vamos a centrar especialmente en dos de las principales patologías asociadas a obesidad: la diabetes mellitus tipo 2 y la esteatohepatitis no alcohólica.



### 1.3 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

La diabetes tipo 2 (DM2) es la más extendida en el mundo (80-90% de todas las diabetes) siendo su condición crónica. El auge de esta enfermedad en los últimos años se debe tanto al incremento de la vida sedentaria como al incremento de la obesidad en la población. Mientras que la prevalencia de la diabetes en el mundo era del 6,4% en el año 2000, se prevé que sea del 7,7% en el año 2030. Esto quiere decir que habrá un aumento de 285 millones a 439 millones de personas que padezcan esta enfermedad en dicho año[43].

En el desarrollo de la DM2 participan componentes genéticos que predisponen a padecer la enfermedad que, sumados a los efectos ambientales, hacen que la diabetes sea muy heterogénea. La DM2 afecta a la manera en que el organismo metaboliza los glúcidos, pero también los lípidos y las proteínas, produciendo un incremento de la glicemia, resistencia a la insulina en tejidos periféricos e hiperinsulinemia en estados iniciales de la enfermedad[44]. Sin embargo, a diferencia de la diabetes tipo I, en la que se produce un fallo en las células beta pancreáticas y por tanto, en la secreción de insulina, la diabetes tipo 2 no se debe a la carencia de insulina en el organismo, al menos no inicialmente aunque, con el tiempo puede derivar en una leve deficiencia en la secreción de la misma.

#### 1.3.1 Insulina

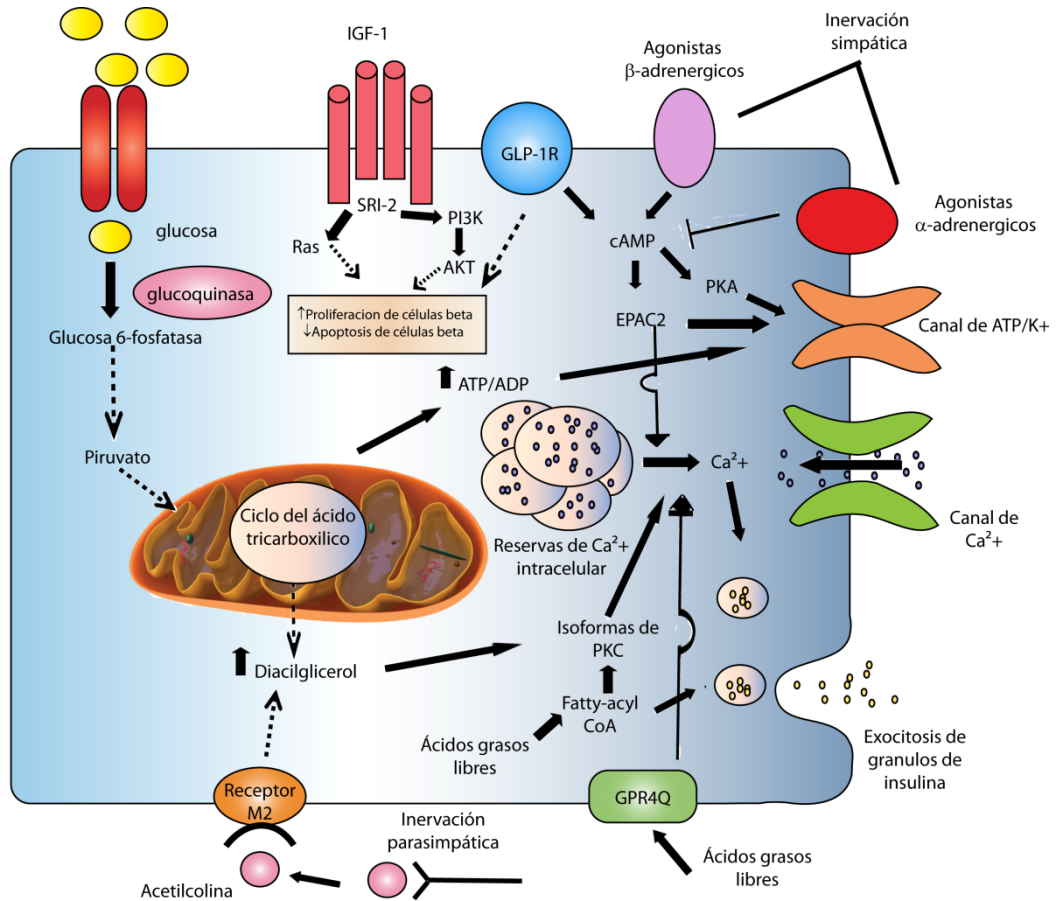
Para entender el mecanismo de la diabetes primero se debe analizar cuál es el proceso normal de la homeostasis de la glucosa en el organismo.

##### 1.3.1.1 Secreción de la Insulina

La insulina es una hormona producida por las células beta pancreáticas que es clave para la regulación de la homeostasis de la glucosa, así es la responsable de mantener la normoglicemia (cantidad normal de glucosa en sangre) mediante un equilibrio entre su acción en los tejidos y su secreción desde el páncreas.

La secreción de insulina se estimula por la presencia de glucosa en sangre que es captada por el receptor Glut2 del páncreas[45, 46] y, tras varios procesos, se oxida

en el ciclo de Krebs, produciendo ATP. Esto desencadena el cierre de los canales de  $K^+$  sensibles a ATP[47], induciendo una despolarización de la membrana de las células beta pancreáticas que permite la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula y la posterior fusión de los gránulos de insulina acumulados en el citoplasma a la membrana plasmática, logrando finalmente su liberación a circulación[46](Fig. 2).



**Fig. 2: Secreción de insulina en células beta pancreáticas:** La secreción de insulina es producida por estímulo de glucosa, el cual induce a un aumento en la relación ATP/ADP. Este cambio produce el cierre de canales de  $K^+$  + ATP, la despolarización de la membrana plasmática, el aumento de las concentraciones de calcio citoplasmáticas y la exocitosis de los gránulos que contienen insulina. Si se incrementa la demanda de insulina, el metabolismo de la glucosa en las células beta puede ser mejorada por el aumento de actividad de la enzima glucoquinasa y por la reposición de los productos intermedios del ciclo del ácido tricarboxílico. A su vez los aumentos en los niveles de citrato inducido por glucosa, conducen a un aumento de cantidades de malonil CoA, que a través de la inhibición de la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT-1) conducen a un aumento de los niveles de Acil CoA, de diacilglicerol ( DAG) y de la señalización a través de la proteína quinasa C ( PKC) . Los ácidos grasos también participan de la liberación de insulina a través de los receptores acoplados a proteínas G , GPR40 o a través del metabolismo de Fatty-acyl CoA y la estimulación de la exocitosis de insulina. También se ha descrito que GLP - 1 potencia la liberación de insulina estimulada por glucosa a través de su receptor acoplado a proteínas -G por medio de mecanismos que incluyen la estimulación de la proteína quinasa A (PKA) y el factor de intercambio de nucleótidos de guanina EPAC2. Del mismo modo, la liberación de acetilcolina desde las terminaciones nerviosas parasimpáticas activa el receptor muscarínico M2 , estimulando la liberación de insulina dependiente de DAG y PKC. A su vez, la masa de células beta puede ser regulada positivamente por el receptor IGF-1, en el que el SRI-2 se fosforila y activa una cascada de moléculas, incluyendo PI3K , AKT y Ras , lo que resulta en una mejor supervivencia de las células beta. Por último, receptor GLP-1 (GLP-1R)

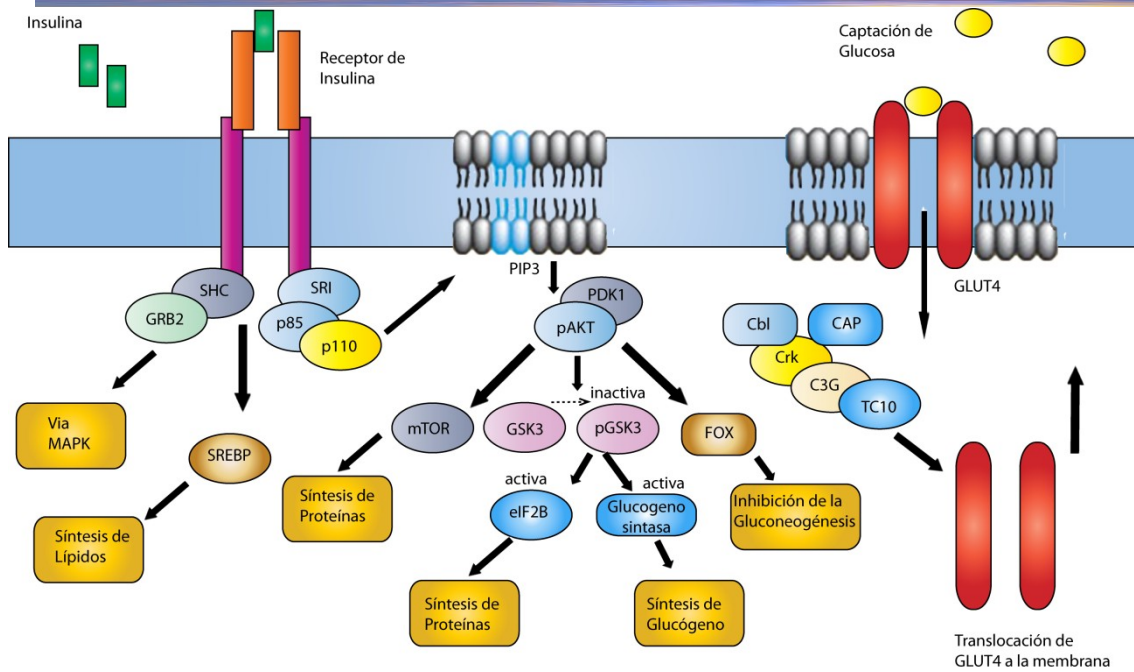
puede incrementar de manera similar la supervivencia de las células beta e inhibir la apoptosis de las mismas a través de varias vías, incluyendo la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico y la vía del SRI-2.

### 1.3.1.2 Vías de señalización de la insulina

La insulina, tras la unión a su receptor en los distintos tejidos, induce una serie de eventos que lleva a la translocación del transportador de glucosa Glut4 a la membrana (Fig. 3 y 4).

El receptor de insulina (RI) es un heterotetrámero unido a membrana que posee dos subunidades alfa y dos subunidades beta. La unión de la insulina a las subunidades alfa permite un cambio conformacional que activa la autofosforilación del receptor y la fosforilación de otras proteínas como los sustratos de receptores de insulina (SRI), SHC y Cbl. Estas, tras la fosforilación de sus tirosinas, actúan como sitios de unión a proteínas con dominios SH2, como la PI3K, Grb-2 y SHP-2, produciendo un amplio número de respuestas que van desde la translocación de Glut4 a la membrana a la síntesis de proteínas, lípidos y glucógeno, así como la regulación de la expresión de genes [48-50]. Por un lado, la fosforilación de SRI y SHC induce la unión de Grb2 a los motivos fosforilados logrando así su activación. Grb2 activa al factor intercambiador de guanina RAS que está en la membrana plasmática, activando esta a su vez, a una enzima serina/treonina quinasa que termina en la activación de la cascada de Raf/MEK/ERK[49].

Por otro lado, el SRI también recluta a la membrana a PI3K, la cual cataliza la conversión de fosfatidilinositol(4,5)P2 (PIP2) a fosfatidilinositol(3,4,5)P3 (PIP3). El aumento de PIP3 en la membrana celular resulta en el reclutamiento de proteínas con dominio PH, como AKT o PDK1, a dicha membrana[50, 51]. AKT es fosforilada por PDK1 en su residuo treonina 308 y por mTORC2 en el residuo serina 473. Una vez fosforilada, AKT se activa y fosforila a la proteína glicógeno sintasa-3 inactivándola y a AS160 RAB-GTPasa que interacciona con RAB10 y permite la translocación de Glut4 a la membrana[50, 51]. La finalización de esta señalización está a cargo de la proteína tirosina-fosfatasa IB (PTP1B), PTEN y SHIP2, las cuales inactivan los productos lipídicos de PI3K[48].



**Fig. 3: Señalización de la insulina:** La activación del receptor de insulina induce al aumento de la transcripción de SREBP y a la fosforilación de miembros de la familia del SRI, SHC y Cbl. Tras la fosforilación de tirosinas, estas proteínas interactúan con moléculas de señalización a través de sus dominios SH2, lo que resulta en la activación de una variedad de vías de señalización, incluyendo a la PI3K, las MAPK y la activación del complejo Cbl/CAP. Estas vías actúan de forma coordinada para regular el metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas.

## 1.3.2 Mecanismos moleculares de la DM2

### 1.3.2.1 Resistencia a la insulina

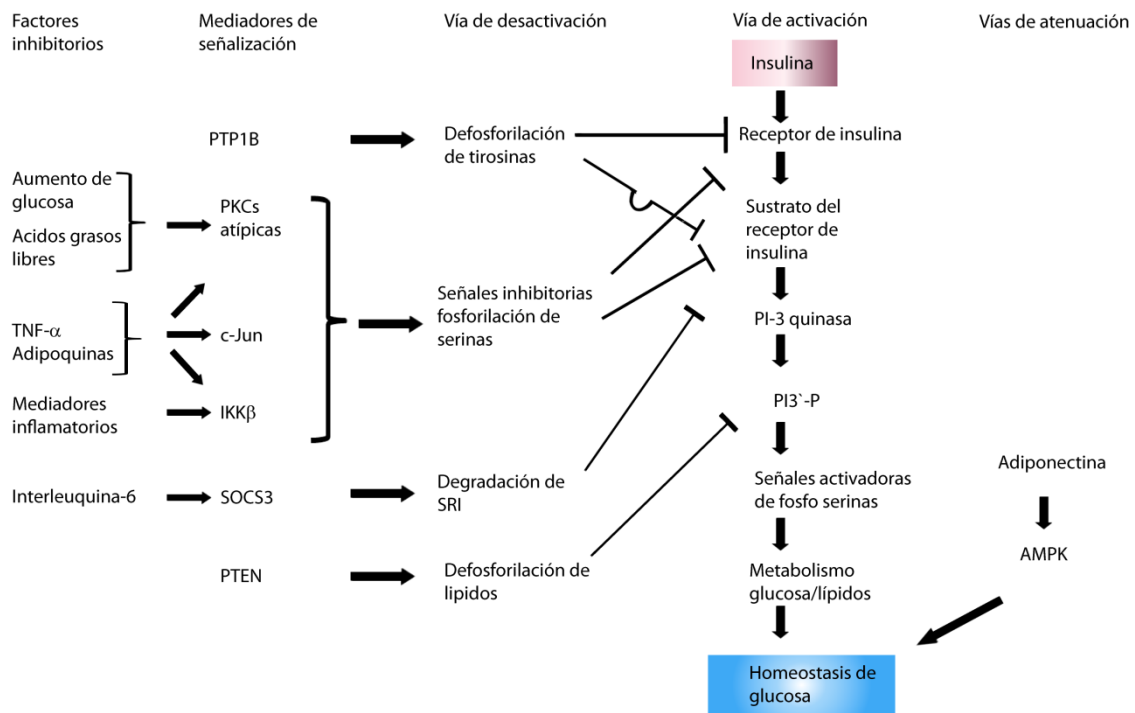
La resistencia a la insulina se define como una condición caracterizada por una menor actividad biológica de esta hormona. Esta menor actividad se expresa en sus diferentes acciones metabólicas, siendo la más evidente el desajuste en el metabolismo de la glucosa que se manifiesta en órganos y tejidos como el hígado, tejido adiposo y muscular así como también en el endotelio[44].

En un estado de resistencia a la insulina, las vías de señalización no responden apropiadamente. Por ejemplo, los efectos de la fosforilación de SRI son ahora opuestos por la acción de de-fosforilación de los residuos de tirosina por proteínas tirosina fosfatasas y por la fosforilación en residuos serina y treonina del SRI, lo que reduce su habilidad para actuar como sustrato del receptor de insulina, impidiendo así la señalización posterior. Entre los estímulos que promueven la fosforilación de serina-

treoninas en SRI1 y SRI2 están, los ácidos grasos libres, el diacilglicerol, la glucosa y las cerámidas[52], los cuales inducen la fosforilación de SRI1 y SRI2 por diversas proteínas como, mTORC1-S6K1 [53-56], IKK[57], ROCK1 [58, 59], PI3K-AKT[48], ERK1/2[60] y las estrés quinastas JNK[57] y p38[61, 62].

En cuanto a las proteínas fosfatasa implicadas en la defosforilación de la tirosina del receptor de insulina y que permiten la regulación negativa de la señalización de insulina, se encuentran la tirosina fosfatasa PTP1B[63], la tirosina fosfatasa transmembrana LAR[64], la proteína tirosina fosfatasa con dominio SH2 que contiene PTPasa-2 (SHP-2)[65] y la fosfatasa relacionada con antígeno leucocitario (LRP)[66].

La cantidad de SRI y RI también puede ser regulada por degradación en la que participan las proteínas de la familia SOCS a través de la vía de ubiquitina-proteasoma[67-69] (Fig.4).



**Fig. 4: Señalización de la insulina y resistencia a la insulina:** La insulina al unirse a su receptor es seguida por una cascada de eventos intracelulares, representado como las vías de activación. La modulación negativa de la acción de la insulina puede producir la resistencia a la insulina, esta modulación puede ser en parte por factores de transcripción, que participan en las vías de desactivación (tirosinas fosfatasa, serina quinasa, fosfatasa y lípidos) o a las acciones inhibitorias sobre la señalización de insulina (las vías de activación). A su vez, la adiponectina tiene una función en el metabolismo de la glucosa al mejorar de una forma distinta la señalización de insulina. Adaptado de Stumvoll y col [70]

### 1.3.2.2 Ácidos grasos libres , citoquinas y adipoquinas

El metabolismo de los ácidos grasos también juega un papel muy importante en la DM2 y la obesidad. El incremento de nutrientes expande el tejido adiposo para almacenar el exceso de energía en los adipocitos. Si esta acción se mantiene a lo largo del tiempo, el adipocito, en algún momento, deja de almacenar lípidos y comienzan a activarse mecanismos de estrés en el retículo endoplásmico, desencadenando una salida de ácidos grasos libres o no esterificados a la circulación [71].

Existe un delicado equilibrio entre los ácidos grasos que adquiere y libera el músculo esquelético y las células beta pancreáticas. El aumento de ácidos grasos libres es capaz de romper dicho equilibrio, produciéndose un incremento en la captación, re-esterificación y almacenamiento como triglicéridos[72].

En obesidad, el hígado también almacena gran cantidad de triglicéridos, debido de nuevo al incremento de los ácidos grasos libres y posterior re-esterificación. Este acúmulo de triglicéridos altera los procesos normales que controlan la señalización de la insulina, induciendo la resistencia de la misma. Por ejemplo, en una situación normal la insulina detiene la producción de glucosa en el hígado; cuando existe una resistencia a la insulina, esta es incapaz de paralizar dicha producción, con lo que se observa un aumento en los depósitos de glucosa que finalmente se transformarán en triglicéridos y se almacenarán en hígado[73, 74] (Fig. 5).

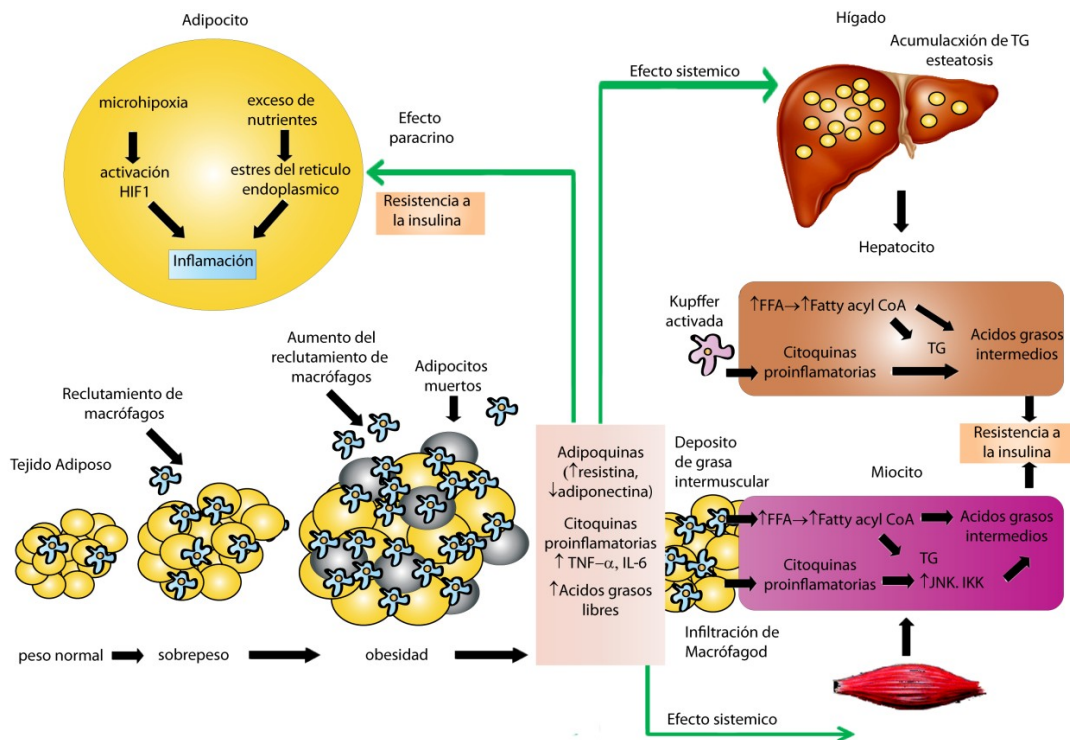
Por otro lado, los ácidos grasos libres inhiben la acción de la insulina en el metabolismo de la glucosa en distintos tejidos. Por ejemplo, en el músculo el exceso de ácidos grasos libres activa a PKC- $\theta$  inhibiendo la acción de SRI-1, mientras que en el hígado esta inhibición es mediada por PKC- $\epsilon$  que actúa sobre SRI-2[73, 75, 76]. A su vez, la activación de las isoformas atípicas de PKC (PKC $\lambda$ , PKC $\zeta$ ) en músculo incrementa los niveles de diacil-glicerol, activando a las quinasas IKK y JNK. Estas fosforilan el SRI en serinas y treoninas inhibiendo finalmente la ruta[57, 75, 77].

La obesidad, así como la DM2, resulta en un estado de inflamación crónica, donde hay un incremento de células inflamatorias como macrófagos y se liberan citoquinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleuquina 6 (IL-6)[78, 79]. La inflamación participa en el desarrollo de la resistencia a la insulina, pues aumenta la actividad de diversas proteínas quinasas como JNK y p38, que pueden inhibir la acción de la insulina en SRI-1 y RI[80-82].

TNF- $\alpha$  incrementa también la lipólisis en adipocitos, aumentando aún más los ácidos grasos libres en circulación. De hecho, se ha visto que la delección de los

receptores de  $TNF-\alpha$  en adipocitos disminuyen la lipólisis y que la neutralización de  $TNF-\alpha$  revierte la resistencia a insulina en roedores[83-86].

Otra citoquina pro-inflamatoria relacionada con la obesidad es la IL-6, la cual tendría un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina. La IL-6 participaría en este proceso a través de las proteínas SOCS, por ejemplo, se ha descrito que la IL-6 en hígado activa a STAT3 aumentando la expresión de SOCS3 e induciendo la inhibición de receptor de insulina y del SRI[87]. Se ha visto que la sobreexpresión de esta citoquina induce pérdida de peso, hiperinsulinemia y la inhibición de la captación de glucosa en el músculo, además de inflamación hepática[88]. Sin embargo, su ausencia aumenta la resistencia a la insulina y la inflamación hepática inducida por la alimentación rica en grasa, debido a defectos en la función mitocondrial[79].



**Fig. 5: Efecto de la obesidad en tejido adiposo, músculo e hígado:** El exceso de nutrientes, el aumento de peso y finalmente la obesidad, producen la expansión del tejido adiposo y el tamaño de los adipocitos. Esta expansión induce a la liberación de ácidos grasos libres totales a circulación y se reduce el suministro de oxígeno al adipocito. La combinación de hipoxia y nutrientes conduce a la inducción de HIF-1 y otros genes "downstream", así como también al incremento de estrés dentro del adipocito. Esto puede desencadenar en la muerte del adipocito, y también terminar en una respuesta inflamatoria característica. La respuesta inflamatoria incluye el aumento de la producción y liberación de citoquinas/quimioquinas pro-inflamatorias y el reclutamiento de macrófagos derivados de médula ósea. Estos macrófagos se encuentran polarizados a M1 y liberan citoquinas pro-inflamatorias que actúan de forma paracrina para activar en las células vecinas y de manera endocrina en los tejidos distales, las vías pro-inflamatorias intracelulares como JNK e IKK entre otras. Los macrófagos promueven el reclutamiento y la infiltración de más macrófagos en el tejido adiposo. Esto se traduce en la resistencia a la insulina en los adipocitos y el hígado, la exacerbación del estado inflamatorio y la resistencia sistémica a la insulina. Con la obesidad, existe también una mayor acumulación de grasa en el músculo esquelético, la cual es infiltrada con macrófagos proinflamatorios que pueden causar resistencia a la insulina de manera paracrina en el músculo esquelético.

Las adipoquinas son citoquinas producidas por el tejido adiposo entre las que se encuentran la adiponectina y la leptina. La adiponectina es un oligómero de distintos pesos moleculares, siendo la de alto peso molecular (HMW) la forma más activa[89]. La adiponectina disminuye al aumentar la obesidad central y es clave en la regulación del metabolismo de la glucosa y de los lípidos[89].

La adiponectina, a través de la proteína AMPK, activa factores de transcripción como SREBP-1 logrando la inhibición de la producción de triglicéridos y ácidos grasos. Dicha inhibición sucede porque la AMPK regula el metabolismo en diversos puntos y tejidos. En hígado suprime la gluconeogénesis al cambiar la actividad, concentración y localización de enzimas claves de este proceso como PEPCK, HNF4, TORC2; reduce la producción de glucógeno al inhibir a la glucógeno sintasa, aumenta la incorporación de ácidos grasos al hígado a través de CD36, incrementa la oxidación de lípidos y reduce la producción de colesterol a través de ACC, así como la biogénesis de mitocondrias al incrementar la expresión de genes como PGC1 $\alpha$  [90]. En músculo incrementa la incorporación de glucosa al incrementar la transcripción de Glut4, incrementa la incorporación y oxidación de ácidos grasos al inhibir a ACC, reduce la producción de proteínas al inhibir la vía de mTOR, aumenta la biogénesis de mitocondrias al incrementar genes como PGC1 $\alpha$  y controla el metabolismo del glucógeno al inactivar a la glucógeno sintasa [90]. Por su parte, en el sistema nervioso central controla la ingesta de comida y los ciclos circadianos a través del control de la producción de neuropéptidos [91]. Y por último, en el páncreas disminuye la liberación de insulina estimulada por glucosa al reducir el tráfico de vesículas que contienen esta hormona, además inhibe la transcripción de genes que favorecen la producción de insulina en las células beta y estimula la secreción de glucagón por parte de las células alfa[91]. Todo ello explicaría por qué la adiponectina tiene un efecto de sensibilización a la insulina en hígado y músculo.

Además, la adiponectina al activar a AMPK induce a través de p38, la activación del factor de transcripción PPAR $\alpha$ , que está altamente expresado en músculo, corazón, riñón e hígado, logrando así un incremento en la oxidación de las grasas[90, 92, 93].

Por otro lado, la leptina a nivel central inhibe el apetito e incrementa el gasto energético, mientras que en el músculo esquelético y en la grasa induce la oxidación de ácidos grasos a través de la activación de AMPK[94]. La disminución en los niveles de leptina es interpretado por el organismo como una escasez energética. Esto es visto como una señal para consumir alimentos y así ingresar energía al organismo, tras lo cual se produce un aumento de los niveles de leptina circulante, que inhibe la señal de necesidad energética. En obesidad, normalmente los valores de leptina en el



organismo son elevados lo que ocasiona que los tejidos ya no responden a la adiposquina, produciendo una resistencia a la leptina[90].

### 1.3.2.3 Disfunción mitocondrial

La cantidad de lípidos al interior de la célula es regulada por procesos de oxidación, pero en caso de una sobrecarga de lípidos que exceda dicha oxidación o un fallo en la función mitocondrial, no se producirá esta regulación[95]. La disfunción mitocondrial disminuye la capacidad de remover ácidos grasos dentro de la célula por desacoplamiento de la  $\beta$ -oxidación y por re-esterificación de los ácidos grasos libres[96]. Esto produce un incremento de triglicéridos al interior del adipocito, siendo incluso acumulados en tejidos diferentes al adiposo, como músculo e hígado, produciéndose también en ellos una disfunción mitocondrial[95, 97], ayudando aún más a la producción de la resistencia a la insulina en estos tejidos[96]. Además se ha descrito que la función y cantidad de mitocondrias es deficiente en músculos de pacientes con DM2 y obesidad[98], lo que ayudaría aún más a acentuar esta enfermedad. También se ha visto que los pacientes de DM2 tienen una menor expresión de genes que codifican las enzimas que participan en la fosforilación oxidativa de los ácidos grasos y producción de ATP como son la PPAR- $\gamma$  y la PGC-1 $\alpha$ , participando también en la menor respuesta a insulina[99].

### 1.3.2.4 Fallo de células beta pancreáticas

Existe un claro vínculo entre la pérdida de masa pancreática de las células beta y el desarrollo de la DM2[100, 101]. Se cree que como consecuencia de la suma del exceso metabólico y del estrés oxidativo, se produce un fallo que conduce a la apoptosis de las células beta pancreáticas.

Por una parte, el fallo de estas células ocurre tras un periodo de gran hipersecreción de insulina. Debido al estímulo generado por IR/IGF-1R a través de la señalización de SRI-2 se produce un incremento en la masa de células beta que logra generar una gran secreción de insulina, que no puede ser mantenida a lo largo del tiempo. En esta situación, las células beta son susceptibles a la respuesta de proteínas desplegadas del retículo o UPR, debido a que la sobreproducción de insulina induce fallos en el plegamiento de sus polipéptidos, los cuales son susceptibles a UPR[102, 103].

Por otra parte, estas células al producir bajos niveles de antioxidantes, como la catalasa y la enzima superóxido-dismutasa, hace que sean susceptibles al daño producido por las especies reactivas de oxígeno (ROS), pudiendo incluso llevar a la apoptosis de las células beta pancreáticas[104, 105].

### 1.3.2.5 Genes candidatos asociados a DM2

La DM2 está fuertemente influenciada por los genes. La heredabilidad de la DM2 parece estar compuesta de muchas variantes, cada una con un leve impacto en la enfermedad. Tener un padre con DM2 aumenta el riesgo a desarrollar la enfermedad un 20% y un 40% si los dos progenitores sufren la enfermedad[106].

Actualmente existen diversos genes que se asocian al desarrollo de la DM2 y que codifican para proteínas como: PPAR $\gamma$ , IRS, PGC-1 $\alpha$ , SUR1, KIR6, HFN4 $_A$ , HNF1B, Calpain-10, entre otras[107]. Sin embargo, el ambiente y el comportamiento afectarían al efecto que estas variaciones genéticas tienen en el desarrollo de la DM2.

### 1.3.2.6 Esteatohepatitis no alcohólica (NAFLD)

Descrita hace más de 30 años, la esteatohepatitis no alcohólica (del inglés NAFLD: Non alcoholic fatty liver disorders) es un espectro de enfermedades hepáticas que se asocia a la obesidad. Esta enfermedad tiene diferentes niveles de evolución, comenzando con un acúmulo de grasa en hepatocitos, evolucionando a esteatosis hepática, avanzando a esteatohepatitis (del inglés NASH: Non alcoholic steatohepatitis) y cirrosis, llegando incluso a desarrollar carcinoma hepatocelular[108]. Todas estas patologías aparecen por causas ajenas al consumo de alcohol[109, 110]. La cantidad de grasa en el hígado para diagnosticar NAFLD debe ser superior al 5%, y esta se determina por biopsia hepática[109].

Alrededor del 20-30% de la población general tiene NAFLD[111, 112], llegando a ser la principal causa de enfermedad hepática en el mundo. La mayoría de pacientes con NAFLD tiene alguna otra patología asociada como obesidad (60-100%), hiperlipidemia (27-92%), hipercolesterolemia, diabetes (28-55%), resistencia a la insulina o síndrome metabólico[113]. Aproximadamente un cuarto de los pacientes con NAFLD llegan a desarrollar NASH, que puede progresar hasta carcinoma hepatocelular[108],

el cual es el quinto cáncer más común del mundo y la tercera causa de muerte relacionada con cáncer[114].

### 1.3.3 Etiopatogenia

La NAFLD puede producirse por diversas enfermedades subyacentes como la obesidad, pero además existen otras patologías o condiciones asociadas a su desarrollo como: resistencia a la insulina[115, 116], DM2[117], hiperlipidemia[118], trastornos alimentarios[119], fármacos o sustancias químicas[119], disfunción pituitaria e hipotalámica[120], lipodistrofia[120], enfermedad de Wilson[120], gluconeogenesis tipo 1[120], abetalipoproteinemia[120], cirugía bariátrica[119], dietas hipocalóricas[119] o sobrecarga de depósitos de hierro[119].

### 1.3.4 Mecanismos moleculares del desarrollo de NAFLD-NASH

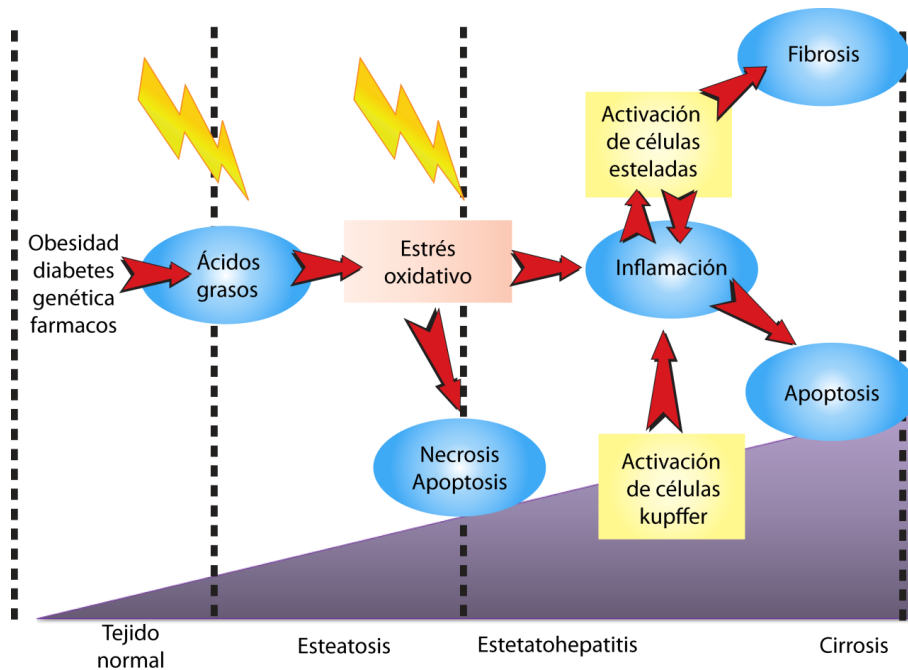
La teoría del doble impacto (Two hit hypothesis, Fig. 6), defiende que para desarrollar NASH y cirrosis hepática, el hígado tendría que pasar por dos tipos de daño:

**a)** El primer impacto es la **resistencia a la insulina**, la cual causa un desequilibrio del metabolismo de los ácidos grasos que lleva a la acumulación de triglicéridos hepáticos o esteatosis. Dado que en una situación de resistencia a la insulina no se suprime la lipólisis, se genera un exceso de ácidos grasos libres en circulación que es captado por el hígado y re-esterificado como triglicéridos[121], permitiendo que estos ácidos grasos se re-esterifiquen y se almacenen en el citosol del hepatocito como triglicéridos o sirvan para la producción de partículas VLDL[122]. Sin embargo, es conocido el hecho de que la hiperinsulinemia inhibe la producción de apolipoproteínas-B, por lo que se inhibiría en parte la exportación de partículas VLDL, incrementándose así el acúmulo de lípidos en el interior del hepatocito[122].

Además se acepta que el aumento de ácidos grasos en el interior del hepatocito se debe también a un incremento de la síntesis *de novo* de ácidos grasos. La hiperinsulinemia, puede estimular la lipogénesis en hígado al activar al factor de transcripción SREBP-1C, el cual, en el hepatocito, activa los genes implicados en la lipogénesis[123]. También SREBP-1C activa la proteína Acetil-CoA carboxilasa 2 (ACC-2) que promueve la formación de manonil-coenzima A (Co-A), inhibiendo a la carnitina

palmitil transferasa 1 (CPT-1), que transporta los ácidos grasos al interior de la mitocondria para su oxidación, logrando inhibir así la oxidación de ácidos grasos[123]. Por otro lado, la hiperglicemia activa a la proteína de respuesta de unión a carbohidratos (ChREBP), incrementándose también así la lipogénesis. La activación de SREBP por la hiperinsulinemia y de ChREBP por la hiperglicemia, incrementan[124] la síntesis de ácidos grasos en el hepatocito que junto con la captación de los ácidos grasos libres y la inhibición de la oxidación mitocondrial de los mismos, induce el desarrollo de la esteatosis hepática[125].

También la familia de proteínas PPAR participan en la esteatosis hepática. Existen 3 isoformas PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  y PPAR- $\gamma$ , las cuales controlan diversos aspectos del metabolismo lipídico, oxidación de ácidos grasos, metabolismo de glucosa e inflamación vascular entre otras funciones. PPAR- $\alpha$  se sabe, controla la expresión de muchas de las enzimas relacionadas con el catabolismo de los ácidos grasos que ocurren en mitocondrias y peroxisomas[124, 126]. PPAR- $\gamma$  puede ser activado por SREBP-1C[127], que a su vez activa la expresión de genes importantes en la lipogénesis como SCD-1, ACC, FAS, GPAT, los cuales promueven la formación de triacilglicerol[128]. Asimismo, PPAR- $\gamma$  participa en la diferenciación y captación de lípidos en adipocitos[129]. De hecho los animales KO para PPAR- $\gamma$  no son capaces de generar tejido adiposo tras una dieta rica en grasa[130].



**Fig. 6: Teoría del doble impacto para el desarrollo del NASH:** El primer impacto consiste en la acumulación intrahepática de ácidos grasos, que está estrechamente asociada con la resistencia a la insulina, y que aumenta la susceptibilidad de los hepatocitos a lesiones secundarias o segundos impactos como el estrés oxidativo, llevando finalmente al hepatocito a la disfunción mitocondrial, la sobreproducción y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, y la activación mediada por endotoxinas de la respuesta inmune innata.

**b)** El segundo daño que se produce es el aumento en el **estrés oxidativo** y el aumento de la **peroxidación lipídica**, que resulta del esfuerzo del organismo por eliminar los lípidos y que conlleva una desregulación de la producción de citoquinas. El aumento del estrés oxidativo se produce por un desequilibrio entre las sustancias oxidantes y antioxidantes, induciendo la aparición de eventos patológicos en el hígado[131, 132]. Las sustancias reactivas de oxígeno son el superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ) y provienen de las mitocondrias, peroxisomas y microsomas. En la esteatosis hepática hay unas concentraciones altas de ácidos grasos libres y una elevada beta-oxidación mitocondrial que genera un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno[133, 134]. Además, dichas moléculas pueden activar a  $NF-\kappa\beta$  induciendo la producción de sustancias citotóxicas, pro-inflamatorias y fibrogénicas por parte de las células de Kupffer y demás células del parénquima hepático[135]. Asimismo, dañan las membranas de las células induciendo la liberación de citoquinas como  $TNF-\alpha$ ,  $TGF-\beta_1$  y  $IL-8$  entre otras.  $TNF-\alpha$  y  $TGF-\beta_1$  activan caspasas promoviendo la apoptosis del hepatocito, mientras que la  $IL-8$  activa neutrófilos aumentando así la inflamación[136, 137]. Además,  $TGF-\beta_1$  induce la formación de cuerpos de Mallory y colágeno en las células esteladas[136, 137].

Por su parte, la peroxidación lipídica produce sustancias, como por ejemplo el malondialdehído (MDA), que ayudan a prolongar el estado de estrés oxidativo en hígado, ya que poseen una vida media más larga[138]. También disminuyen la exportación de partículas VLDL y aumentan la quimioatracción al hígado de células inflamatorias[131]. Cuando se sobrepasa la capacidad del hepatocito para recuperarse, se produce la muerte celular del mismo. Se podría considerar que entonces la muerte de los hepatocitos es el tercer evento que desencadenaría el paso a NASH. La muerte de estas células induciría la activación de células esteladas y miofibroblastos que resultaría en el aumento de la fibrosis hepática y la estimulación de las células progenitoras para producir quimioatrayentes que atraerían células inflamatorias[139]. Esta respuesta fibro-inflamatoria finalmente conduciría al cambio de la arquitectura normal del hígado que se observa en estados avanzados de la enfermedad, aunque el estímulo inicial haya cesado[111, 139]. En resumen, el desarrollo de NASH se debe a una respuesta del organismo frente a un daño que no es capaz de reparar.

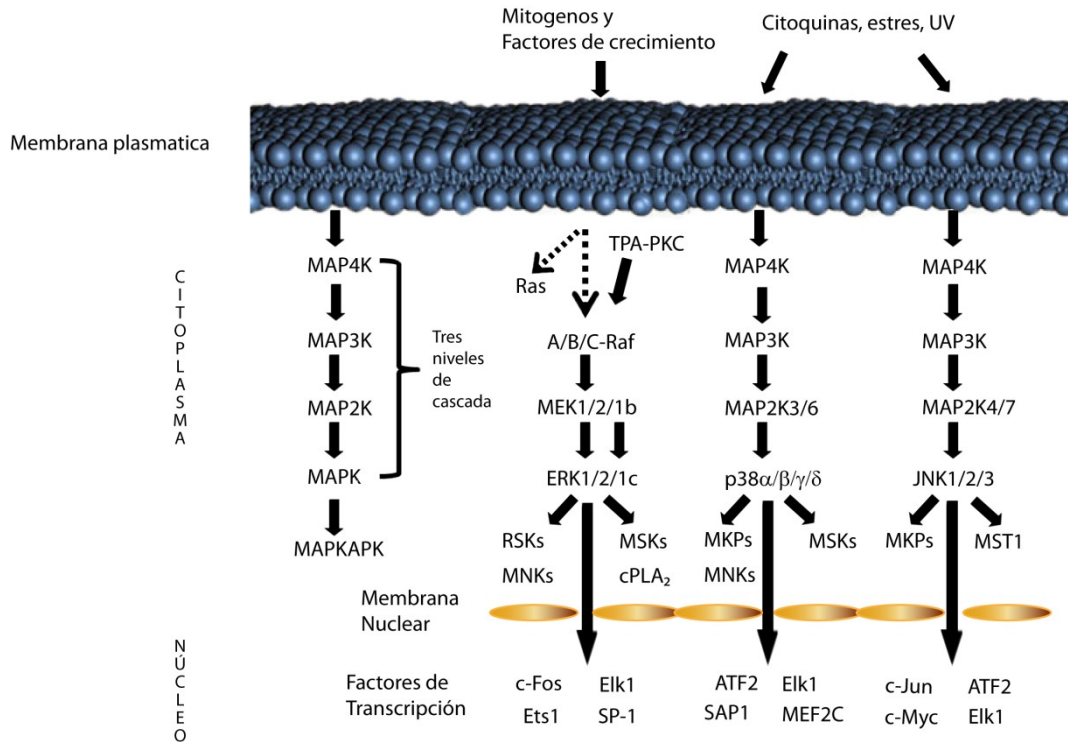
## 2. Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)

La vía de las MAPK es una ruta de transducción de señales en células eucariotas que se encuentra "downstream" tanto a un receptor tirosina-quinasa como a un receptor de citoquinas. Las MAPK son quinasas serina-treonina que se activan por una doble fosforilación en una treonina y una tirosina en el motivo Thr-X-Tyr situado en el subdominio VIII del dominio quinasa[140]. Esta familia media la respuesta de un amplio rango de estímulos extracelulares que incluyen factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y estrés y regulan multitud de procesos celulares tales como el crecimiento celular, la diferenciación, la supervivencia celular, la función neuronal y la respuesta inmune, principalmente mediante el control de la expresión génica a través de la transcripción[141]. Por ello, es una ruta fundamental en respuesta a un amplio rango de procesos celulares que están generalmente desreguladas en estados de enfermedad, como cáncer y enfermedades inmunes[142, 143].

### 2.1. Cascada de activación de las MAPK

La cascada de señalización tiene un núcleo básico (Figura 6) que incluye a la MAPK quinasa quinasa (MAPKKK, MAP3K, o MEKK) que fosforila y activa a MAPK/ERK quinasas (MAPKK, MAP2K, MKK, o MEK), que a su vez activa a las MAPK. Las MAPK activas fosforilan a factores de transcripción, proteínas quinasas y otras proteínas, logrando un cambio en la fisiología celular y la expresión de genes[144, 145].

Las MAPK se pueden dividir en tres grandes grupos basados en sus motivos de activación (TEY, TPY y TGY): ERK1/2 y bigMAPK kinase 1 (BMK1 o ERK5), c-Jun N-Terminal kinase (JNK, SAPK1) y p38 (SAPK2a, SAPK2b, SAPAK3 y SAPK4). ERK1/2 y BMK1 se activan por mitógenos y JNK junto con p38 por estímulos de estrés y citoquinas, por lo que estas últimas se denominan proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK, "stress-activated protein kinase"). Aunque BMK1 se ha descrito que también puede ser activada por citoquinas y estímulos de estrés[140].



**Fig. 7: Esquema clásico de activación de las MAPK:** La cascada MAPK consiste de tres tipos de proteínas quinasas; quinasa de MAP (MAPK), quinasa de MAPK (MAPKK), y quinasa de MAPKK (MAPKKK). La activación de las MAPK determina la inducción de varias respuestas celulares muy importantes como activación (por fosforilación también) de factores de transcripción, regulaciones transcripcionales, remodelación de la cromatina nuclear, inducción genética inmediata, producción de citoquinas, regulación de apoptosis y progresión del ciclo celular.

## 2.1.1. Proteínas quinasas activadas por mitógenos

Las ERKs fueron las primeras MAPK en ser identificadas a finales de los 80 [146, 147]. ERK 1 y ERK 2 poseen un 83% de homología y pesos moleculares de 44 KDa y 42 KDa, respectivamente [148, 149]. ERK1/2 se expresa en todos los tejidos de mamíferos [140]. Canónicamente ERK1/2 se activa por una cascada desencadenada por mitógenos y factores de crecimiento, que comprende pequeñas proteínas G de la familia Ras-Raf (Raf-1, A-Raf, B-Raf) seguidas por MEK1/2 [150]. Aunque se ha visto que otras proteínas como la proteína quinasa C (PKC) pueden fosforilar y activar a Raf-1 [151, 152]. Así como también otras MAP3K pueden regular a ERK1/2 como Mos, TPL2 proto-oncogene, MLTK e IRAK y citoquinas como la interleukina-1 [153-157]. Por otro lado, la sobre-expresión de MEKK1, MEKK2, o MEKK3, las cuales activan a JNK pueden activar a ERK1/2 indirectamente a través de MEK1/2. Así ERK1/2 puede ser activada por distintas MAP3K en respuesta a distintos estímulos [151, 152, 158-160].

Tras activarse por factores de crecimiento, ERK1/2 se transloca al núcleo, donde fosforila factores de transcripción como ELK-1 y c-Fos regulando la expresión de genes que participan en ciclo celular, diferenciación celular y apoptosis[161].

Se ha descrito que ERK tiene un papel en la proliferación celular y diferenciación[140]. Usando ratones carentes de ERK1, se ha visto que esta proteína tiene un papel en el desarrollo de los timocitos[162]. Mientras los animales carentes de ERK2 mueren en etapas tempranas del desarrollo embrionario por una mala producción del mesodermo y trofoblasto[163-165]. Esto indicaría que las funciones de ERK1 y ERK2 no son idénticas.

Por otro lado, ERK1/2 tiene funciones anti-apoptóticas en respuesta a estímulos como: TNF- $\alpha$ [166], ligando Fas[166], TRAIL[166], radiación[167, 168], estrés osmótico[102, 169-171], hipoxia[172], óxido nítrico[173], peróxido de hidrógeno[174] y agentes quimioterapéuticos[175]. El mecanismo por el cual estas funciones anti-apoptóticas ocurren varía según el tipo celular, tejido y señales reguladoras que recibe la célula. Sin embargo, ERK1/2 también tiene funciones pro-apoptóticas. Por ejemplo, en el sistema nervioso, ERK1/2 está regulando la neurodegeneración[176] y la inhibición de MEK1/2 inhibe la muerte neuronal[177]. ERK1/2 también tiene funciones pro-apoptóticas cuando se induce un daño en el ADN por radiaciones ionizantes o radiación ultravioleta[178, 179].

En 1995 la proteína BMK1 (Big Map Kinase) o ERK 5 fue clonada por dos grupos de forma independiente[180, 181]. Tiene un peso molecular de 102 kDa y se expresa en muchos tejidos como corazón, músculo esquelético, riñón y placenta[180, 181]. La única MAPKK que puede activar directamente a ERK5 es MEK5 que fosforila a esta proteína en los residuos THR y TYR dentro del motivo de activación T-X-Y[182]. Puede ser activada por una gran variedad de estímulos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [183], el factor de crecimiento epidérmico (EGF)[184], el factor de crecimiento fibroblástico (FGF-2)[183], el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)[183], ciertas citoquinas inflamatorias como la IL-6[185] y también en condiciones fisiológicas y patológicas como la isquemia y la hipoxia[183, 184]. Se ha descrito que ERK5 tiene un papel importante en la integridad de los vasos y el mantenimiento de la migración de las células endoteliales[183]. También gracias a ratones carentes de ERK se ha visto que su falta induce a defectos cardíacos que inducen la muerte a estos animales, por lo que tendría un papel en el desarrollo y la homeostasis vascular[183].



### 2.1.2. Proteínas quinasas activadas por estrés

#### 2.1.2.1. JNK

Esta MAPK fue purificada por primera vez del hígado de rata en 1990[186]. Se llama JNK pues se vio que fosforilaba al extremo amino terminal de c-Jun tras exponer las células a estímulos de radiación U.V. Existen 10 isoformas de la proteína JNK derivadas de tres genes JNK1, JNK2 y JNK3, siendo cada gen expresado en proteínas quinasas de 46 o 55 Kda[187]. Las proteínas JNK1 y JNK2 están en todos los tejidos y células, en cambio, la proteína JNK3 parece expresarse exclusivamente en cerebro, aunque también se ha encontrado en testículos y corazón[188].

Las proteínas JNK se activan por estímulos de citoquinas y estrés, lo que desencadena la activación de las MAP3K que a su vez activan a las MKK4 y MKK7. Se ha visto que la proteína MKK4 tendría preferencia por fosforilar el residuo tirosina y la MKK7 por fosforilar la treonina[189, 190]. Cuando las proteínas JNK están fosforiladas y activas se translocan al núcleo, regulando la actividad de distintos factores de transcripción como c-Jun, ATF-2, ELK 1, SMAD4, NFAT4, NFATC1 y p53[191-197].

Se han descrito múltiples funciones para la JNK, como la regulación de la apoptosis[198], la proliferación[199], la esperanza de vida en *C.elegans*[200], cáncer[201], organogénesis embrionaria[202], expresión de citoquinas[203], estabilización de ARNm[204], integridad del citoesqueleto[205] y migración celular[205, 206].

JNK ha sido una de las quinasas más estudiadas en el desarrollo de la diabetes desde que se observó que los ratones carentes de JNK1 eran resistentes a la obesidad y no desarrollaban DM2[207]. Estos resultados se hicieron más relevantes al observarse que en humanos su actividad aumentaba en el tejido graso de personas obesas[208]. Hoy se sabe que ambas isoformas de JNK contribuyen a la resistencia a la insulina[209]. Diversos mecanismos han sido implicados en este fenotipo. Por ejemplo, la JNK fosforilaría el residuo serina-307 del sustrato del receptor de insulina 1 (SRI-1), lo cual causaría la inhibición de la vía[210, 211]. Por otro lado la JNK activaría la producción de citoquinas inflamatorias y ácidos grasos libres[207].

Para determinar el mecanismo concreto por el que JNK contribuye al desarrollo de la diabetes y la obesidad, se ha estudiado la participación de JNK1 en el control del metabolismo de distintos tejidos. Así, ratones que carecen de JNK1 en el tejido adiposo tras ser alimentados con una dieta rica en grasa no desarrollan resistencia a la

insulina en el hígado[212]. JNK1 controlaría la producción de IL-6 por los adipocitos, por lo que los ratones carentes de JNK1 en el tejido adiposo producirían niveles más bajos de IL-6 tras la dieta grasa[212].

Asimismo, la delección de JNK1 en músculo, si bien no afecta al desarrollo de la obesidad, mejora la resistencia a la insulina en dicho órgano por una reducción en la fosforilación en Ser del SRI[213]. Por otro lado, la delección del JNK1 en el hígado, no protege a este órgano de la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa ni contra la esteatosis hepática. De hecho, dichos animales presentan más predisposición a la esteatosis hepática[214].

También la delección de JNK1 y JNK2 en células mieloides protege del desarrollo de resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa e inflamación, tras una dieta rica en grasa, pero no así de la obesidad[215]. Por último, se ha visto que la delección de JNK1 en cerebro induce a un mayor gasto energético, impidiendo el desarrollo de la obesidad y protegiendo al ratón de los problemas asociados a la obesidad[216, 217].

### 2.1.2.2. p38 MAPK

Las p38 fueron identificadas en 1994 por cuatro grupos independientes[218-221]. Estas proteínas pesan 43 KDa y se activan por diversos estímulos como citoquinas inflamatorias, radiación, ácidos grasos libres, U.V y estrés celular, incluido el shock térmico[222]. Todos estos estímulos producen su doble fosforilación en el motivo Treonina-Glicina-Tirosina (TGY) del lazo de activación por la acción de MKK3 y MKK6[223-225]. Sin embargo, MKK4 también activa a las p38 *in vitro*[226, 227]. Estas a su vez son activadas por MAP3K como MLKs (mixed-lineage kinases), ASK1 (apoptosis signalregulatingkinase-1), TAO (thousand and one amino acid) 1 y 2, TAK1 (TGF  $\beta$ -activated kinase 1) y algunos miembros de la familia MEKK (MAPK/ERK kinase kinase)[228]. La activación de las distintas isoformas de p38 por parte de MKK3 y MKK6 no es idéntica y varía en función del tipo celular y la fuerza del estímulo[229-231]. Además, como MKK6 activa a todas las isoformas de p38, se ha sugerido que el tipo de respuesta podría estar condicionado por los niveles de fosforilación de MKK6 desencadenados por ciertos estímulos[231].

Se han identificado y caracterizado cuatro miembros de esta familia: p38 $\alpha$ , SAPK2a o MAPK14; p38 $\beta$ , SAPK2B o MAPK11; p38 $\gamma$ , SAPK3 o MAPK12 y p38 $\delta$ , SAPK4 o MAPK13. p38 $\alpha$  comparte un 50% de homología con ERK2 y es el ortólogo en mamíferos de la proteína Hog1p en levaduras, la cual responde frente a hiperosmolaridad[140].

p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  comparten homología con ERK2 en un 47, 44 y 42 %, respectivamente[140]. Además, las cuatro isoformas tienen una homología similar entre ellas: la p38 $\alpha$  es similar a la p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  en un 75, 62 y 64%, respectivamente[232-236].

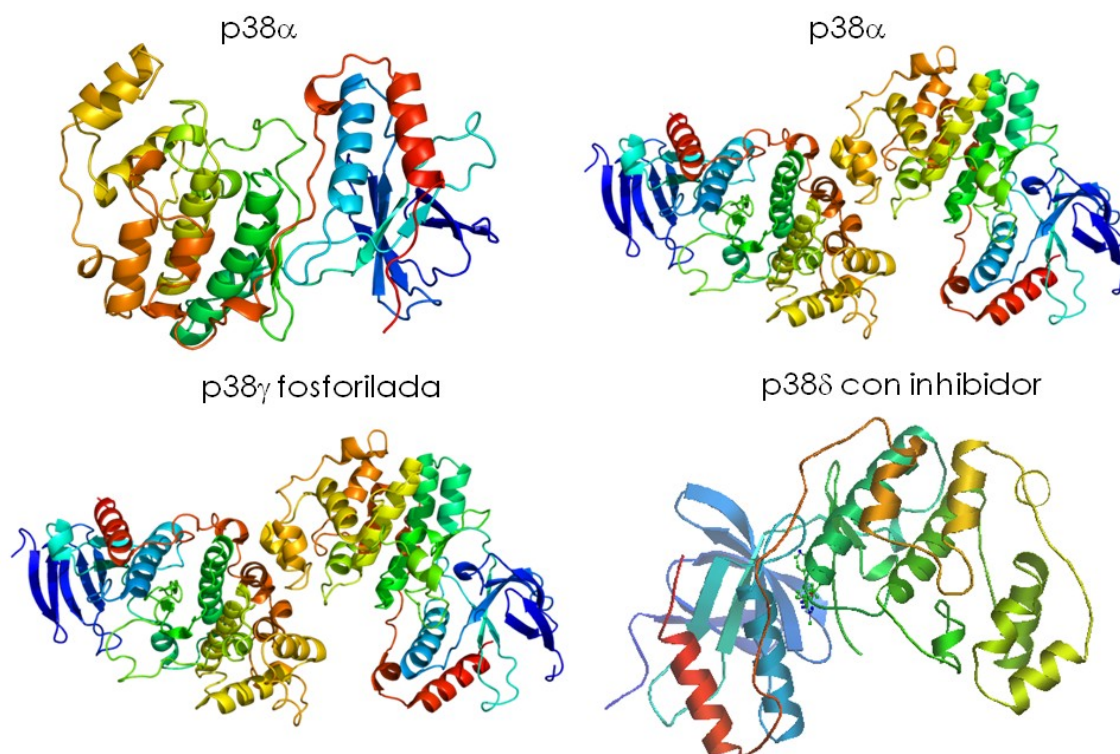
La familia de las p38 se puede clasificar en 2 grupos: uno que incluye a p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  que son expresadas de forma ubicua e inhibidas por compuestos pirimidilimidazol como el SB 203580 y el grupo de p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  que no se inhiben por estos compuestos, comparten un 67% de homología entre ellas y tienen un patrón de expresión diferente[140]. p38 $\gamma$  se expresa preferentemente en músculo y participa en su diferenciación[233], aunque también se ha descrito que se expresa en testículo, pulmón, timo, corazón, piel, cerebro y algunas células hematopoyéticas[237-240]. Mientras, p38 $\delta$  se expresa en testículo, pulmón, riñón, órganos endocrinos e intestino delgado, macrófagos y neutrófilos[237, 239-243].

La diferencia en expresión, activación y especificidad de sustratos, genera un amplio rango de respuestas por parte de estas proteínas.

### 2.1.2.3. Estructura de las p38

Las p38 poseen un dominio proteína-quinasa, un dominio catalítico, un dominio tirosina quinasa, un dominio serina-treonina catalítico y un dominio para la lipopolisacarido quinasa[244]. A excepción del dominio quinasa catalítico, todos los demás dominios son muy pequeños, mientras que el N y C terminal tienen poca homología con otras proteínas a excepción de las p38 y las JNK. Las p38 tienen un sitio de unión a ATP relativamente abierto debido a la conformación proteica, que permite que la unión del N- terminal con el aminoácido L16 no sea tan fuerte como en ERK2[245].

Tanto el residuo de glicina en el motivo de doble fosforilación TGY, como la longitud del loop, dan especificidad de sustrato a estas proteínas[244]. Además la longitud del loop también está relacionada con el control de autofosforilación[244].



**Fig. 8:** Esquema de la estructura tridimensional de las p38 [246-248].

### 2.1.2.4. Inhibidores de las p38

Existen desde hace años inhibidores específicos para las isoformas p38 $\alpha$  y p38 $\beta$ , lo que ha permitido la identificación de sus sustratos y la determinación de sus funciones. Los compuestos pirimidimidazol como SB203580 y SB202190 son inhibidores que compiten por el ATP e inhiben específicamente *in vivo* e *in vitro* a p38 $\alpha$  y p38 $\beta$ , ya que en la cadena lateral del residuo treonina106 que se encuentra en el sitio de unión a ATP interacciona con un átomo de fluor presente en estos inhibidores[249, 250]. Sin embargo, las p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  no poseen esta treonina por lo que no pueden interactuar con estos compuestos[245, 251].

Otros inhibidores son más específicos para algunas isoformas, como el inhibidor VX-702 que inhibe a p38 $\alpha$  y su producción de IL-6 y TNF $\alpha$  de manera dosis-dependiente[252] o PH-797804 que se ha visto que bloquea la producción de TNF $\alpha$  asociada al estímulo con lipopolisacarido (LPS) al inhibir a la p38 $\alpha$ [253].

Recientemente se ha sintetizado un nuevo inhibidor llamado BIRB796 o Dorapaminod que es capaz de inhibir todas las isoformas de p38, ya que BIRB796 se une al sitio de unión de ATP, logrando producir una incompatibilidad estructural que impide la posible unión de ATP a estas quinasas[254, 255]. Sin embargo, este inhibidor parece ser muy hepatotóxico, por lo que su uso a nivel clínico estaría descartado[254, 255].

### 2.1.2.5. Sustratos y función de la p38 $\alpha$ y p38 $\beta$

Gracias al uso de inhibidores específicos de estas proteínas, se ha podido descubrir muchos de sus sustratos. p38 fosforila y aumenta la actividad de muchos factores de transcripción como ATF-1/2[223, 256-258], MEF2C[259], MEF2A[260, 261], Sap-1[262-264], Elk-1[263, 264], NF- $\kappa$ B[265, 266], CHOP/GADD[267], Ets-1[268], el "Myc binding partner MAX"[269], HSF-1[268] y p53[270]. Además, p38 fosforila a otras quinasas que actúan a su vez sobre otros sustratos, como por ejemplo MAPKAP2 y MAPKAP3 que tras ser activadas por las p38, fosforilan a varios sustratos como CREB [258], ATF1[258], SRF[271], HSP27[272], tirosina hidrolasa[273] o la MAPKAP5 que fosforila a MNK[274, 275] y MSK1[276-278]. p38 $\alpha$  también fosforila a la proteína Tau in vitro, sugiriéndose que el estrés celular podría producir la hiper-fosforilación de Tau y desencadena patologías asociadas a Tau[279].

En cuanto a las funciones de p38 $\alpha$ , se sabe que juega un papel decisivo en el mantenimiento de la gestación, ya que está implicada en la vascularización de la placenta[280]. Así, los KO de p38 $\alpha$  no son viables y mueren en etapas embrionarias[280-282]. Por su parte, los KO de p38 $\beta$  son viables y llegan a adultos[283]. Además se demostró que estos animales KO no presentan fenotipo metabólico[283].

En macrófagos, p38 media la síntesis y la estabilidad del ARNm de IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$ [284, 285]. También media la producción de IL6 en fibroblastos y de IL-8 en monocitos y polimorfonucleares[284-286]. Además, se ha visto que controla la supervivencia de cardiomiocitos[287], el ciclo celular en la formación de tumores[288-290], la organización del citoesqueleto[291], la migración celular[291], la diferenciación celular y plasticidad neuronal[292], entre otras cosas.

### 2.2. p38 $\gamma$ y p38 $\delta$

Muy poco se sabe sobre p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ , pues como ya se ha mencionado no existen inhibidores específicos para estas quinasas y solo recientemente se están utilizando animales carentes de dichas proteínas por algunos grupos.

Tanto MKK3 como MKK6 son esenciales para la activación de p38 $\gamma$  en respuesta al estrés celular[225], siendo además MKK6 la mayor responsable de la respuesta a citoquinas como TNF- $\alpha$  por p38 $\gamma$ [225]. También se ha descrito que MKK3 sería la mayor responsable de la activación de p38 $\delta$  por acción de la radiación U.V, shock hiperosmótico, TNF- $\alpha$  y anisomicina[225].

#### 2.2.1. Sustrato y funciones de la p38 $\gamma$

p38 $\gamma$  se une a dominios PDZ de diversas proteínas como  $\alpha$ 1-syntrofina, SAP90/PSD95 y SAP97/hDlg[293-295]. Esta última estaría a cargo de las funciones de p38 $\gamma$  en la organización del citoesqueleto[293, 294]. También fosforila a XCdc25C regulando la progresión del ciclo celular en oocitos de *Xenopus*[296].

Se ha descrito que la pérdida de p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  aumentan la migración celular y la producción de metalo-proteinasas tipo 2[297, 298]. Sin embargo, los niveles de p38 $\gamma$  tanto en ARNm como en proteína están aumentados en casos de cáncer de mama que involucran a la vía de RAS, siendo la inhibición de p38 $\gamma$  la causa de la disminución de actividad oncogénica de RAS[297-299].

Como se ha mencionado, p38 $\gamma$  se expresa ampliamente en músculo y se ha visto que participa en el proceso de diferenciación de mioblasto a miotubos[300]. También bloquea la diferenciación temprana de "stem cells" de músculos esqueléticos en adultos[300]. Además, se ha visto que p38 $\gamma$  es necesaria para la adaptación del músculo al ejercicio, pues es necesaria para la sobrerregulación de PGC-1 $\alpha$  y PPAR $\gamma$  en la angiogénesis y biogénesis mitocondrial[300-303].

Recientemente se ha descrito que p38 $\delta$  y p38 $\gamma$  participan en la regulación de citoquinas, ya que los macrófagos de animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  estimulados con LPS, producen menos TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 y aumenta la producción de IL-12 e IFN- $\beta$  debido a un defecto en la señalización de TPL2/ERK1/2[304]. También datos de nuestro laboratorio indican que estos animales KO p38 $\gamma/\delta$  son más resistentes al shock séptico inducido por LPS, pues presentaban menores niveles de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  después del estímulo. Esto

podría explicarse, ya que la expresión de estas proteínas es necesaria para la elongación del TNF $\alpha$  naciente en macrófagos[242].

### 2.2.2. Sustrato y funciones de la p38 $\delta$

Se ha descrito que Tau, proteína que se encuentra fosforilada en pacientes con alzhéimer[305] es fosforilada por p38 $\delta$ [306, 307], aunque también está descrito que p38 $\gamma$  tendría esta función sobre la proteína Tau[307]. Asimismo, p38 $\delta$  también fosforila y activa a la quinasa del factor de elongación eucariótico 2 (eEF2)[308].

Por otro lado, la inhibición de p38 $\delta$  impide la liberación de IL-13 que está implicada en el desarrollo de la enfermedad obstructiva crónica del pulmón[309]. También participaría en el desarrollo del distrés respiratorio agudo, pues se ha visto que la inhibición de p38 $\delta$  en las células mieloides del ratón resulta en una menor infiltración de neutrófilos tras el proceso inflamatorio agudo[243].

También se ha descrito que todas las isoformas de p38 tienen aumentada su expresión en la psoriasis, por lo que se presume tendrían un papel en el desarrollo inflamatorio de esta enfermedad [310-312], de hecho p38 $\delta$  se ha visto involucrada en la diferenciación y apoptosis de queratinocitos de una forma dependiente de PKC $\delta$  en estudios relacionados a esta enfermedad[310].

Además p38 $\delta$  está implicada en el metabolismo, pues fosforila a la proteína quinasa D1 (PKD1) que se ha demostrado que controla la exocitosis de insulina en las células beta pancreáticas[313]. Así, ratones carentes de p38 $\delta$  mejoran la tolerancia a la glucosa, el estrés oxidativo en las células beta y la liberación de insulina, gracias a que p38 $\delta$  al fosforilar a PKD1 inhibe la liberación de la insulina[308, 313, 314].

Estas proteínas también están relacionadas con cáncer, pues se ha visto que p38 $\delta$  promueve el desarrollo del cáncer de células escamosas a través de la regulación de la proliferación e invasión de carcinomas de piel[315].





# Objetivos

---



Los objetivos de la presente tesis son:

1. Identificar el papel de las p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  en el desarrollo de la obesidad
  - 1.1 Definir el papel de estas quinasas en el control del gasto energético y el metabolismo.
  - 1.2 Definir el papel de estas quinasas en la expresión de hormonas claves para el metabolismo.
  
2. Analizar el papel de p38 $\gamma/\delta$  en el desarrollo de la diabetes asociada a obesidad.
  - 2.1 Caracterizar el papel de estas quinasas en el desarrollo de la resistencia a la insulina
  - 2.2 Estudiar el papel de estas quinasas en el desarrollo de la intolerancia a la glucosa.
  - 2.3 Determinar el papel de estas quinasas en el desarrollo de la dislipidemia.
  - 2.4 Identificar si estas quinasas controlan la inflamación asociada a la obesidad.
  
3. Estudiar el papel de las p38 $\gamma/\delta$  en el desarrollo de la esteatosis hepática
  - 3.1 Analizar el papel de estas quinasas en la inflamación asociada a la esteatosis hepática.



# **Materiales y métodos**

---

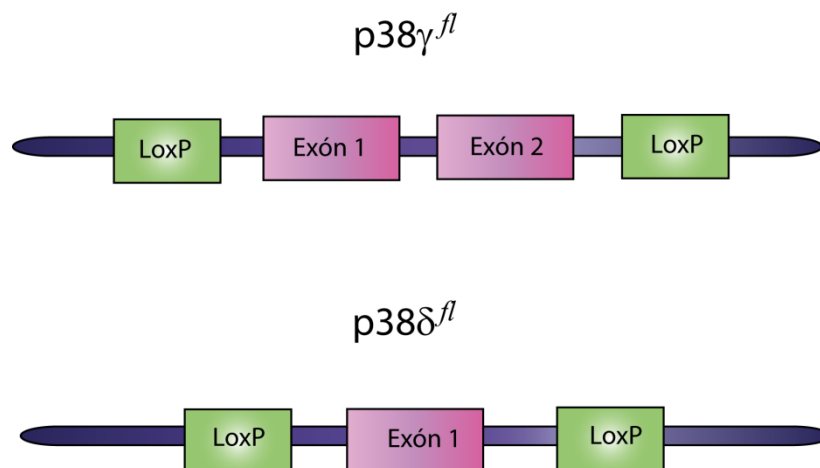


### 1. Modelos murinos

Todos los procedimientos realizados en ratones durante el transcurso de esta tesis doctoral fueron aprobados por el comité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), el comité de Bioética del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) y el comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela siguiendo las directrices de la Comunidad Europea 86/609/EEC y las recomendaciones 2007/526/EC respecto al uso y protección de animales para usos experimentales y otros propósitos científicos, promulgado bajo la ley española 1201/2005.

Los animales fueron estabulados bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y supervisados por personal veterinario de las instalaciones del CNIC, Centro Nacional de Biotecnología (CNB) y Universidad de Santiago de Compostela, respectivamente.

Todos los ratones utilizados en esta tesis tenían fondo C57/BL6J. Los animales KO totales para  $p38\gamma$ ,  $p38\delta$  y  $p38\gamma/\delta$ [293] fueron cedidos por la Dra. Ana Cuenda del CNB, mientras que los ratones condicionales flanqueados con sitios flox en los alelos  $p38\gamma$ ,  $p38\delta$  (ratones  $p38\gamma^{fl}$ ,  $p38\delta^{fl}$ ) fueron cedidos por el Dr. Erwin Wagner del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Asimismo, los ratones Cre (B6.129-Lyzs<sup>tm1(cre)</sup>lfo/J) fueron obtenidos de los laboratorios Jackson.

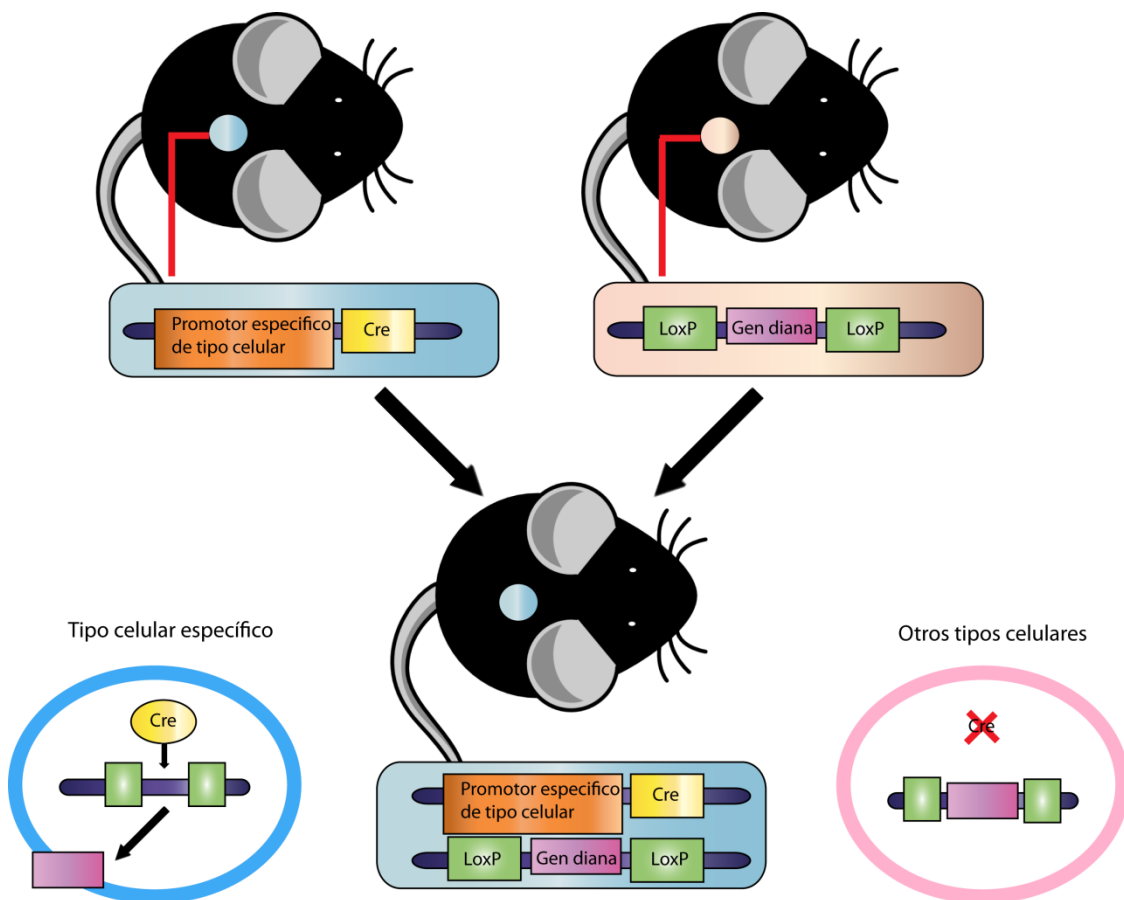


**Fig. 9: Esquema de construcción de animales flox.**

Para generar ratones que no tuvieran las distintas isoformas de p38 en la línea mieloide, se utilizó el sistema cre-lox descubierto en el bacteriófago P1 que se basa en la propiedad de la enzima cre en recombinar con sitios LoxP [316, 317]. El transgén que contiene la cre lo hace bajo un promotor de un tejido específico, en este caso el

promotor *lyzs*, el cual se expresa en la línea mieloide, incluyendo monocitos, macrófagos maduros y granulocitos. Así, los ratones condicionales que poseían secuencias *LoxP* en los exones de los genes *p38 $\gamma$ / $\delta$*  (ratones *p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>f1</sup>*) se cruzaron con la línea transgénica *Lyzs-cre* (B6.129-*Lyzs<sup>tm1</sup>(cre)<sup>lfo</sup>/J*) generando los animales *p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lyz-KO</sup>* (Fig. 10), los cuales carecían de *p38 $\gamma$ / $\delta$*  en la línea mieloide. Los animales control fueron *Lyz-WT*. Todos los animales tuvieron un tamaño y comportamiento normal, sin problemas de reproducción.

En esta tesis solo se utilizaron ratones macho en los experimentos con dieta.



**Fig. 10:** Esquema de generación de animales condicionales.

### 1.1 Modelo de diabetes asociada a obesidad

La diabetes es una enfermedad asociada a la obesidad, con lo que un modelo para su estudio es el uso de dietas ricas en grasas que producen un aumento de peso, incrementan el acúmulo de lípidos en el tejido adiposo, músculo e hígado y llevan al desarrollo de la resistencia a la insulina en el ratón.



En los experimentos presentados en esta tesis se utilizó una dieta rica en grasa (HFD; Research diets®; D12492) de la cual el 60% de sus calorías provienen de la grasa [318]. La dieta se comenzó cuando los ratones macho tenían 8 semanas de edad y se mantuvo 20 semanas con una alimentación *ad-libidum*.

### 1.2 Modelo de esteatosis hepática

Como modelo de esteatosis hepática, en esta tesis se utilizó una dieta deficiente en metionina y colina (MCD), modelo ampliamente utilizado en ratones para mimetizar la esteatosis hepática humana. Esta dieta, administrada durante cuatro semanas, induce un alto grado de esteatosis, inflamación y fibrosis. El mecanismo se debe a que la deficiencia en los aminoácidos esenciales metionina y colina produce un déficit en la síntesis de fosfatidilcolina que desencadena una ineficacia en exportar partículas VLDL o lipoproteínas de muy baja densidad del hígado. Las VLDL son macromoléculas sintetizadas en el hígado encargadas del transporte extrahepático de triglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos, por lo que si no pueden ser exportadas desencadenan la acumulación de lípidos en el hígado. Este es, por tanto, un buen modelo para estudiar la esteatosis hepática fuera del contexto de la obesidad[319].

Al igual que en el caso anterior, la dieta MCD (Research diets®; A02082002B) se inició a las 8 semanas de vida en ratones macho de distintos genotipos y se mantuvo durante 3 o 4 semanas.

### 1.3 Inhibidores BIRB796 y SB203580 *in vivo* con dieta MCD

Para determinar el efecto que la inhibición de las p38MAPKs tiene sobre la esteatosis hepática, se utilizaron los inhibidores de p38 MAPK, BIRB 796 (Selleckbio®) y SB203580 (Selleckbio®). Estos fueron resuspendidos en DMSO a una concentración de 50 mg/ml para posteriormente ser diluidos en tampón fosfato salino (PBS) hasta 5mg/kg/día en el momento de inyectarse en el animal.

Se hicieron dos grupos de animales (10 animales macho de 8 semanas por grupo) que fueron tratados de la siguiente manera:

- a) MCD sin inhibidores (DMSO)
- b) MCD con BIRB 796 5 mg/kg/día

Todos los animales fueron inyectados de manera intraperitoneal (i.p.) diariamente durante las 3 semanas que duró la dieta MCD.

## 2. Pruebas metabólicas *in vivo*

### 2.1 Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT)

Esta prueba permite determinar el metabolismo de la glucosa en el animal *in vivo*. El ensayo se realizó en una sala del animalario con buena iluminación y en silencio para no estresar a los ratones, que se ayunaron, pesaron y marcaron la noche anterior. La prueba consistió en la extracción de sangre mediante una pequeña incisión en la parte distal de la cola de los animales, en la que se midió los niveles de glucosa mediante el uso de un glucómetro (Breeze, Bayer®).

Tras medir la glucosa basal a todos los animales, estos fueron inyectados (i.p.) con 1 mg/g de glucosa al 10%, manteniendo un intervalo de tiempo entre cada uno, sincronizándose así el tiempo de extracción de sangre de todos los animales. Tras ello, la medición de glucosa se realizó a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos[212]. Los resultados se expresaron en mg/dl.

### 2.2 Prueba de tolerancia a la insulina (ITT)

Esta prueba tiene por finalidad medir el grado de resistencia a la insulina de los tejidos periféricos y se efectúa siguiendo el mismo protocolo que para la GTT, pero en este caso inyectando 0,75 U/Kg de insulina[212].

A los animales se les retiró la comida 1 hora antes de comenzar la prueba, tras lo cual, se midió la glucosa basal de los mismos. A continuación, se inyectó la insulina a los animales de forma secuencial y espaciada y se tomaron muestras de sangre a distintos tiempos (15, 30, 60, 90 y 120 minutos), en las que se midió los niveles de glucosa usando un glucómetro. Los resultados se expresaron en mg/dl.

Como algunos animales pueden experimentar una bajada considerable de glucosa que podría provocarles la muerte, durante esta prueba siempre se tuvo a mano glucosa al 10%, de manera que cuando se observó que un animal presentaba una glucemia inferior a 40 mg/dl se inyectó glucosa para recuperarlo, momento a partir del cual dicho animal se eliminó del test.

### 2.3 Prueba de Piruvato

La prueba de piruvato se utiliza para analizar la capacidad del hígado para sintetizar glucosa a partir de piruvato, siendo una medida del estado funcional de dicho órgano. Esta prueba se realizó con dos semanas de separación respecto a la GTT y la ITT como mínimo, para que los animales pudieran recuperarse.

A los animales ayunados durante la noche anterior se les midió la glucosa basal y a continuación se les inyectó 1 mg/g de piruvato sódico (Sigma®) al 10% en PBS. Pasados 15, 30, 60, 90 y 120 minutos se extrajo sangre de la cola para medir los niveles de glucosa[212].

### 2.4 Prueba de la liberación de insulina

Para analizar el estado funcional del páncreas frente a un estímulo de glucosa, se realizó la prueba de la liberación de insulina. Los animales ayunados, marcados y pesados la noche anterior se inyectaron con 2 g/kg de glucosa al 20% p/v y se les extrajo sangre mediante punción submaxilar a tiempo 0, 2 y 10 minutos post inyección de glucosa. La sangre extraída se recogió en tubos con EDTA y centrifugó a 16.200 g durante 15 minutos a 4°C. Con cuidado se recogió el plasma, tratando de no coger ningún eritrocito y se congeló a -80°C hasta el momento del análisis mediante Luminex.

### 2.5 Determinación de insulina y citoquinas plasmáticas mediante Luminex

La técnica de Luminex es muy similar a un ELISA y se basa en la tecnología Luminex xMAP technology®, que son microesferas con códigos específicos de color de fluorescencia. Estas microesferas a su vez están recubiertas de anticuerpos específicos para las proteínas a detectar. A través de la lectura de la concentración de estas tinciones, se puede lograr cuantificar de manera precisa la concentración de proteínas en plasma.

Para la determinación de insulina y citoquinas plasmáticas se siguió el protocolo según las especificaciones del fabricante, que se resume brevemente. Tras lavar la placa de 96 pocillos contenida en el kit con 200  $\mu$ l de tampón de lavado durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT), se agregó 25  $\mu$ l del estándar o de las muestras a detectar más 25  $\mu$ l del "assay buffer". A continuación se añadió 25  $\mu$ l de las

microesferas con los anticuerpos específicos a cada pocillo y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente se lavó la placa con el tampón de lavado dos veces, se añadieron 25  $\mu$ l de estreptavidina-ficoeritrina a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a RT. Finalmente, tras lavar la placa con 200  $\mu$ l del tampón de lavado, se añadió 150  $\mu$ l de *Sheath fluid* a cada pocillo, se agitó durante 5 minutos y se procedió a leer la placa en la Luminex 200™ IS.

### 2.6 Cajas Metabólicas y Resonancia magnética nuclear

Estas pruebas fueron realizadas por el Dr. Rubén Nogueiras en la Universidad de Santiago de Compostela con animales alimentados durante 16 semanas con dieta HFD o ND. Una vez que los ratones llegaban al laboratorio del Dr. Nogueiras, se les permitió una semana de aclimatación a las instalaciones antes de comenzar las pruebas.

Para el análisis de la **composición grasa y magra de todo el organismo** se utilizó la resonancia magnética nuclear (Whole Body Composition Analyzer; EchoMRI, Houston, TX).

Para el análisis de la función metabólica se usaron cajas metabólicas (TSE LabMaster, TSE Systems, Germany), permitiendo a los animales una aclimatación de 48 horas para posteriormente ser monitorizados durante otras 48 horas. El **Cociente respiratorio (RQ)** se calculó dividiendo el  $v\text{CO}_2$  producido por el  $v\text{O}_2$  consumido, donde  $v$  es volumen. El **gasto energético** fue calculado desde la medición del consumo  $\text{O}_2$  y la producción de  $\text{CO}_2$  con un software de análisis previsto con un sistema calorimétrico. La **actividad locomotora** se cuantificó con un sistema de detección de haz de luz con sensores infrarrojos que detectan tanto los movimientos horizontales como verticales.

Los animales en todo momento continuaron con la dieta específica mientras estuvieron en las cajas metabólicas.

### 2.7 Hematología

La hematología fue realizada por el Servicio de Fisiología Vascular del CNIC. 100  $\mu$ l de sangre submaxilar recogida en tubos con EDTA fueron entregados a esta unidad y analizados mediante el equipo PENTRA 80 de Horiba.

### 3. Sacrificios

Los animales en dietas ricas en grasa se sacrificaron bajo tres modalidades:

- a) Ayuno de 16 horas
- b) Ayuno de 16 horas más un estímulo de 10 minutos con insulina (1,5 mU/g) inyectada i.p.
- c) Ayuno de 16 horas más una realimentación de 2 horas con la dieta correspondiente.

Por otro lado, los animales alimentados con MCD se sacrificaron tras un ayuno de 16 horas, sin estímulos posteriores.

El sacrificio se realizó mediante el uso de una cámara de CO<sub>2</sub> y posterior dislocamiento cervical. Antes de ser sacrificados, se obtuvo sangre de la mejilla de todos los animales en tubos EDTA. Se centrifugaron a 16.200 g durante 15 minutos a 4°C y el plasma, almacenado a -80°C hasta su análisis. Una vez sacrificados se recogió tejido adiposo blanco epididimal (para análisis del ARN, lisado e histología), hígado (para análisis del ARN, lisado, histología y congelación con solución crioprotectora O.C.T), cuádriceps (para análisis del ARN, lisado e histología), páncreas (histología), tejido adiposo marrón (para análisis del ARN, lisado e histología) y corazón (histología), que fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido o fijados con formalina al 10%, según correspondiera.

### 4. Pruebas metabólicas en tejidos y muestras

#### 4.1 Determinación de la peroxidación lipídica por TBARS

El método de cuantificación de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) es un método bien establecido para medir la peroxidación lipídica. Consiste en cuantificar el principal compuesto de oxidación de los fosfolípidos, el malondialdehído (MDA), el cual puede ser detectado y cuantificado al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) [320]. En esta tesis se utilizó el kit comercial "TBARS Assay KIT" (Cayman©) siguiendo el protocolo descrito a continuación.

Se pesaron aproximadamente 25 mg de hígado congelado a -80°C y se pusieron en un microtubo con 1,5 ml de tampón de lisis citoplasmático (Tris-HCl 25 mM pH 7,5; NaCl 10 mM; EDTA 1 mM; MgCl<sub>2</sub> 100 mM; NP40 1%; PMSF 0,1 mM, Aprotinina 10 µg/ml,

Leupectina 5 µg/ml). Tras ello, las muestras se sonicaron tres veces con 15 ciclos a velocidad media. Entre cada sonicación, las muestras se dejaron en hielo, para evitar la degradación de las mismas por el aumento de la temperatura. Una vez sonicadas, las muestras se centrifugaron (1.600g, 10 minutos, 4°C) y los sobrenadantes se congelaron hasta su uso.

Para el ensayo, se cogieron 10 µl de este sonicado y se agregó 10 µl de solución TBA-SDS (Cayman®). Tras agitarse, se agregaron 400 µl de una mezcla de reactivos del kit (31,9 mg TBA; 9,03 ml ácido acético 7,4%; 3 ml NaOH 1x) y se hirvió (100°C) en un termo-bloque durante 1 hora. Tras ello los microtubos se enfriaron en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron (1.600g, 10 minutos, 4°C). Las muestras, estables durante 30 minutos a temperatura ambiente, se alicuotaron en 100 µl en una placa de 96 pocillos para fluorescencia (Microliter®) y se detectó la fluorescencia en un fluorímetro a 544 nm de excitación y 590 nm de emisión.

El análisis de las muestras se realizó mediante la extrapolación de una curva patrón de MDA de concentraciones conocidas expresadas en µM.

### 4.2 Determinación del peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

En la obesidad el exceso de acúmulo de lípidos en el hepatocito lleva a un mal funcionamiento de las mitocondrias que induce la oxidación de las grasas por las vías microsomal y del peroxisoma, las cuales aumentan significativamente la cantidad de especies reactivas de oxígeno presentes en el organismo[132]. Una de las principales especies reactivas de oxígeno es el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) motivo por el cual decidimos medir la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los hígados de animales con esteatosis hepática mediante el kit comercial Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen®).

Para ello, se pesaron aproximadamente 25 mg de hígado congelado a -80°C que se lisaron por sonicación en 1,5 ml de tampón de lisis citoplasmático descrito en el punto anterior. A continuación, se centrifugó (1.600 g, 10 minutos, 4°C). A 10 µl del sobrenadante se agregaron 40 µl de de tampón de reacción 1x del kit más 50 µl de la mezcla de reacción y se incubó 30 minutos protegido de la luz. La fluorescencia se midió en un fluorímetro a una longitud de onda de excitación de 544 nm y emisión de 590 nm. Los resultados se extrapolaron mediante una curva patrón de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Invitrogen®) y se expresan en µM.

### 4.3 Determinación de cuerpos cetónicos

La determinación de cuerpos cetónicos se realiza para el diagnóstico de la diabetes, al aumentar en sangre este compuesto, debido al incremento de la lipólisis que ocurre cuando falla el metabolismo de la glucosa.

En esta tesis se midió la cantidad de cuerpos cetónicos totales, mediante Kits enzimáticos (WAKO®), siguiendo el protocolo que se explica a continuación. Se añadieron 135  $\mu\text{l}$  del reactivo que contiene  $\beta$ -tionicotinamida adenina dinucleótido a 2  $\mu\text{l}$  de plasma y se incubó durante 5 min a 37°C. Posteriormente, se agregaron 45  $\mu\text{l}$  del reactivo que contiene 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa y nicotinamida adenina dinucleótido, tras lo cual, se comenzó a leer las absorbancias emitidas a 405 nm hasta el minuto 10.

Los valores de las muestras se calcularon mediante la extrapolación de una curva patrón de cuerpos cetónicos (WAKO®).

### 4.4 Determinación de Glucógeno

El exceso de glucosa en el organismo es almacenado como glucógeno, el cual es un polisacárido de almacenamiento en músculo e hígado. En el músculo, el glucógeno cumple una función de reserva energética propia., En el hígado, es una reserva para el mantenimiento de los niveles de glucosa en todo el organismo. En enfermedades metabólicas como la diabetes, debido a la pérdida de regulación de la homeostasis de glucosa en el organismo, las cantidades de glucógeno pueden estar aumentadas o ser casi inexistentes. Para determinar la cantidad de glucógeno del hígado primero se realiza una hidrólisis ácida con HCl para liberar la glucosa del glucógeno y luego se cuantifica la glucosa liberada.

El protocolo fue el siguiente: 10 mg de hígado congelado se homogenizó en 0,5 ml de HCl 2 N. A continuación, la muestra se hirvió durante 2 horas en un termobloque y acabado este periodo de tiempo, la reacción se paró neutralizando el ácido con 0,5 ml de NaOH 2 N[321].

Para cuantificar la cantidad de glucosa se utilizó el Glucose (HK) Assay Kit (Sigma®). A 10  $\mu\text{l}$  de muestra ya hidrolizada se les agregó 190  $\mu\text{l}$  del reactivo del kit que contiene el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), ATP, hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Esta mezcla se incubó 15 minutos a RT. Finalmente, se leyó la absorbancia en una placa de U.V a 340 nm en un espectrofotómetro y los valores fueron expresados en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### 4.5 Determinación de Aspartatoaminotransferasa (AST) y Alaninoaminotransferasa (ALT)

Las amino-transferasas se encuentran en el plasma y provienen de diversos órganos como corazón, hígado y músculo. Suelen aumentar sus niveles al presentarse patologías cardíacas y hepáticas. Esto es debido a que los hepatocitos o miocitos se rompen tras su muerte dejando que estas enzimas se liberen y aumenten en la sangre. Al trabajar en modelos de obesidad y esteatosis, la medición de las amino-transferasas en plasma de nuestros animales es una aproximación del grado de daño tisular del hígado, pues está descrito que aumentan en cirrosis, hepatitis, colestasis y diversas patologías hepáticas[322, 323].

La medición de estas enzimas se hizo mediante una cinética enzimática utilizando el kit Aspartatoaminotransferasa (AST) y Alaninoaminotransferasa (ALT) (Biosystems®). Se diluyeron 8 µl de plasma en 72 µl de agua. De esta dilución se cogieron 15 µl, a los que se añadió 160 µl del reactivo y se midió la absorbancia cada 30 segundos a 340 nm durante 10 minutos en una placa de 96 pocillos para U.V.

Mediante la fórmula:  $(\Delta Abs = Abs_{\text{inicio}} - Abs_{\text{final}}) \times 10 \text{ min} \times \text{factor de dilución} \times \epsilon$  se obtuvieron las actividades en unidades litro (U/L) de nuestras enzimas, en donde  $\epsilon$  es 1.746.

### 4.6 Extracción de lípidos de hígado

Para extraer los lípidos del hígado se pesaron 25 mg del hígado previamente congelado a -80°C, sin permitir que el tejido se descongelara para evitar la degradación de los lípidos. El trozo de hígado se colocó en un microtubo de 2 ml y se agregó 500 µl de una solución cloroformo-metanol (1:8). El hígado se homogenizó bien (IKA Ultra-Turrax T10 Basic) y se agregaron otros 800 µl de cloroformo incubándose durante 4 horas en agitación (22°C, 50 g). Se añadió 200 µl de ácido sulfúrico 1 M y se mezcló con un agitador tipo vortex. Posteriormente se centrifugó (95 g, 10 minutos, RT). Tras la centrifugación se formaron dos fases siendo la lipídica la inferior, la cual se extrajo y depositó en un nuevo microtubo para ser almacenada a 4°C y analizarse el mismo día.



### 4.7 Cuantificación de lípidos

La cuantificación de lípidos se realizó con el Serum Trygliceride Assay kit (Sigma©) según las especificaciones del fabricante. Para ello, se agregaron 10 µl de plasma o del extracto lipídico de hígado en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se añadió una mezcla de los dos reactivos que posee el Kit y tras 15 minutos de incubación a RT se midió la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro. Se cuantificó la cantidad de triglicéridos de la muestra mediante extrapolación de una recta patrón de un estándar de glicerol y los valores se expresaron como µg/gr de tejido.

### 4.8 Cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (FPLC)

Para analizar las fracciones de lípidos presentes en el plasma de animales en HFD, se utilizó 400 µl de una mezcla de los plasmas obtenidos mediante punción submaxilar de distintos animales. Estas muestras fueron mantenidas a 4°C y analizadas en menos de 24 horas por el Dr. Diego Gómez-Coronado del Servicio de Bioquímica – Investigación del Hospital Ramón y Cajal, Madrid, mediante la técnica de FPLC, obteniendo así las distintas fracciones de lipoproteínas: VLDL, LDL y HDL.

El equipo de FPLC utilizado para analizar las muestras fue Liquid Chromatography Controller LCC-500; Pump P-500; Single Path UV Monitor (optional); Motor Valve MV-7 Superose 6 HR10/30 FPLC column (Pharmacia code # 17-0537-01) Fraction Collector FRAC-100 según el protocolo descrito a continuación:

Antes de comenzar el ensayo, al equipo se le hizo un lavado con 100 ml del tampón FPLC (NaCl 0,15 M, Tris-HCL 0,01 M, EDTA 2 mM, NaN<sub>3</sub> 0,02 %, pH 7,4) previamente desgasificado por ultrasonidos, a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min. A continuación, se colocaron 27 microtubos en el colector de fracciones y se agregó la muestra en el receptor de carga. Las primeras 15 fracciones obtenidas del colector, correspondientes al volumen vacío de la columna, se descartaron (0,5 ml cada una) y se recogió desde la fracción 16 a la 28. Después de que la última fracción fue recogida, se añadió 26 ml de tampón FPLC para lavar la columna. Los valores están expresados en µg/µl.

### 5. Análisis de cantidad de proteínas por Western blot

#### 5.1 Lisis de tejidos

Los tejidos previamente congelados y mantenidos a  $-80^{\circ}\text{C}$ , fueron homogenizados (IKA Ultra-Turrax T10 Basic) en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Triton X-100 1%; EDTA 1 mM pH 8; EGTA 1 mM; NaF 50 mM;  $\beta$ -glicerofosfato-Na 1 mM; Pirofosfato sódico 5 mM; Ortovanadato-Na 1 mM; Sacarosa 0,27 M; PMSF 0,1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM, Aprotinina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Leupeptina 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). El lisado se centrifugó (16.200 g, 30 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ) y el sobrenadante se utilizó para western blot.

#### 5.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

El sobrenadante obtenido de la lisis de tejidos fue cuantificado mediante la técnica de Bradford. Esta técnica es sensible, simple y rápida[324] y se basa en la utilización del reactivo de Commasie blue G-250 que cambia de color en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas: azul y rojo anaranjado. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína al interactuar con aminoácidos básicos y aromáticos. La unión del colorante con las proteínas para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre, provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm.

Para la cuantificación, se pusieron 2  $\mu\text{l}$  de muestra o de albumina de concentración conocida, para crear una curva patrón, por duplicado en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Inmediatamente se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de Comasie blue (Thermo-scientific©) y tras 5 minutos a RT, se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.

#### 5.3 Electroforesis PAGE-SDS, transferencia e incubación con anticuerpos

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) o PAGE-SDS permite separar las muestras por peso molecular, ya que el SDS al interactuar con las proteínas enmascara la carga total de las mismas, quedando

cargadas de forma negativa y, por lo tanto, la separación solo ocurre como resultado del tamizado molecular que produce el gel[325].

Las muestras cuantificadas fueron desnaturalizadas en tampón de muestra 5x (Tris 250 mM pH 6,8; SDS 10%; glicerol 30%; azul de bromofenol 0,01%;  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) y hervidas a 100°C durante 3 minutos. Tras ello, se centrifugaron (9.560 g, 3 minutos, RT) y se cargaron 30-50  $\mu$ g de muestra en un gel de poliacrilamida del 10 o 12%. Los geles se corrieron a 100 V constantes durante 70 min en tampón de electroforesis 1x (tampón 10x: Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%) y posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Biorad®) a 100 mA constantes en tampón de transferencia 1x (tampón 10x: Trisbase 25 mM, glicina 192 mM; al tampón 1x se agregó metanol 10%). Las membranas se bloquearon en leche 5% en tampón tris salino con tween (TBS-T, Tris-HCL 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; Tween-20 0,2%) durante 30 minutos y se incubaron con un anticuerpo primario toda la noche (Tabla 2). Tras ello, las membranas se lavaron tres veces en TBS-T y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (enzima *horseradish peroxidase*, dilución 1:5000) durante 40 minutos, tras lo cual, las membranas se lavaron seis veces en TBS-T. Las bandas inmunoreactivas se detectaron utilizando el reactivo quimioluminiscente ECL (GE Healthcare Life Sciences®), el cual es catalizado por la HRP, emitiendo una señal de luz de baja intensidad a 428 nm. Dicha señal fue captada en una película de rayos X (Konica®) y posteriormente revelada.

Anticuerpos	Dilución	Fabricante	Anticuerpos	Dilución	Fabricante
AKT	1:1000	Cell signaling®	SOCS3	1:1000	Cell signaling®
pAKT 308	1:1000	Cell signaling®	STAT3	1:1000	Cell signaling®
pAKT 473	1:1000	Cell signaling®	pSTAT 3	1:1000	Cell signaling®
GAPDH	1:1000	Santa Cruz®	pAMPK	1:1000	Cell signaling®
p38 $\alpha$	1:1000	Santa Cruz®	Vinculina	1:1000	Sigma-Aldrich ®
SREBP 1-C	1:1000	Santa Cruz®	GS	1:1000	Cell signaling ®
pS6	1:1000	Cell signaling®	pGS	1:1000	Cell signaling®
p38 $\gamma$	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	Laboratorio [242]	p38 $\delta$	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	Laboratorio [242]

**Tabla 2: Anticuerpos utilizados en la técnica de Western blot.**

### 5.4 Inmunoprecipitación

Para aumentar tanto la especificidad como la intensidad de detección de algunas proteínas por western blot, éstas se inmunoprecipitaron. Para ello, 20  $\mu$ l de la proteína G se incubó con 2  $\mu$ g del anticuerpo correspondiente (30 minutos a 4°C en

noria). El exceso de anticuerpo se eliminó lavando la proteína-G dos veces con PBS y centrifugando a 9.560 g, 1 minuto, RT.

A continuación, se inmunoprecipitó la proteína deseada incubando el lisado (1-2 mg) con la proteína-G-anticuerpo durante toda la noche (4°C, en noria). Al día siguiente, las muestras se centrifugaron (9.560 g, 1 minuto, RT) y se lavaron dos veces con tampón de lisis con 0,5 M de NaCl y otras dos veces con solo tampón de lisis. Finalmente, se agregó el tampón de carga 5x y se hirvieron a 100°C, 3 minutos. De esta manera las muestras estuvieron listas para cargar y correr en electroforesis SDS-PAGE.

En este trabajo se ha inmunoprecipitado con anticuerpos producidos en nuestro laboratorio, Anti-SAPK3 y Anti-SAPK4[242] a 2 µg en 10 µl de proteína-G.

## 6. Análisis de ARN

### 6.1 Extracción de ARN

Utilizando el sistema RNeasy Plus Mini (Quiagen©) se extrajo el ARN de aproximadamente 25 mg de tejido, el cual se homogenizó en tampón RLT o Quiazol según las especificaciones del productor. Una vez obtenido el ARN se cuantificó su concentración y analizó su pureza con el Nanodrop.

### 6.2 Retrotranscripción

El ADNc fue sintetizado a partir de 1 o 2 µg de ARN, mediante retrotranscripción con la enzima MultiScribe Reverse transcriptase (50 U/µl), dNTP 100 mM, random primers y buffer 10X del kit High-Capacity cADN Transcription (Applied Biosystems©) que se utilizaron según las especificaciones del fabricante. Las condiciones de la reacción fueron: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C.

### 6.3 PCR cuantitativa

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa se realizaron mediante la sonda fluorescentes Fast SYBR Green Master Mix (Applied biosystems©) en un volumen final de 8 µl en el equipo AB-7900 Fast 384. Las condiciones de

amplificación fueron las siguientes: 95°C durante 20 segundos; 40 ciclos de 95°C durante 1 segundo seguidos de 60°C durante 20 segundos. Al final de este paso se agregó un ciclo de elongación final de 95°C durante 15 segundos seguidos de 60°C durante 15 segundos y 95°C durante 15 segundos. *Gapdh* fue usado como control de cuantificación. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la tabla 3.

Gen	Especie	Forward 5'	Reverse 3'
<i>Srebp-1c</i>	ratón	GCAGCCACCATCTAGCCTG	CAGCAGTGAGTCTGCCTTGAT
<i>Interleuquina-6</i>	ratón	TAGTCCTTCTACCCCAATTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>TNF-α</i>	ratón	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>Mcp-1</i>	ratón	TAAAAAACCTGGATCGGAACCAA	GCAITAGCTTCAGATTACGGGT
<i>Lipc</i>	ratón	ATGGGAAATCCCCTCCAAATCT	GTGCTGAGGTCTGAGACGA
<i>Acs-2</i>	ratón	AAACACGCTCAGGGAAAATCA	ACCGTAGATGTATCCCCCAGG
<i>Ppar-α</i>	ratón	AGAGCCCCATCTGTCCTCTC	ACTGGTAGTCTGCAAAAACCAAA
<i>Ppar-γ</i>	ratón	TCGCTGATGCACTGCCTATG	GAGAGGTCCACAGAGCTGATT
<i>Scd-1</i>	ratón	TTCTTGCATACACTCTGGTGC	CGGGATTGAATGTTCTTGTCTG
<i>Nadph-2 (Nox2)</i>	ratón	GAAGGGGTTAAACACCTCTGC	ATGCTCTGCTTAAACACAATCCT
<i>Ho-1</i>	ratón	AAGCCGAGAAATGCTGAGTTCA	GCCGTGTAGATATGGTACAAGGA
<i>Receptor de insulina</i>	ratón	ATGGGCTTCGGGAGAGGAT	GGATGTCCATAACCAGGGCAC
<i>F4/80</i>	ratón	CCCCAGTGTCTTACAGAGTG	GTGCCCAGAGTGGATGTCT
<i>Lisozima</i>	ratón	ATGGAATGGCTGGCTACTATGG	ACCAGTATCGGCTATTGATCTGA
<i>Lipc</i>	ratón	ATGGGAAATCCCCTCCAAATCT	GTGCTGAGGTCTGAGACGA
<i>Arginasa-1</i>	ratón	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCTTAGGGACATC
<i>Lipasa endotelial</i>	ratón	ATGCGAAACACGGTTTTCTG	GTAGCTGGTACTCCAGTGGG
<i>Colageno 1α</i>	ratón	GAGCGGAGAGTACTGGATCG	GCTTCTTTTCTTGGGGTTC
<i>Timp-1</i>	ratón	GCAACTCGGACCTGGTCATAA	CGGCCCGTGATGAGAAACT
<i>Cd36</i>	ratón	GAACCACTGCTTCAAAAACCTGG	TGCTGTCTTTGCCACGTCA
<i>Acox1</i>	ratón	CCGCCACCTTCAATCCAGAG	CAAGTCTCGATTCTCGACG
<i>Gapdh</i>	ratón	TGGATTGGACGCATTGGTC	TTTGCACCTGGTACGTGTTGAT
<i>SRI-1</i>	ratón	TCTACACCCGAGACGAACACT	TGGGCCCTTGCCCGATTATG
<i>Pgc-1b</i>	ratón	GCTCTGACGCTCTGAAGGAC	AAGGGCTTGGGCAATCCTC
<i>Adiponectina</i>	ratón	TGTTCTCTTAATCCTGCCCA	CCAACCTGCACAAGTCCCTT
<i>Pepck</i>	ratón	CTGCATAACGGTCTGGACTTC	GCCITCCACGAACCTCCTCAC
<i>Il-12b</i>	ratón	CTGTGCCCTGGTAGCATCTATG	GCAGAGTCTCGCCATTATGATTC
<i>Il-10</i>	ratón	CTTACTGACTGGCATGAGGATCA	GCAGCTCTAGGAGCATGTGG
<i>Mip-2</i>	ratón	CCAACCACCAGGCTACAGG	GCGTCACACTCAAGCTCTG
<i>Gr-1</i>	ratón	GACTTCTGCAACACAACACTACC	ACAGCATTACCAGTGATCTCAGT

**Tabla 3: Genes y secuencias de los oligonucleótidos utilizados.**

Las reacciones positivas de PCR cuantitativa son detectadas por la acumulación de la señal fluorescente. El CT o ciclo umbral se define como el número de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia traspase el umbral. El CT es inversamente proporcional a la cantidad de ADN del gen diana en la muestra.

La expresión relativa fue calculada mediante dos métodos:

- Obtención del  $\Delta\Delta CT$  en el que el incremento de fluorescencia de la muestra en CT se compara con el CT del gen control y luego con el promedio CT del control interno. Finalmente, el resultado se calcula utilizando la ecuación  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ .

- Mediante el uso de una recta estándar a partir de ADNc de concentraciones conocidas. En este caso la medición de la concentración del gen experimental se obtiene al extrapolar los datos de CT con el CT obtenidos en la recta patrón. Este método sirve como control de la eficiencia de nuestros oligonucleótidos.

## 7. Tinciones histológicas

Se utilizaron varias técnicas de tinciones histológicas que permitieron diferenciar en los tejidos las distintas estructuras. Para todas estas técnicas primero se fijaron los tejidos post-mortem en una solución de formalina al 10% durante 48 horas. Tras esto, los tejidos fueron lavados, deshidratados, aclarados e infiltrados en parafina, para luego ser embebidos en bloques que se cortaron en el micrótopo a 8  $\mu$ m de espesor. Estos cortes se dejaron secar durante 24 horas a 37°C y posteriormente se hidrataron siguiendo el siguiente protocolo:

Reactivo	Tiempo
Xilol	2 minutos
Xilol	2 minutos
Xilol	2 minutos
100%Etanol	2 minutos
100%Etanol	2 minutos
95%Etanol	2 minutos
70%Etanol	2 minutos
50%Etanol	2 minutos
Agua	3 minutos

**Tabla 4:** Proceso de hidratación inicial en histología.

Los reactivos fueron obtenidos de distintas casas comerciales: xilol (Merck®), etanol (Sigma®), hematoxilina (Biocare Medical®), eosina (Sigma®), solución de bluing (Thermo scientific®), solución de bouin (Sigma®), reactivo de schiff (Merck®).

Una vez teñidas las muestras, éstas se deshidrataron con el siguiente protocolo:

Reactivo	Tiempo
95%Etanol	1 minuto
95%Etanol	1 minuto
100%Etanol	1 minuto
100%Etanol	1 minuto
Xilol	1 minuto
Xilol	1 minuto
Xilol	1 minuto

**Tabla 5:** Proceso de deshidratación final de muestras en histología.

### 7.1 Hematoxilina/Eosina (H/E)

Esta tinción permite diferenciar distintas estructuras celulares y la morfología del tejido. Consiste en dos tinciones: la hematoxilina que al ser básica tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y lila y la eosina que al ser ácida tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos rosa[326]. Tras hidratar las muestras, siguiendo la tabla 4, se realizó el siguiente protocolo de tinción:

Reactivo	Tiempo
Hematoxilina	45 segundos
Agua	3 minutos
Solución de Bluing	4 sumersiones
Agua	3 minutos
95% Etanol	1 minuto
Eosina	10 segundos

**Tabla 6: Protocolo de tinción con hematoxilina/eosina.**

Tras este protocolo, las preparaciones se deshidrataron como se ha explicado en la tabla 5, se montaron con el medio de montaje Permount (Fisher scientific®) y cubreobjetos y se dejaron secar 1 hora, después de la cual ya estaban listas para ser observadas en el microscopio óptico (Leica DM2500®). Las fotografías fueron tomadas en el microscopio con el programa L.A.S (Leica Application Suite) con aumentos de 10X y 20X. Posteriormente, en algunos casos, se analizaron con el programa ImageJ (NIH, National Institutes of Health).

### 7.2 Técnica de Schiff (Ácido peryódico de Schiff ;P.A.S)

Es una técnica usada comúnmente para identificar polisacáridos como el glucógeno, glucoproteínas y glucolípidos. En ella se utiliza el ácido peryódico y la leucofucsina. Primero, el ácido peryódico, el cual es incoloro, oxida a la muestra dejando grupos aldehídos expuestos que posteriormente reaccionan con el reactivo de Schiff o leucofucsina, produciendo un color rojizo[327]. Tras el proceso de hidratación (tabla 4), se tiñeron siguiendo la tabla 7.

Reactivo	Tiempo
Ácido peryódico	7 minutos
Agua destilada	1 minuto
Reactivo de Schiff	15 minutos
Agua	5 minutos
Hematoxilina	2 segundos
Agua	3 minutos
Solución de Bluing	4 sumersiones
95%Etanol	Lavado rápido

**Tabla 7: Protocolo de tinción técnica P.A.S**

Por último, se deshidrataron las muestras (tabla 5) y se montaron las preparaciones como se ha descrito en el punto anterior.

### 7.3 Tricrómica de Masson

Esta técnica permite diferenciar las fibras de colágeno tipo I y las fibras reticulares del resto de las estructuras y en la que se utilizan además de la hematoxilina férrica otros tres colorantes (que se describen a continuación), quedando los núcleos de un color marrón oscuro, el citoplasma en rojo ladrillo, el tejido conectivo y sustancias mucosas ácidas de color verde y finalmente los eritrocitos de un color anaranjado luminoso.

- a) Hematoxilina de Weigert: se prepara al mezclar en proporción 1:1 la solución A y B.
  - La solución A, es hematoxilina (Sigma©) 1% en Etanol absoluto
  - La solución B, 4 ml de Cloruro férrico (Sigma©) al 30% en agua, 1 ml de ácido clorhídrico fumante 37% (Merck©) y 95 ml de agua destilada.
- b) Azofloxina (Merck©)
- c) Ácido fosfotungstácico-anaranjado G (Merck©)
- d) Verde brillante (Merck©)

El protocolo posterior al proceso de hidratación explicado en la tabla 4 se detalla en la tabla 8.



Reactivo	Tiempo
Solución de Bouin	1 hora 56°C o 16 horas RT en cámara húmeda
Agua	5 minutos
Hematoxilina férrica	2 segundos
Agua	3 minutos
Hematoxilina	2 segundos
Agua	3 minutos
Solución de Bluing	4 sumersiones
Agua	3 minutos
Acido acético 1%	30 segundos
Azofloxina	30 segundos
Ácido acético 1%	30 segundos
Ácido fosfotúngstico-anaranjado G	30 segundos
Ácido acético 1%	30 segundos
Verde brillante SF	15 minutos
Ácido acético 1%	30 segundos

**Tabla 8: Protocolo de tinción de la técnica tricrómica de Masson.**

A continuación, se procedió a deshidratar las muestras (tabla 5) y al montaje de las preparaciones como ya se ha descrito.

### 7.4 Tinción Oil red

La tinción de Oil red es una tinción liposoluble que permite detectar triglicéridos neutros y lípidos en los tejidos. El oil red (Sigma®) se preparó disolviéndolo al 0,7% en propilenglicol y eliminando las impurezas con un papel filtro y se almacenó a 60°C hasta el momento de su uso.

Para esta tinción, se cortaron secciones de hígado congelado en la solución O.C.T (Tissue-Tek®) a 12  $\mu\text{m}$  en el criostato. Las secciones cortadas fueron tratadas como se describe en la tabla 9.

Reactivo	Tiempo
Formalina 10%	10 minutos
Agua	4 minutos
Propilenglicol 100%	5 minutos
Propilenglicol 100%	5 minutos
Oil red	7 minutos
Propilenglicol 85% en agua	3 minutos
Agua	3 minutos
Hematoxilina	1 minutos
Agua	3 minutos
Solución de Bluing	20 sumersiones
Agua	3 minutos

**Tabla 9: Protocolo de la tinción de Oil red.**

Las muestras se montaron con medio acuoso Aquatex (Merck©) antes de ser observadas al microscopio óptico.

### 8. Determinación de la infiltración leucocitaria en hígado por citometría

La citometría de flujo es una técnica de análisis multiparamétrico en la cual las partículas a analizar pasan en forma alineada delante de un haz de láser focalizado, el cual mide parámetros celulares como dispersión de la luz y fluorescencia. Se utilizó esta técnica para conocer el grado de infiltración leucocitaria.

Tras sacrificar a los ratones, se extrajo el hígado en PBS-BSA-EDTA ("Bovine serum albumin" BSA 0,5%; EDTA 5 mM) en hielo. El hígado se disgregó con un cedazo sobre una placa petri, usando un volumen final de 20 ml de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, GIBCO©) suplementado con 10% suero fetal bovino SFB (Sigma©) y el lisado se centrifugó (61 g, 1 minuto, 4°C) para eliminar el estroma. A continuación, el sobrenadante, que contenía los leucocitos, se traspasó a otro nuevo tubo de 50 ml, se centrifugó de nuevo (578 g, 5 minutos, 4°C) y el precipitado se lavó dos veces en 20 ml de PBS centrifugando a 578 g, 5 minutos, 4°C. El precipitado se resuspendió en 10 ml de RPMI 10% SFB a 37°C y se separó en dos tubos cónicos a los que se les añadió 5 ml de ficoll (GE Healthcare life science©) a 37°C.

A continuación, la mezcla se centrifugó sin freno y sin aceleración a 700 g, 20 minutos, 25°C. La solución se separó en dos fases entre las cuales se observó un halo celular que correspondía con la fracción leucocitaria. Se aspiró el halo con sumo cuidado de arriba abajo intentando no estropear la interfase depositándose en un nuevo tubo falcon de 15 ml. Tras ello, se lavó añadiendo PBS-BSA-EDTA y centrifugando (578 g rpm, 5 minutos, 4°C) dos veces.

El precipitado resultante se resuspendió y se procedió a la tinción de epítomos extracelulares como se explica a continuación. Las células se centrifugaron a 578 g, 5 minutos, 4°C, se añadió 30 µl de anticuerpo CD11b (1/250) biotinilado (BD) y se incubó 20 minutos a 4°C. Tras ello, las células se lavaron con 200 µl PBS-BSA-EDTA y centrifugaron a 578 g, 4°C, 5 minutos. Se añadieron a continuación los anticuerpos Gr1, CD11c y F4/80 (tabla 10) a una dilución 1/50 y la estreptavidina (1/100) para el anticuerpo biotinilado y se incubó durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. A continuación, se lavó con 200 µl PBS-BSA-EDTA y centrifugó a 578 g 5 minutos, 4°C. Por último, las células se resuspendieron en 200 µl de PBS-BSA-EDTA y se analizaron en el

Citómetro 3L HTS. Los controles negativos pasaron por todos los procesos de la muestra a excepción de la tinción.

Anticuerpo	Color	Tipo	Casa comercial
CD11c	FITC	Extracelular	BD-Pharmigen
LY6G-LY6C(GR1)	APC	Extracelular	BD-Pharmigen
F4/80	PECY7	Extracelular	eBiosciences
CD11b	Biotinilado	Extracelular	Biologend
Estreptavidina	PERCP	Extracelular	Biologend

**Tabla 10:** Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

## 9. Equipos utilizados

En esta tesis se utilizaron distintos equipos disponibles en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

- Espectrofotómetro de microplaca Benchmark Plus (GE Healthcare life science©).
- Fluorímetro de microplaca IEMS Reader ( Thermo labsystems©)
- Nanodrop (Thermoscientific©)
- Fast real time PCR systems AB-7900 (Applied biosystems©)
- Luminex 200™ IS.
- Citómetro 3L HTS, BD FACS CANTO II (BD Biosciences©)
- Centrifuga Optima L-100 (Beckman©)
- Centrifuga CT 15RE (Himac©)

## 10. Análisis estadístico

Los resultados están expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico fue ejecutado con GraphPad Prism 5 Software. Se realizó la prueba *t*-student para comparar los datos entre grupos, mientras que la ANOVA con post test de Bonferroni se utilizó para comparar entre más de 2 grupos. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor *p* fue menor de 0.05 (\**p*<0,05;\*\**p*<0,01;\*\*\**p*<0,001).



# Resultados

---



# 1. Modelos animales en dietas ricas en grasa (HFD)

## 1.1 Papel de p38 $\gamma$ y p38 $\delta$ en el desarrollo de la diabetes inducida por la obesidad

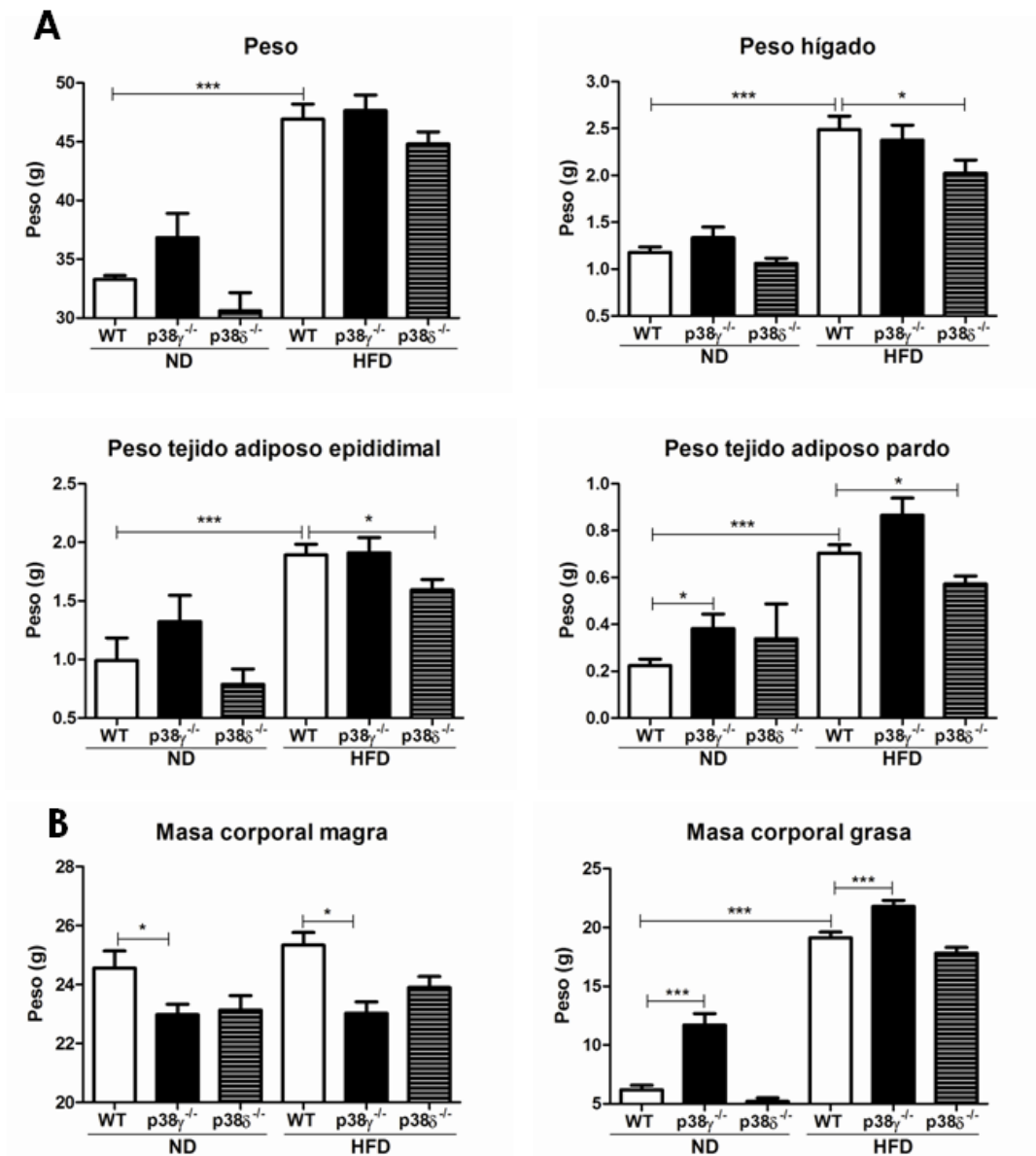
Para estudiar el papel de la p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  en el desarrollo de la obesidad se utilizaron ratones carentes de cada una de estas quinasas en todo el organismo. Estos animales junto con animales control (WT) fueron alimentados durante 20 semanas con dietas hipercalóricas (HFD) o dietas control (ND). Tras el tratamiento con las dietas indicadas, los animales WT en HFD aumentaban de peso de forma significativa. Asimismo, tras esta dieta, no se observaron diferencias significativas en el peso corporal total entre los diferentes genotipos (Fig. 11A). Sin embargo, mediante imagen por resonancia magnética nuclear, observamos que tanto en dietas ND como HFD la masa corporal magra en los animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> era menor que en los WT y poseían mayor cantidad de masa corporal grasa respecto al control (Fig.11B). Además, en el análisis post mortem se observó que los animales carentes de p38 $\delta$  en HFD presentaban una reducción en el peso del hígado y las grasas epididimal y parda en relación con los animales WT en HFD (Fig. 11A). Por lo que a pesar de no presentar diferencias en el peso total podemos decir que la distribución del tejido adiposo de los animales carentes de p38 $\delta$  en el organismo es diferente y quizás influya en el desarrollo de la DM2.

### 1.1.1 La carencia de p38 $\delta$ protege del desarrollo de diabetes inducida por obesidad

Se ha descrito que el exceso de calorías en la dieta induce cambios metabólicos compensatorios para ajustar la homeostasis del organismo. Algunos de esos cambios son la activación e inhibición de las vías de señalización implicadas en los procesos inflamatorios, la señalización de lípidos y la señalización de la insulina[212, 266].

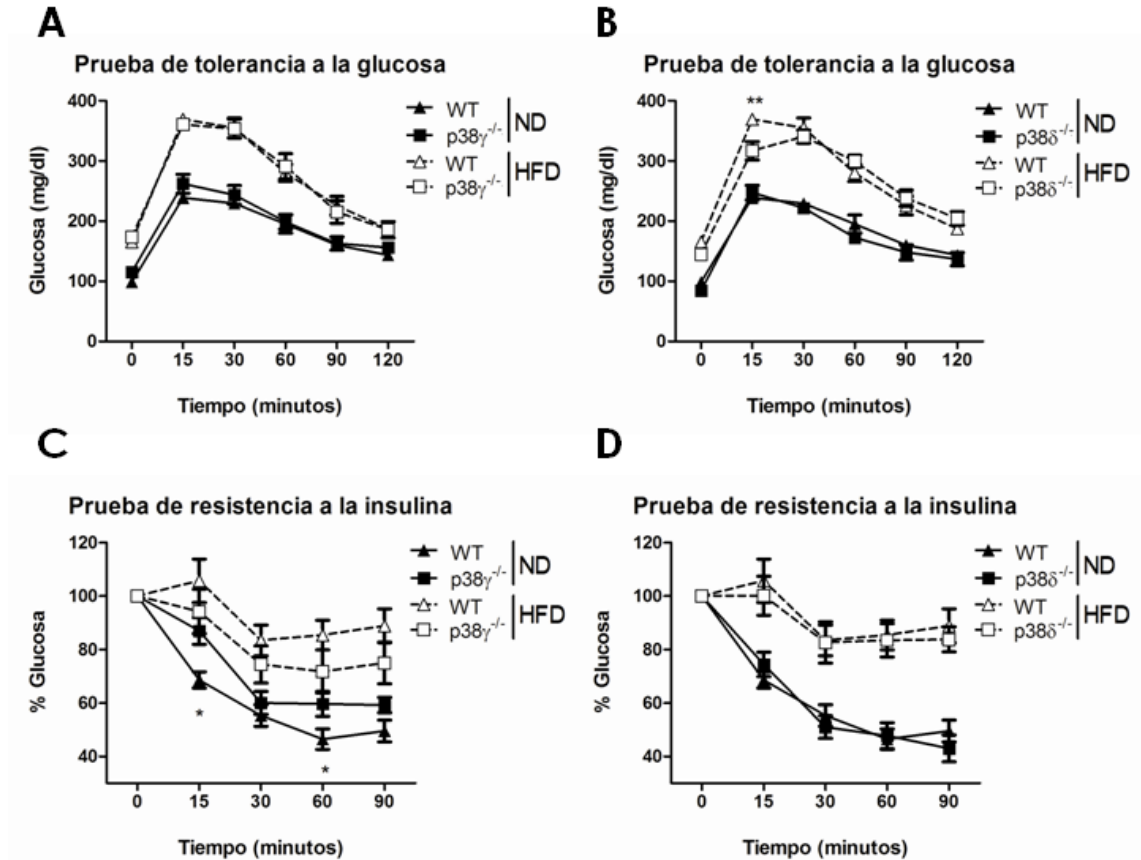
Una de las consecuencias más comunes de la obesidad es el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Para comprobar si la p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  tenían algún efecto en el desarrollo de la diabetes inducida por obesidad, se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT). Como podemos observar en la figura 12A y 12B, en los animales WT alimentados con una dieta control, la glucosa aumentó en los primeros minutos para posteriormente volver a los valores basales, al igual que sucede con los animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> y p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>. En cambio, en los animales WT y p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> alimentados con dietas ricas en

grasa, este aumento fue mayor y mantenido en el tiempo, fenómeno que se conoce como intolerancia a la glucosa. Sin embargo, en los animales  $p38\delta^{-/-}$  los niveles de glucemia no aumentaron al nivel máximo observado en los animales WT o  $p38\gamma^{-/-}$  en HFD. Estos datos nos indican que los animales  $p38\delta^{-/-}$  son más tolerantes a la glucosa tras una dieta HFD que los animales WT, demostrando que la falta de la quinasa  $p38\delta$  puede proteger frente al desarrollo de la DM2.



**Fig.11: Diferencias en la composición corporal entre ratones WT,  $p38\gamma^{-/-}$  y  $p38\delta^{-/-}$ :** Ratones macho  $p38\gamma^{-/-}$ ,  $p38\delta^{-/-}$  y WT se alimentaron con dieta ND o HFD durante 20 semanas. **A.** Determinación del peso de los animales y de sus tejidos post-mortem tras las 20 semanas de dieta. **B.** Análisis de la masa corporal magra y masa corporal grasa mediante resonancia magnética nuclear de los animales. Los valores se representan como la media  $\pm$  error estándar de la media ( $n = 10$ ) ([\*]  $p < 0.05$ , [\*\*\*]  $p < 0.001$ ). Se realizó la comparación entre animales WT en ND y WT en HFD para demostrar la eficacia del modelo.





**Fig.12: Determinación de la tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en ratones p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> y p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> (A y B) y prueba de tolerancia a la glucosa y prueba de resistencia a la insulina respectivamente, en ratones p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> y p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> respecto a ratones WT en ND y HFD. Tras inyectar I.P. glucosa (1 g/kg) o insulina (0.75 U/kg), respectivamente, se determinó la concentración de glucosa a distintos tiempos. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (n = 10). Las diferencias significativas entre WT y p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> o WT y p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> están indicadas ([\*] p < 0.05, [\*\*] p < 0.01).**

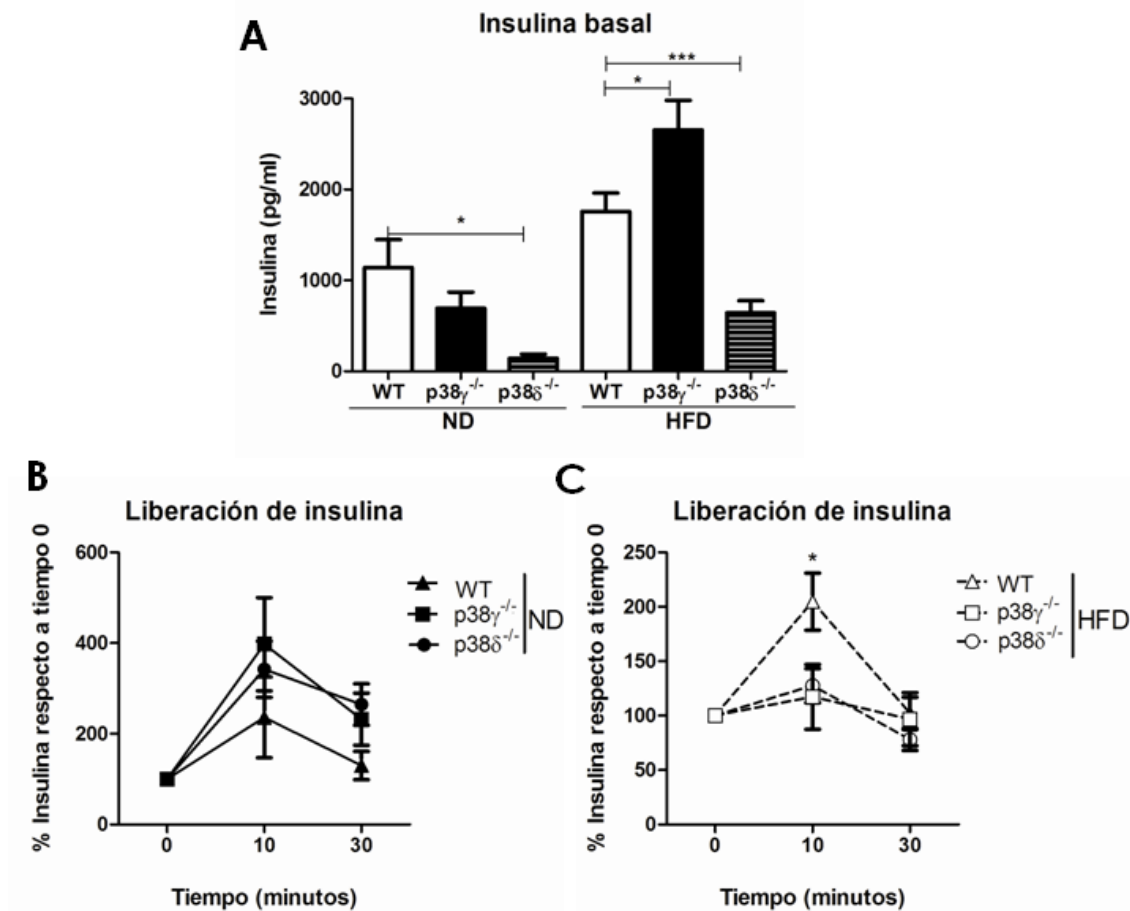
La intolerancia a la glucosa puede ser debida a una resistencia a la insulina en tejidos periféricos o a un problema en la liberación de insulina por parte de las células del páncreas. Para investigar si una mayor sensibilidad a la insulina podría ser la causa de que los animales p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> estuvieran protegidos frente a la intolerancia a la glucosa, realizamos la prueba de resistencia a la insulina (ITT) (Fig. 12C, 12D). Mientras que en los animales con dietas control disminuyeron los niveles plasmáticos de glucosa tras la inyección de insulina, los animales alimentados con dietas ricas en grasa mantuvieron niveles altos de glucemia incluso tras la administración de insulina, indicando que los animales WT, p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> y p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> son resistentes a la insulina tras la dieta HFD. También podemos observar que los animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> son más resistentes a la insulina en ND respecto a los WT.

Según estos resultados, la tolerancia a la glucosa podría deberse a que los animales carentes de p38 $\delta$  están protegidos frente a la hipertrofia pancreática

inducida por la obesidad. De hecho, se ha visto que los animales carentes de p38 $\delta$  presentan una menor apoptosis de células beta pancreáticas cuando son obesos[313]. Por ello, se midieron los niveles basales de insulina sanguínea tras el ayuno. En la figura 13A se puede observar que los animales carentes de p38 $\delta$  presentaron menores niveles de insulina que los animales WT tanto en ND como en HFD. Mientras, los animales carentes de p38 $\gamma$  en HFD tuvieron niveles de insulina basal significativamente más altos que los animales WT.

Para estudiar la funcionalidad pancreática, se midieron los niveles de insulina plasmática tras la administración de glucosa. En los animales alimentados con dieta control se observó que tras la inyección de glucosa, los niveles sanguíneos de insulina aumentaron, no habiendo diferencias entre genotipos (Fig. 13B). Sin embargo, en los animales carentes de p38 $\gamma$  o p38 $\delta$  en HFD observamos una menor liberación de insulina en comparación a los animales WT en la misma dieta (Fig. 13C).

Por consiguiente, podemos concluir que la carencia de p38 $\delta$  protege del desarrollo de intolerancia a la glucosa e hipertrofia pancreática después de HFD, no existiendo dicha protección en los animales carentes en p38 $\gamma$ .



**Fig.13: Determinación de insulina en animales WT, p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> y p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>:** **A.** Los niveles plasmáticos basales de insulina se analizaron en animales WT, p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> y p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> alimentados con ND o HFD. **B y C.** El efecto de la liberación de la insulina inducida por la administración de glucosa I.P. (2 g/kg) se midió cuantificando la concentración de insulina en plasma. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de la media;  $n = 10$ . Las diferencias significativas están indicadas como ([\*]  $p < 0.05$ , [\*\*\*]  $p < 0.001$ ). En C las diferencias entre WT y p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> corresponden a [\*]  $p < 0.01$ , y las diferencias entre WT y p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> corresponden a [\*]  $p < 0.05$ .

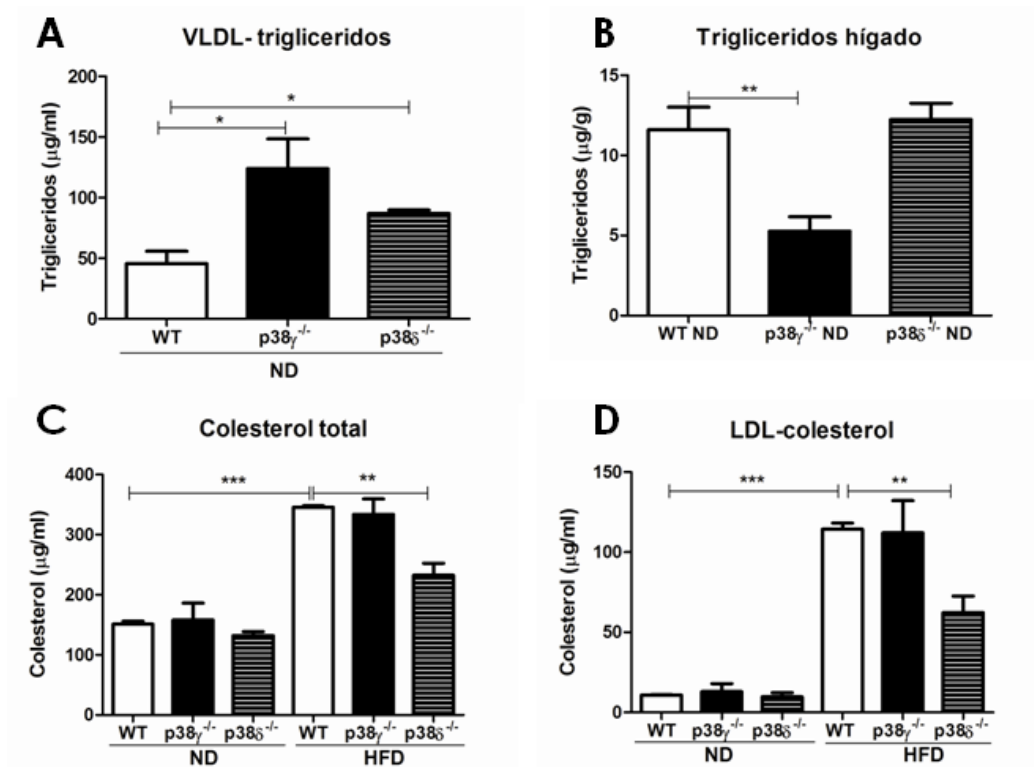
### 1.1.2 La carencia de p38 $\gamma$ y p38 $\delta$ altera el metabolismo de lípidos

Otra de las complicaciones asociadas a la obesidad es la dislipidemia (concentraciones elevadas de lípidos en sangre, como colesterol y triglicéridos). Para analizar los niveles de lípidos plasmáticos, así como su acumulación en forma de partículas HDL, LDL o VLDL se realizó la cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (Fast protein liquid chromatography, FPLC). Nuestros resultados indican que los animales WT en ND tenían niveles más bajos de triglicéridos en la fracción VLDL que los p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> y p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> (Fig. 14A). Las partículas de VLDL son las encargadas de exportar triglicéridos fuera del hígado, por lo que un aumento en la exportación de dichas partículas podría llegar a disminuir la acumulación triglicéridos intrahepáticos. Así, se determinó la cantidad de triglicéridos acumulados en el hígado de estos animales. Se observó que en ND, los animales WT tuvieron niveles similares de triglicéridos respecto a los p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>, pero que los animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> acumularon menos triglicéridos hepáticos que los animales WT (Fig. 14B). Respecto a los niveles de colesterol en sangre, no se observaron diferencias en ND entre los grupos estudiados: WT, p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> y p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>. Tras la alimentación con HFD en los animales WT se produce un aumento de los niveles totales de colesterol, como ya ha sido descrito anteriormente[328]. Este incremento en los niveles de colesterol es menor en los animales p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> (Fig. 14C), no observándose diferencias en los animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>.

Una de las fracciones que contiene colesterol es la LDL y su incremento puede ser el responsable del aumento de colesterol total en sangre, por lo que analizamos la fracción de colesterol contenida en las LDL. Se observó que la fracción LDL-colesterol en dietas ND no presenta diferencias entre los grupos, pero que, sin embargo en HFD los animales p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> tenían significativamente menos colesterol-LDL que los WT (Fig. 14D).

Los cambios en el acúmulo de lípidos en el organismo, pueden ser alterados por cambios de la actividad energética y actividad locomotora, por este motivo se realizaron estudios metabólicos en nuestros animales experimentales. Para ello se utilizaron cajas metabólicas, que permiten cuantificar la función metabólica en los modelos animales. Los parámetros medidos fueron el gasto energético, la actividad

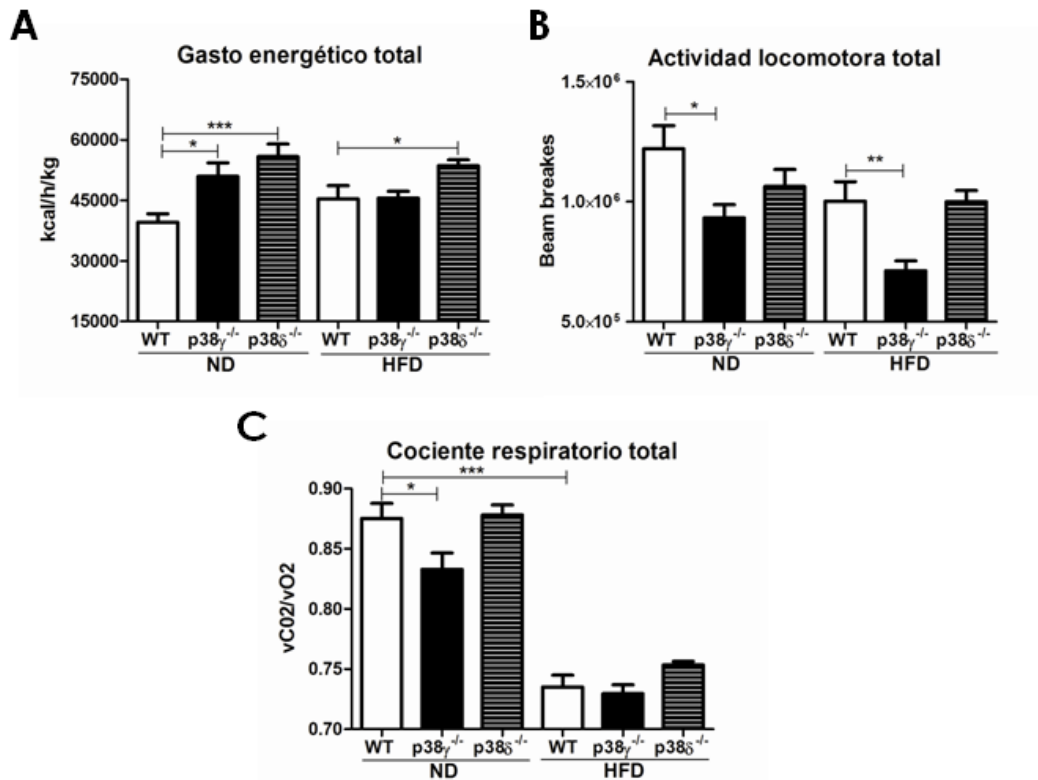
locomotora y el cociente respiratorio. Nuestros datos indican que en ND los animales  $p38\gamma^{-/-}$  y  $p38\delta^{-/-}$  presentaron un mayor gasto energético respecto al WT, pero que, sin embargo, en HFD solo los animales  $p38\delta^{-/-}$  presentaban dicho aumento (Fig. 15A). Este mayor gasto energético podía ser debido a una mayor actividad física, con lo que para comprobarlo medimos la actividad locomotora (Fig. 15B). Sin embargo, al contrario de lo esperado, la actividad locomotora era menor en los animales  $p38\gamma^{-/-}$  y  $p38\delta^{-/-}$  tanto en animales alimentados con ND como con HFD, siendo esta disminución significativa en los animales  $p38\gamma^{-/-}$ .



**Fig.14: Perfil lipídico de animales WT,  $p38\gamma^{-/-}$  y  $p38\delta^{-/-}$ :** **A.** El total de triglicéridos hepáticos de animales WT,  $p38\delta^{-/-}$  y  $p38\gamma^{-/-}$  en dietas ND se midió tras un de ayuno de 16 horas. **B,C, y D.** Los valores de VLDL-triglicéridos, colesterol total y LDL-colesterol se cuantificaron mediante FPLC, las fracciones se han representado como el área bajo la curva (ABC). Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM. Las diferencias significativas están indicadas como ([\*]  $p < 0.05$ , [\*\*]  $p < 0.01$ , [\*\*\*]  $p < 0.001$ ).

Además, se midió el cociente respiratorio observando que los animales  $p38\gamma^{-/-}$  en ND poseían un menor cociente respiratorio que los animales WT, lo que indicaría que dichos animales consumen más lípidos y proteínas que hidratos de carbono (Fig. 15C). Por otro lado, la alimentación con dietas ricas en grasa indujo una disminución en el cociente respiratorio en los animales WT, lo que indicaría que en estas condiciones los

animales tienen un mayor gasto en lípidos. Sin embargo, no se observaron diferencias en dicho cociente entre los animales WT, p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> y p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> en HFD (Fig. 15C).



**Fig.15: Comparación del balance energético entre WT y p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> o WT y p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>:** Los ratones fueron analizados durante 48 horas en cajas metabólicas. **A.** Gasto energético (Kcal/h/kg) **B.** Actividad física (beam breaks) y **C.** Cociente respiratorio [VCO<sub>2</sub>]/[VO<sub>2</sub>]. Los datos fueron representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM. Las diferencias significativas están indicadas como ([\*] p < 0.05, [\*\*] p < 0.01, [\*\*\*] p < 0.001).

### 1.1.3 Los animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> y p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> desarrollan esteatosis hepática

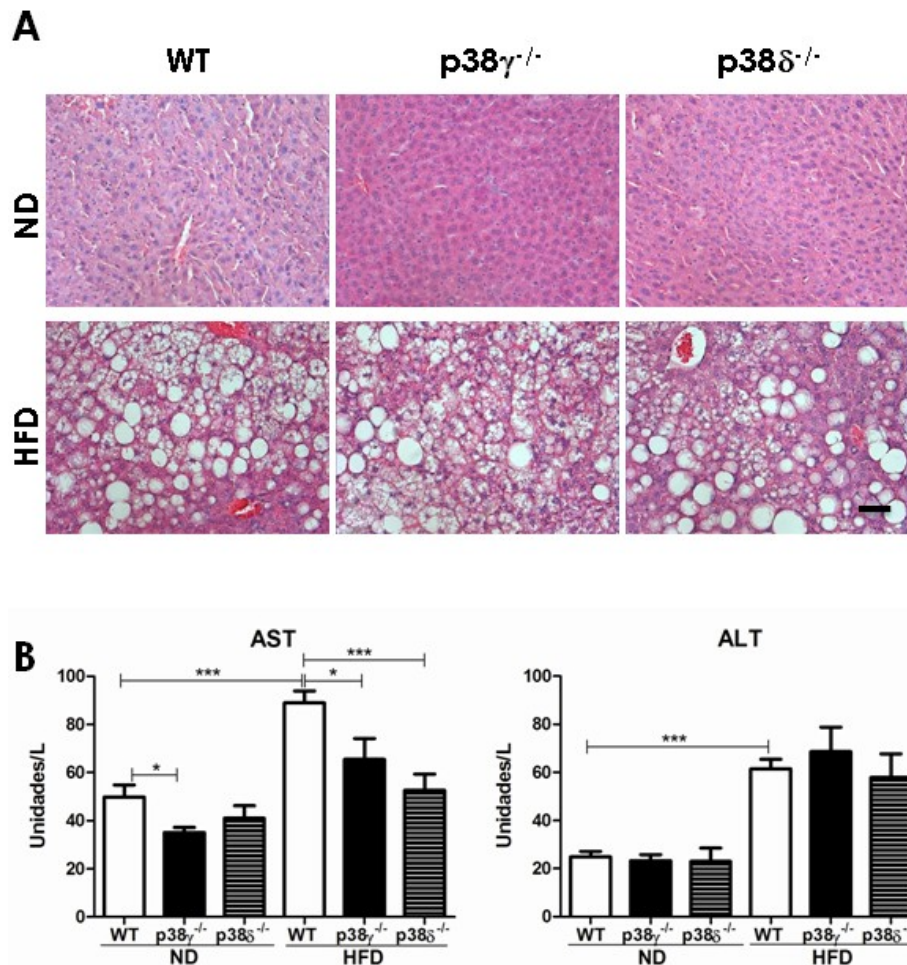
Cuando se producen noxas en el hígado debido a la obesidad, puede desencadenarse la esteatosis hepática o incluso la cirrosis. Al mismo tiempo, con este daño hepático se produce la muerte del hepatocito por necrosis, induciendo el aumento de transaminasas en el torrente sanguíneo[329].

Para estudiar el desarrollo de esteatosis hepática inducida por la obesidad, se analizaron cortes histológicos de los hígados de los animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>, p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> y WT. Mientras que en dietas control los hígados no presentaban anomalías en su estructura, tras dietas ricas en grasa los tres genotipos desarrollaron igual grado de esteatosis (Fig. 16A). Para poder determinar el grado de necrosis se midió los niveles de transaminasas en sangre. Nuestros resultados indican que los animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> y p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>

están protegidos frente a la necrosis hepática a juzgar por sus menores niveles de AST obtenidos tras la dieta HFD (Fig. 16B).

Como conclusión, la carencia de p38 $\gamma$  o p38 $\delta$  no protege de la inducción de obesidad ni de los cambios metabólicos que esta produce.

Se ha descrito que estas quinasas pueden llegar a compensarse entre sí[293], por ello, decidimos estudiar el efecto de la carencia de ambas quinasas, para lo que se generaron animales carentes tanto de p38 $\gamma$  como de p38 $\delta$  (p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ ).

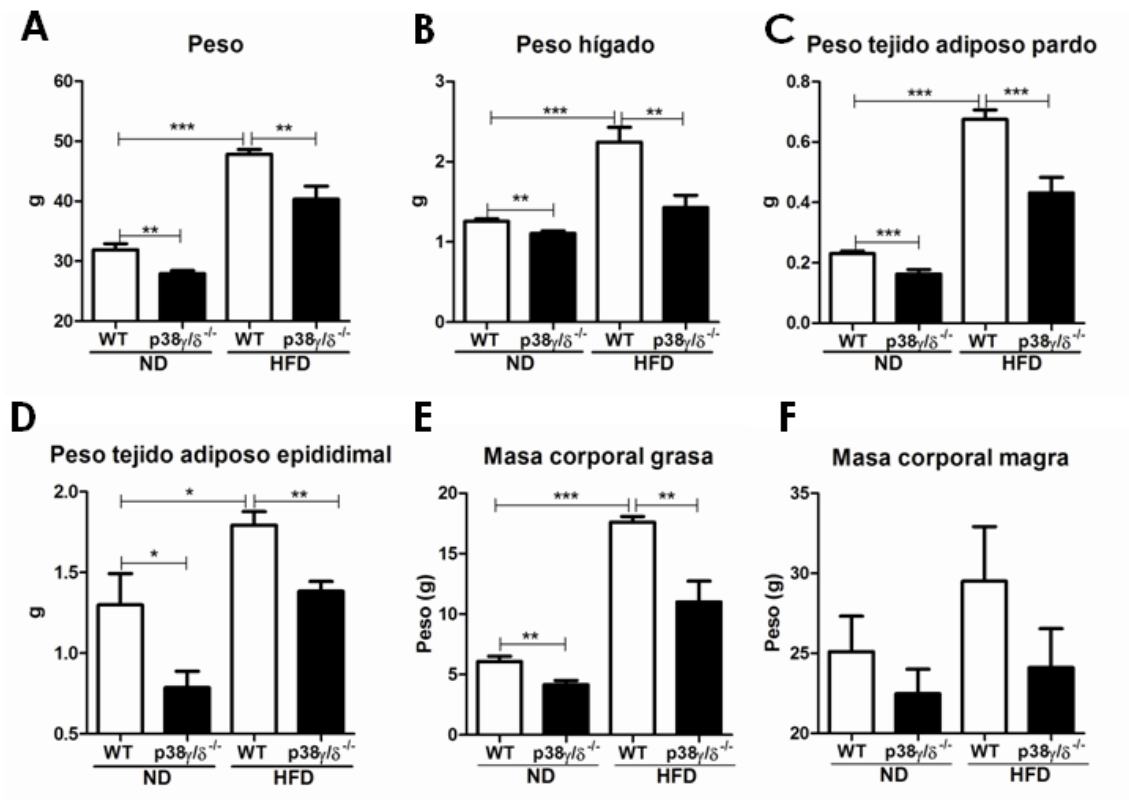


**Fig.16: Determinación del daño hepático tras dietas ND o HFD: A.** Secciones hepáticas de 8  $\mu$ m se tiñeron con H/E y se observaron al microscopio óptico. **B.** Se cuantificó la actividad enzimática de transaminasas en plasma de animales WT, p38 $\gamma^{-/-}$  y p38 $\delta^{-/-}$  en dietas ND o HFD. Los resultados se representan como media  $\pm$  error estándar de la media SEM (n = 10). Las diferencias significativas entre los grupos están indicadas con ([\*] p < 0.05, [\*\*\*] p < 0.001).

## 1.2 Ratones p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ están protegidos frente a la obesidad

Para estudiar el efecto de la doble carencia de p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  se utilizaron ratones p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ . Estos animales son totalmente normales y no presentan problemas

reproductivos. A las 8 semanas de vida estos animales junto con los controles fueron alimentados con dietas HFD durante 20 semanas. Tras este periodo, se observó que los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  presentaban una menor ganancia de peso que los animales WT tanto en ND como en HFD (Fig. 17A) y que esto se correlacionaba con un menor peso del hígado, tejido adiposo pardo y epididimal en los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  respecto a los WT (Fig. 17B, 17C, 17D). Para corroborar estos resultados, se hizo el análisis de imagen por resonancia magnética, que mostró que los  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  poseían menor masa corporal grasa, tanto en ND como en HFD respecto a los WT, no observándose diferencias en la masa corporal magra entre ambos grupos (Fig. 17E, 17F). Esto datos nos indican que la carencia de estas dos quinasas protege de la obesidad.



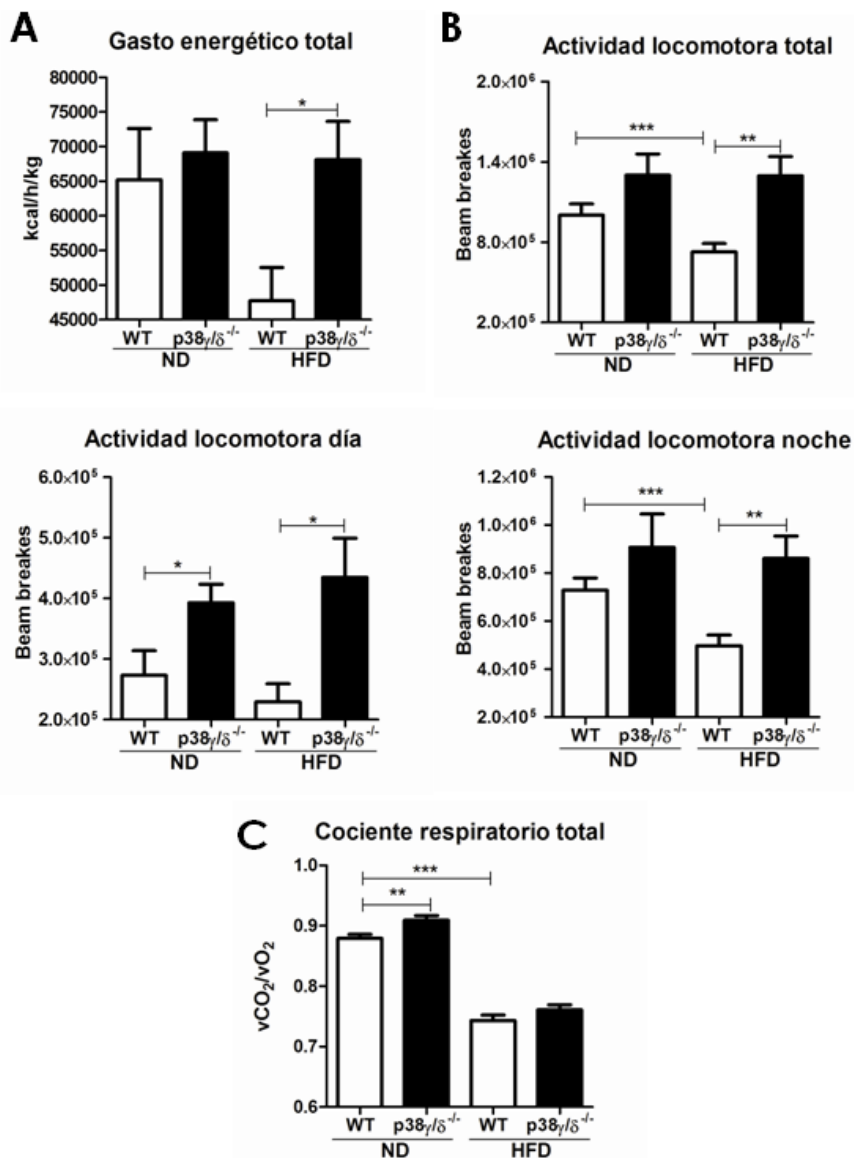
**Fig.17: Caracterización corporal de animales WT y  $p38\gamma/\delta^{-/-}$**  A, B, C y D. Peso de los animales tras su sacrificio, así como también a sus diferentes tejidos post-mortem. E y F. Cuantificación de masa corporal grasa y magra total mediante resonancia magnética. Los datos se representaron como la media  $\pm$  error estándar de la media ( $n = 10$ ). Diferencias significativas están indicadas ([\*]  $p < 0.05$ , [\*\*]  $p < 0.01$ , [\*\*\*]  $p < 0.001$ ).

## 1.2.1 La carencia de $p38\gamma/\delta$ incrementa el gasto energético en HFD

Para poder estudiar el metabolismo energético de los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$ , se utilizaron cajas metabólicas. Mientras que en ND no existían diferencias entre los

animales WT y los  $p38\gamma/\delta^{-/-}$ , en HFD los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  tenían un mayor gasto energético que los animales WT (Fig. 18A). Además, estos animales presentaban una mayor actividad locomotora respecto a los WT (Fig. 18B). Mientras que, durante el día, este aumento se presenta tanto en ND como en HFD, en la noche, solo existía esta diferencia en HFD.

Asimismo, los  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  en ND presentaron un aumento significativo de su cociente respiratorio, lo que indica que dichos animales consumen más carbohidratos y proteínas que los animales WT (Fig. 18C).



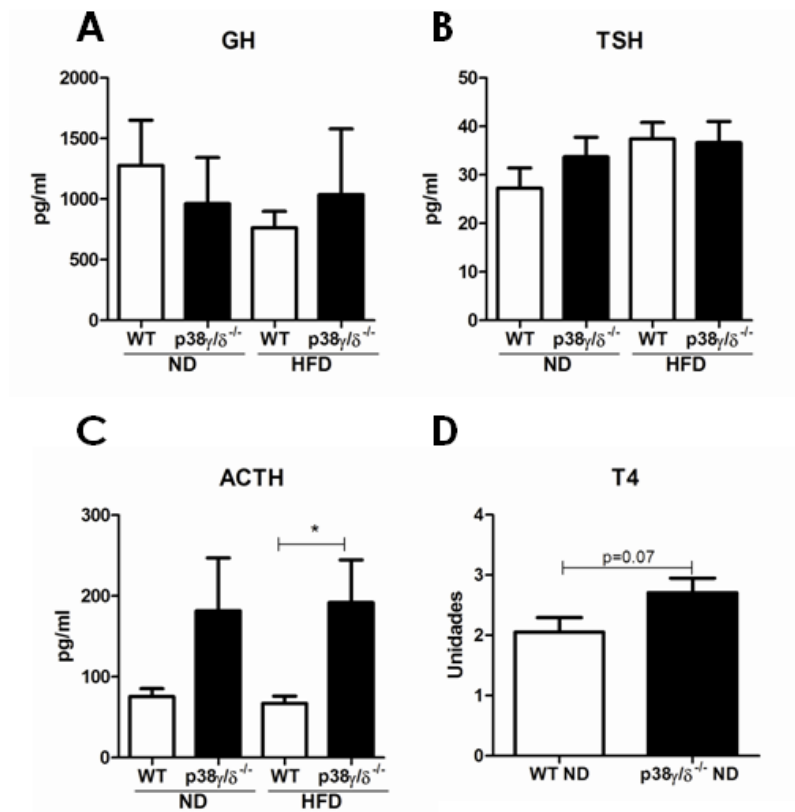
**Fig.18: Comparación del balance energético entre WT y  $p38\gamma/\delta^{-/-}$ :** Los ratones WT y  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  en dietas ND o HFD fueron analizados durante 48 horas en cajas metabólicas. **A.** Gasto energético (Kcal/h/kg). **B.** Actividad física (beam breaks) de día, noche y total. **C.** Cociente respiratorio [ $V_{CO_2}$ ]/[ $V_{O_2}$ ]. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM. Las diferencias significativas están indicadas como ([\*]  $p < 0.05$ , [\*\*]  $p < 0.01$ , [\*\*\*]  $p < 0.001$ ).



### 1.2.2 La carencia de p38 $\gamma/\delta$ afecta los niveles de hormonas del eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo

Debido a que se observaron cambios en la actividad locomotora y en el gasto energético, se decidió analizar hormonas del eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo.

Se cuantificaron los niveles circulantes de hormonas como ACTH, TSH, GH y también la hormona T4 en plasma de ratones. Mientras no existían diferencias en los niveles de GH y TSH entre ambos genotipos en dietas ND y HFD (Fig. 19A, 19B), los niveles de ACTH eran mayores en los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  en ambos tipos de dietas (Fig. 19C). Por otro lado, los niveles de la prohormona T4 eran mayores en los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  respecto al WT en ND (Fig. 19D).

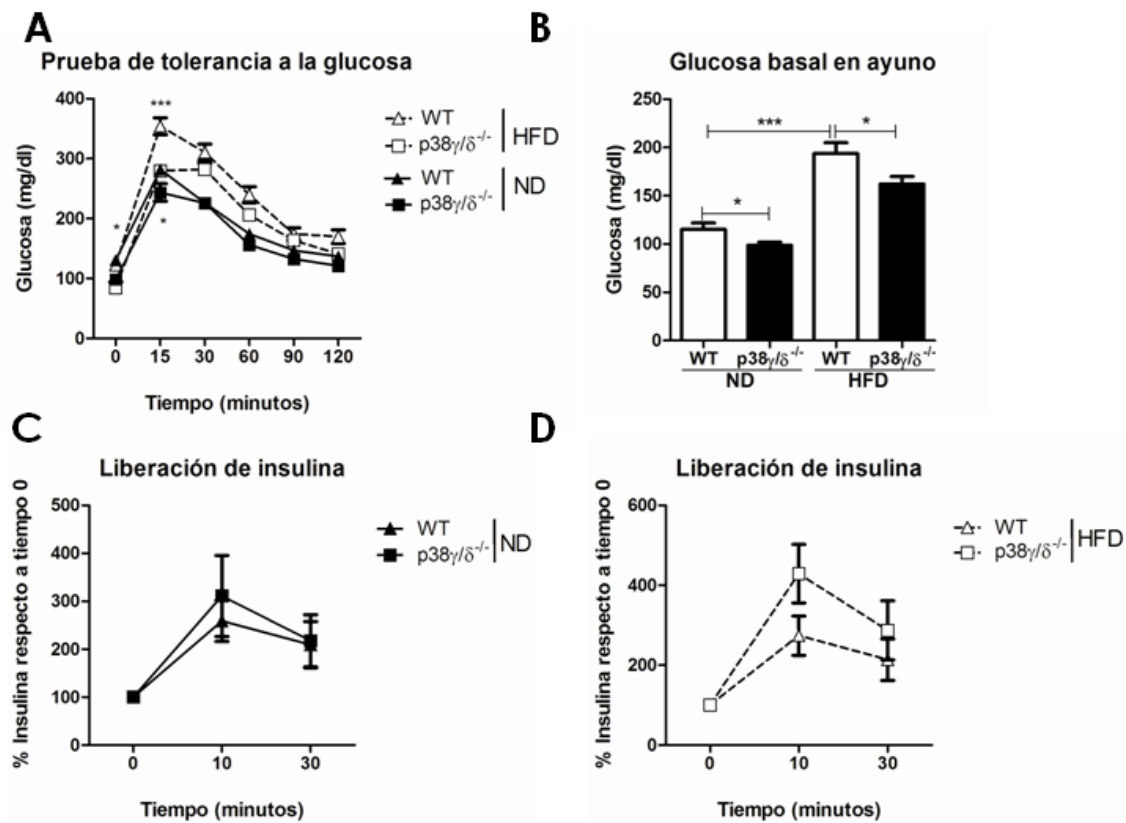


**Fig.19: Estudio del eje hipotalámico tiroideo en ratones WT y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ :** Niveles plasmáticos basales de hormonas en animales WT y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  alimentados con dietas ND o HFD. **A.** GH, **B.** TSH, **C.** ACTH y **D.** T4. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM. Las diferencias significativas están indicadas como ([\*]  $p < 0.05$ ).

### 1.2.3 La carencia de p38 $\gamma$ / $\delta$ protege del desarrollo de intolerancia a la glucosa en HFD

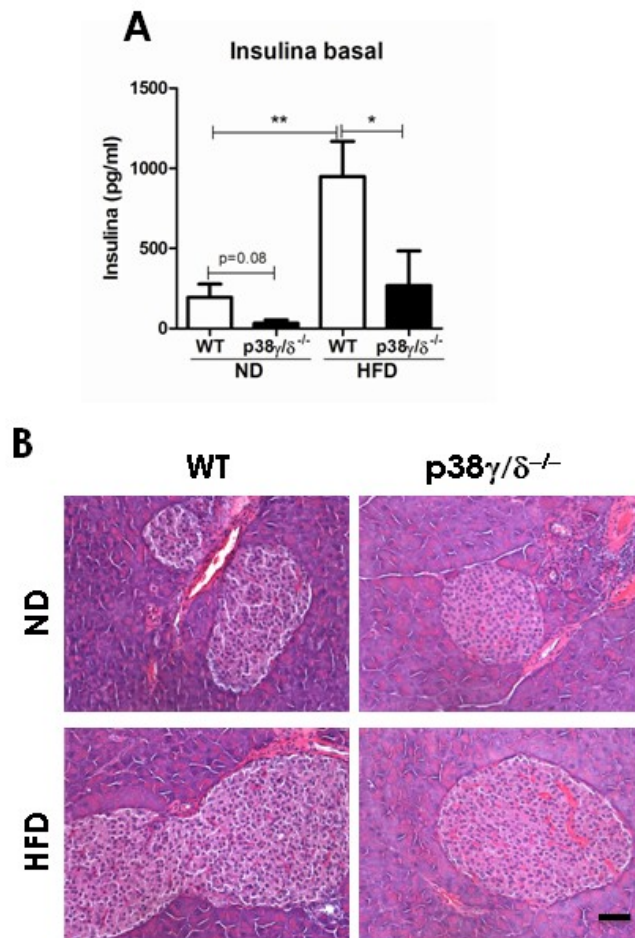
Para determinar el papel de p38 $\gamma$ / $\delta$  en el metabolismo de la glucosa se hizo la prueba de la GTT. En la figura 20A, se observa que los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup> eran más tolerantes a la glucosa que los animales WT tanto en ND como en HFD. Además, estos resultados se correlacionaban con unos menores niveles de glucosa basal en sangre (Fig. 20B).

Para analizar la funcionalidad pancreática, se realizó la prueba de liberación de insulina. Mientras que en ND no se observaron diferencias entre los diferentes genotipos (Fig. 20C), en HFD los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup> presentaban mayor secreción de insulina que los animales WT, lo que indicaría que su páncreas funcionaba mejor (Fig. 20D).



**Fig.20: Determinación de niveles de glucosa e insulina en ratones WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup> :** **A.** Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup> respecto a ratones WT en ND y HFD. Tras inyectar I.P. glucosa (1 g/kg) se determinó la concentración de glucosa a distintos tiempos. **B.** Los niveles basales de glucosa en ayuno se cuantificaron en animales WT y p38  $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup> en ND y HFD. **C y D.** La liberación de la insulina inducida por la administración de glucosa I.P. (2 g/kg) se cuantificó en sangre. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM (n = 10). Las diferencias significativas están indicadas como ([\*] p < 0.05, [\*\*\*] p < 0.001).

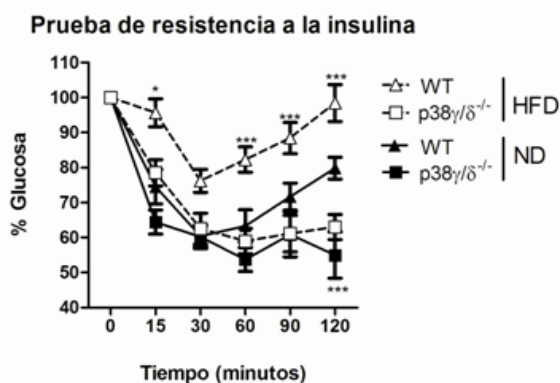
Estudiando los valores basales de insulina, se observó que los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  en HFD poseían menores niveles basales de insulina en ayuno, lo que significaría que estos animales no presentaban hipertrofia pancreática inducida por la alimentación en HFD (Fig. 21A). Para corroborar estos resultados, se realizaron cortes histológicos de los páncreas de estos animales. En la figura 21B se muestra que, mientras en animales WT en HFD se producía una hipertrofia de los islotes pancreáticos, este aumento del tamaño de los islotes era menor en los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$ .



**Fig.21: Determinación del estado pancreático:** **A.** Los niveles basales de insulina en ayuno se cuantificaron a partir de plasma de animales WT o  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  en dietas ND o HFD. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM,  $n=10$ . Las diferencias significativas están indicadas como ([\*]  $p < 0.05$ , [\*\*]  $p < 0.01$ ). **B.** Secciones de páncreas de animales WT o  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  en dietas ND o HFD fueron cortados a  $8\ \mu\text{m}$  y teñidos con H/E. Posteriormente se observaron al microscopio óptico, con un aumento de  $20\times$ , la barra de escala corresponde a  $100\ \mu\text{m}$ .

## 1.2.4 Los animales $p38\gamma/\delta^{-/-}$ poseen mayor sensibilidad a la insulina en el hígado

Una mayor tolerancia a la glucosa puede deberse a una mayor sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos. Para estudiarlo, realizamos la ITT (Fig. 22), no observándose diferencias entre ambos grupos en ND excepto a 120 minutos, en donde los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  tenían menores niveles de glucosa que los WT. Sin embargo, en HFD mientras los animales WT presentaban resistencia a la insulina, los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  permanecían sensibles a la misma, demostrando que la carencia de  $p38\gamma/\delta$  protege del desarrollo de resistencia a la insulina inducida por la HFD.



**Fig.22: Niveles de resistencia a la insulina en animales WT y  $p38\gamma/\delta^{-/-}$ :** A. La resistencia a la insulina se determinó mediante la prueba de ITT en ratones  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  y WT en ND o HFD, a los cuales se inyectó I.P. insulina (0.75 U/kg) y se midió la concentración de glucosa a diferentes tiempos (media  $\pm$  error estándar;  $n = 10$ ). Diferencias significativas entre WT y  $p38\delta^{-/-}$  están indicadas ([\*]  $p < 0.05$ , [\*\*\*]  $p < 0.001$ ).

A continuación se estudió el tejido o tejidos responsables de la sensibilidad a la insulina en los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  en HFD. Lisados de tejido adiposo epididimal, músculo e hígado fueron analizados mediante la técnica de western blot, estudiando el efecto del estímulo de insulina en la fosforilación y activación de AKT.

En el tejido adiposo epididimal, animales WT y  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  en dietas control presentaron igual nivel de respuesta al estímulo de insulina, pues la fosforilación de AKT en la serina (Ser) 473 y la treonina (Thr) 308 era similar en ambos modelos animales. Sin embargo, tras el tratamiento con dietas ricas en grasa ambos genotipos no respondieron a dicho estímulo, a juzgar por la falta de fosforilación de AKT tanto en la Ser 473 como en la Thr 308 (Fig. 23A).

En el músculo, los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  tras el estímulo de insulina fueron más sensibles que los WT en dieta control, ya que la fosforilación de AKT en la Ser 473 y la Thr

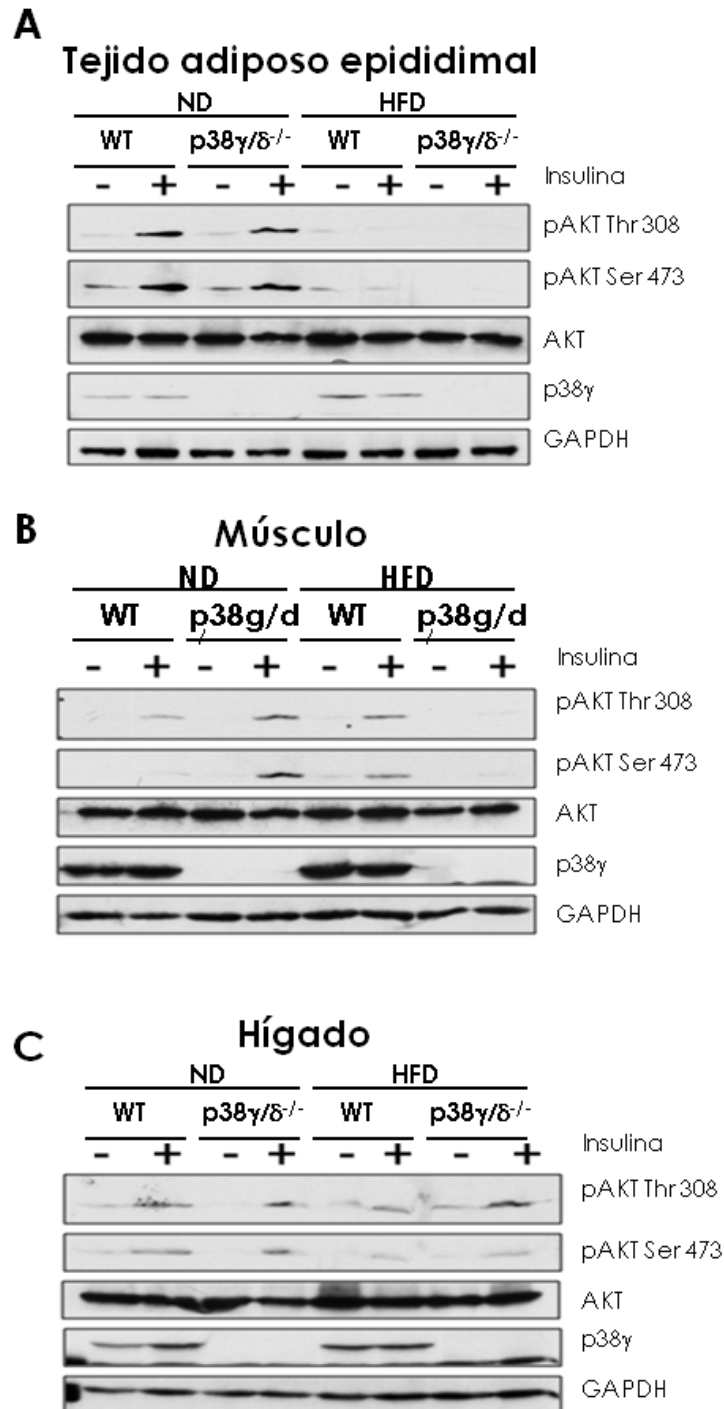
308 era mayor. Pero en HFD, los  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  fueron más resistentes a insulina que los WT, según lo observado en la falta de fosforilación de AKT en la Ser 473 y la Thr 308 (Fig. 23B).

En el hígado no se observaron diferencias en la fosforilación de AKT en la Ser 473 y la Thr 308 en ND (Fig. 23C). Sin embargo, en HFD mantuvieron una mayor sensibilidad a la insulina, ya que la fosforilación de AKT en la Ser 473 y la Thr 308 se mantuvo. Por lo tanto la mayor protección frente a la resistencia a la insulina se observó en el hígado de los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$ .

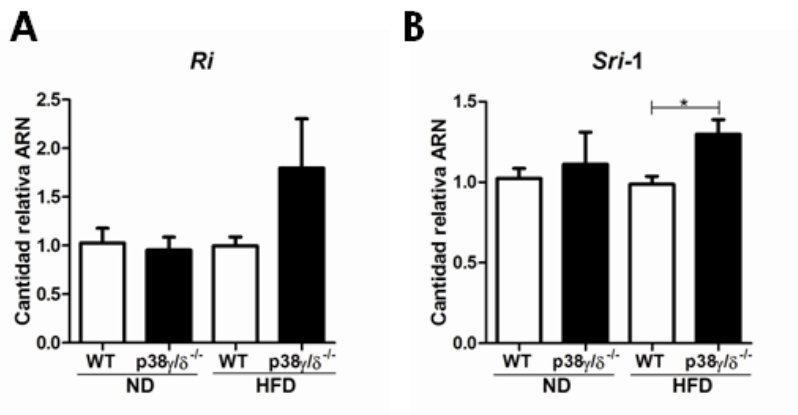
A continuación, se estudió la expresión en el hígado de los genes involucrados en la vía de la insulina, observando que los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  tenían una mayor expresión del receptor de insulina y del sustrato del receptor de insulina en comparación a los animales WT tras la dieta HFD (Fig. 24A, 24B).

### **1.2.5 Los animales $p38\gamma/\delta^{-/-}$ acumulan menos lípidos en hígado tras la HFD**

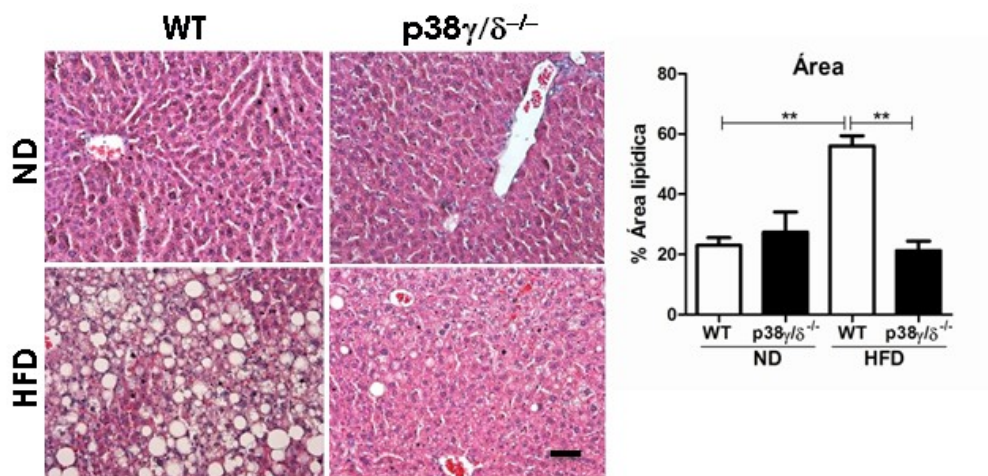
Como hemos indicado con anterioridad, los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  tuvieron una mayor sensibilidad a la insulina en hígado después de dietas ricas en grasas. Esto podría deberse a que estos animales presentaban un menor grado de esteatosis. Para estudiarla, se realizaron cortes histológicos de los hígados de estos animales (Fig. 25). Mientras que en ND tanto los animales WT como los  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  no presentaban esteatosis, en HFD los  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  almacenaron menos lípidos que los animales WT (Fig. 25). Para corroborar este resultado, se utilizó la tinción oil red que tiñe lípidos y triglicéridos neutros, observándose que en HFD, había un menor grado de infiltración de lípidos en los hígados de los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  que en los WT (Fig. 26). Estos resultados indicarían que la ausencia de estas quinasas puede proteger al hígado del acúmulo de lípidos inducido por obesidad.



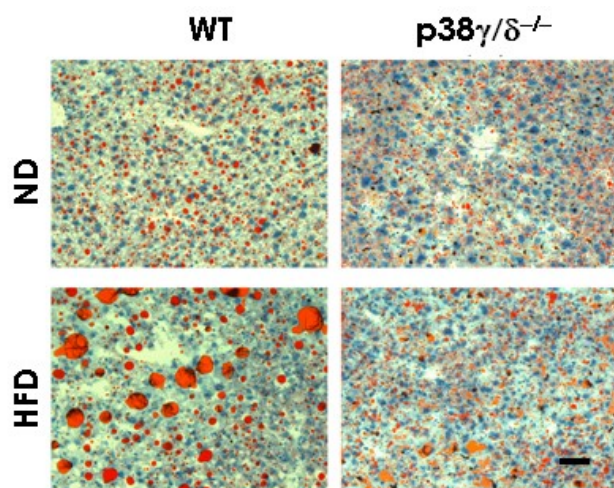
**Fig.23: Estado de sensibilidad a insulina de tejidos: A, B y C.** Lisados de tejido adiposo epididimal, músculo e hígado. Los lisados se obtuvieron de tejidos con y sin estímulos de insulina (1.5 U/kg) inyectada I.P. 10 min previo al sacrificio. Las membranas transferidas de estos lisados fueron incubadas o/n con anticuerpos pAKT 308, pAKT 473, AKT, p38 $\gamma$ , p38 $\delta$  y GAPDH.



**Fig.24: Expresión de genes de la ruta de insulina en hígado: A y B.** La expresión de genes en hígado se midió mediante PCR cuantitativa de ARNm de animales WT o p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup> en dietas ND o HFD. La expresión relativa de ARNm fue calculada mediante la normalización de los datos a la cantidad de ARNm de *Gapdh* en cada muestra. Los resultados se representan como media  $\pm$  error estándar de la media SEM (n = 10). Las diferencias significativas entre los grupos están indicadas con ([\*] p < 0.05).



**Fig.25: Determinación de esteatosis hepática de animales WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup>:** Secciones de 8  $\mu$ m de hígado, teñidas con H/E de animales WT o p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup> en dietas ND o HFD, se observaron al microscopio óptico. Las secciones se fotografiaron con un aumento de 20X y la barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m. El área lipídica fue cuantificada mediante el software ImageJ del NIH. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar (n = 10). Las diferencias significativas están indicadas como ([\*\*] p < 0.01).



**Fig.26: Determinación del contenido lipídico del hígado:** Tejido hepático crio-conservado en OCT de animales WT o  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  en dietas ND o HFD fue cortado en secciones de 12  $\mu\text{m}$  y teñidos con oil red. Las fotografías fueron tomadas en aumento 20X y la barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Con el fin de dilucidar el mecanismo por el cual la carencia de  $p38\gamma$  y  $\delta$  podría proteger de la esteatosis hepática, se estudió la expresión de genes implicados en la lipólisis y lipogénesis hepática. Mientras que en ND no existían diferencias en la expresión de estos genes entre los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  y WT, en HFD los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  tenían mayores niveles de expresión de genes que controlan la lipogénesis como SRBEP-1C y de genes que controlan la oxidación lipídica como Acyl-CoA oxidasa 1 (ACOX1) y el coactivador transcripcional de  $\text{PPAR}\gamma$  1 $\beta$  (PGC1B) (Fig. 27A, 27B, 27C). Sin embargo, no se observaron diferencias en HFD entre WT y  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  en la lipasa endotelial, acetil-CoA sintetasa 2 (ACS2), receptores activados por la proliferación de los peroxisomas gamma ( $\text{PPAR}\gamma$ ) y en los receptores activados por la proliferación de los peroxisomas alfa ( $\text{PPAR}\alpha$ ) (tabla 11).

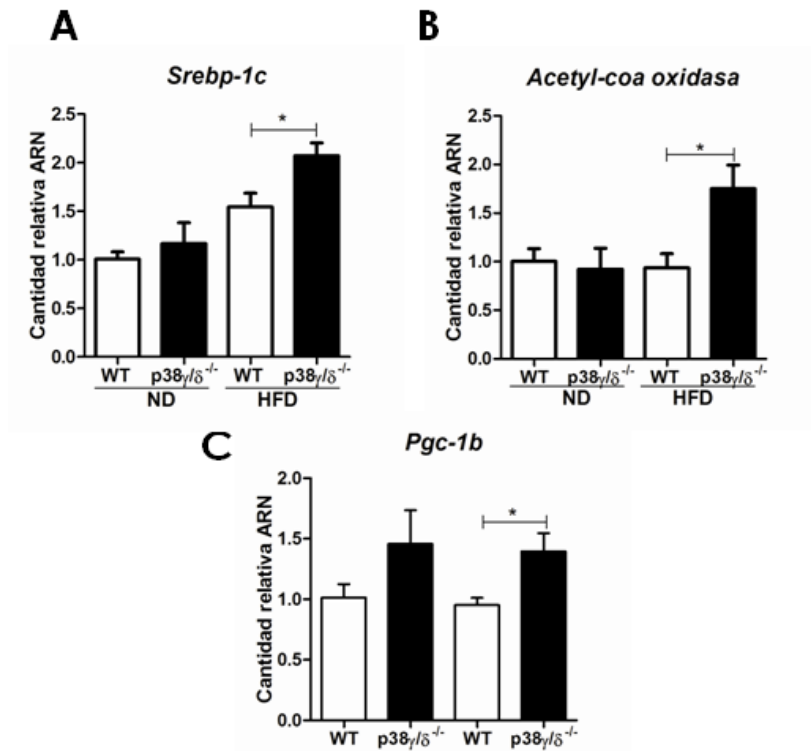
Nombre	$\bar{x}$ WT ND	$\bar{x}$ $p38\gamma/\delta$ ND	p value	$\bar{x}$ WTHFD	$\bar{x}$ $p38\gamma/\delta$ HFD	p value
<i>Srebp1c</i>	1.007 $\pm$ 0.076	1.167 $\pm$ 0.215	0.471	1.545 $\pm$ 0.141	2.071 $\pm$ 0.133	<b>0.022*</b>
<i>Pgc1b</i>	1.014 $\pm$ 0.112	1.457 $\pm$ 0.278	0.492	0.952 $\pm$ 0.059	1.396 $\pm$ 0.150	<b>0.010***</b>
<i>Lipasa endotelial</i>	1.023 $\pm$ 0.174	0.789 $\pm$ 0.136	0.327	1.851 $\pm$ 0.373	1.108 $\pm$ 0.348	0.185
<i>Lipc</i>	1.015 $\pm$ 0.191	0.772 $\pm$ 0.196	0.396	1.093 $\pm$ 0.138	1.140 $\pm$ 0.128	0.816
<i>Acs2</i>	1.032 $\pm$ 0.114	0.719 $\pm$ 0.179	0.153	0.907 $\pm$ 0.101	0.784 $\pm$ 0.077	0.383
<i>Acox</i>	1.003 $\pm$ 0.132	0.922 $\pm$ 0.215	0.749	0.936 $\pm$ 0.145	1.750 $\pm$ 0.243	<b>0.010*</b>
<i>Pparγ</i>	1.008 $\pm$ 0.239	0.514 $\pm$ 0.117	0.107	3.490 $\pm$ 0.356	3.679 $\pm$ 0.693	0.798
<i>Pparα</i>	1.002 $\pm$ 0.092	0.696 $\pm$ 0.177	0.127	0.762 $\pm$ 0.148	0.920 $\pm$ 0.184	0.514

**Tabla 11: Genes analizados en hígados de animales en HFD mediante PCR cuantitativa.**

Aunque los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  acumulen menos de lípidos en el hígado, a nivel de expresión de genes se observa que expresan más SREBP-1C, un gen lipogénico, por lo que se estudió si los niveles de RNA se correspondían con los de la proteína que

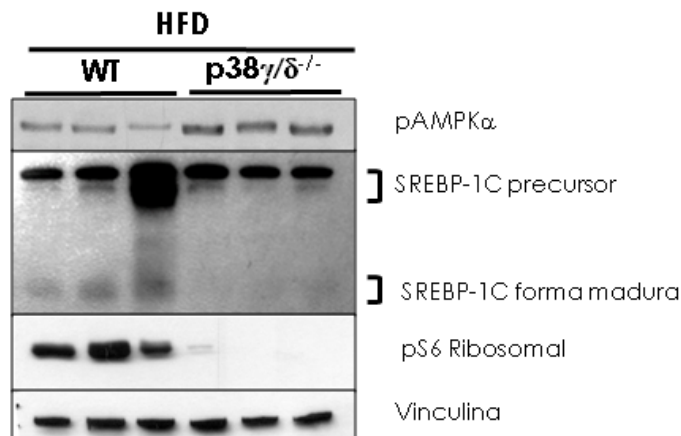


aparece en dos formas: como un precursor anclado a membrana o como una forma madura que es escindida y va al núcleo.



**Fig.27: Expresión de genes lipogénicos y lipolíticos en hígado:** La expresión de genes en hígado de animales WT o p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  en dietas ND o HFD se cuantificó mediante PCR cuantitativa de ADNc obtenido de ARNm de hígado. Los datos de la expresión de *Srebp-1c*, *Acox1y* y *Pgc1b* fueron representados y calculados mediante la normalización de los datos con la cantidad de *Gapdh* por cada muestra. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar (n = 10). Las diferencias significativas entre WT y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  están indicadas ([\*] p < 0.05).

En la Figura 28, se observa que los lisados hepáticos de animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  contenían más precursor de SREBP-1C que los WT en HFD, así como presentaron menores niveles de la proteína madura que los animales WT.



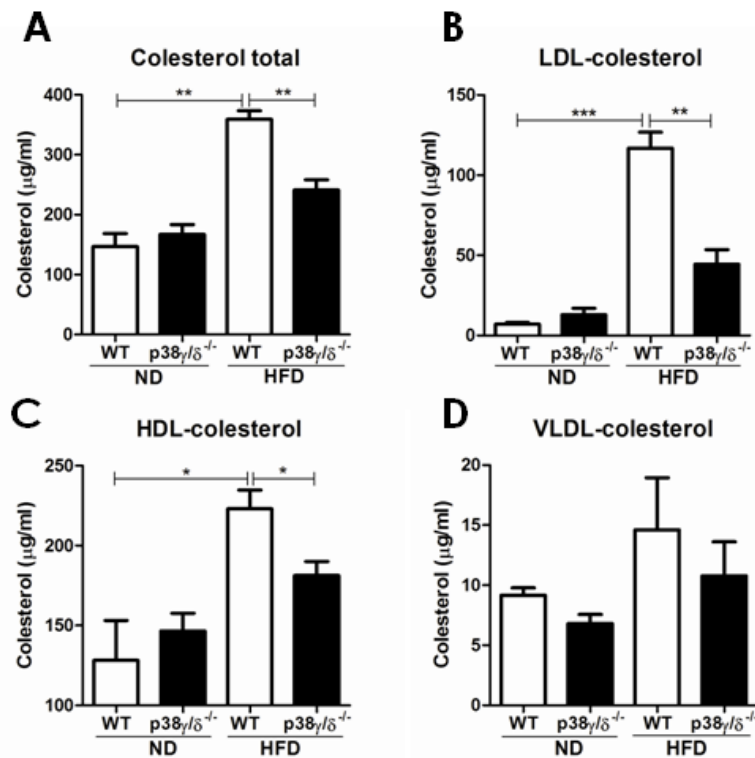
**Fig.28: Western blot de lisados hepáticos:** Lisados hepáticos de animales WT o p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  en dietas HFD fueron separados mediante electroforesis PAGE-SDS y transferidos a membranas de

nitrocelulosa, las cuales se incubaron o/n con anticuerpos SREBP1-C, pAMPK $\alpha$ , pS6Ribosomal y vinculina.

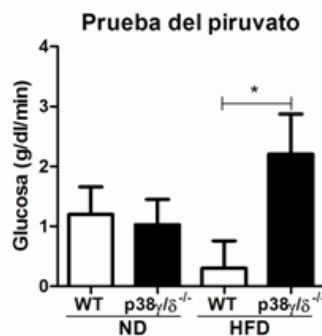
Se ha descrito que la AMPK fosforila a la proteína SREBP-1C inhibiendo la escisión proteolítica del SREBP-1C y suprimiendo la expresión de genes diana de SREBP-1C. Todo esto llevaría a la disminución de la síntesis de lípidos y su acumulación en hígado [330]. Por ello, se estudió la fosforilación de la AMPK observando una mayor fosforilación de esta proteína en los lisados hepáticos de los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup> respecto a los de los WT (Fig. 28). También observamos una disminución en la fosforilación de S6 ribosomal, proteína que se encuentra en esta vía de señalización (Fig. 28). Por lo tanto, una mayor activación de AMPK llevaría a una mayor fosforilación de SREBP-1C con la consecuente disminución de lípidos en hígado.

A continuación, mediante FPLC se analizaron los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma. Mientras en ND ambos grupos presentaban perfiles lipídicos similares, tras la dieta HFD los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup> poseían menos colesterol circulante en las fracciones de HDL y LDL que los WT (Fig. 29A, 29B, 29C y 29D).

El acúmulo de lípidos en el hígado reduce la función hepática. Para poder estudiar dicha función se realizó la prueba del piruvato en la que se produce la conversión de piruvato en glucosa, proceso que se realiza en un 90% en los hepatocitos y, en muy pequeña cantidad, en los riñones. El piruvato se transforma en glucosa en el hígado a través de una serie de reacciones enzimáticas que ocurren a nivel mitocondrial y citoplasmático. El primer paso que ocurre en la mitocondria es la conversión del piruvato en oxaloacetato y luego este a malato, logrando salir al citosol. Desde aquí las reacciones enzimáticas producen fosfoenolpiruvato, fructosa 1,6 bifosfato y glucosa 6 fosfato. Finalmente, en un proceso que solo ocurre en el hígado la glucosa 6 fosfato pasa a glucosa y es liberada al torrente sanguíneo, ayudando así al mantenimiento de la normoglicemia. Por lo tanto, en un animal que conserve la funcionalidad hepática se observará que el piruvato sódico inyectado se metaboliza convirtiéndose en glucosa que será liberada al torrente sanguíneo. En ND la función hepática fue similar entre WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup>, pero en HFD se observó que los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup> presentaban un incremento en la producción de glucosa tras la HFD (Fig. 30).



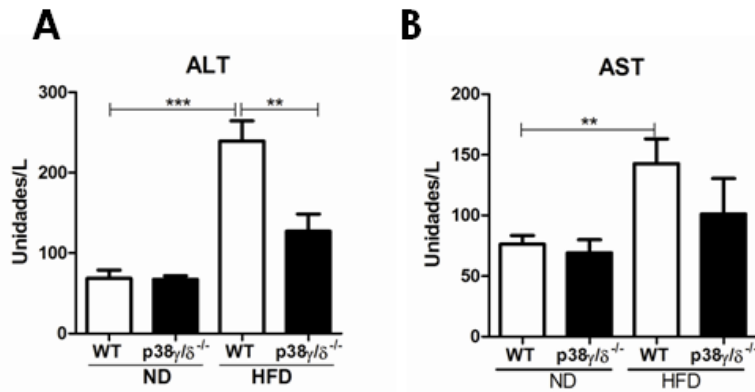
**Fig.29: Perfil lipídico de animales WT y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$**  Los valores de Colesterol total y LDL-colesterol, HDL-colesterol y VLDL-colesterol, obtenidos mediante FPLC fueron representados como el área bajo la curva (ABC). Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM (n=10). Las diferencias significativas están indicadas como ([\*] p < 0.05, [\*\*] p < 0.01, [\*\*\*] p < 0.001).



**Fig.30: Estado funcional hepático:** El estado funcional hepático se midió mediante la prueba de piruvato. A ratones p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  y WT en ND y HFD se inyectó I.P. piruvato sódico (1 mg/g) y se midió la concentración de glucosa. Los datos han sido representados como el área bajo la curva (ABC) y la media  $\pm$  error estándar; n = 10. Diferencias significativas entre WT y p38 $\delta^{-/-}$  están indicadas ([\*] p < 0.05).

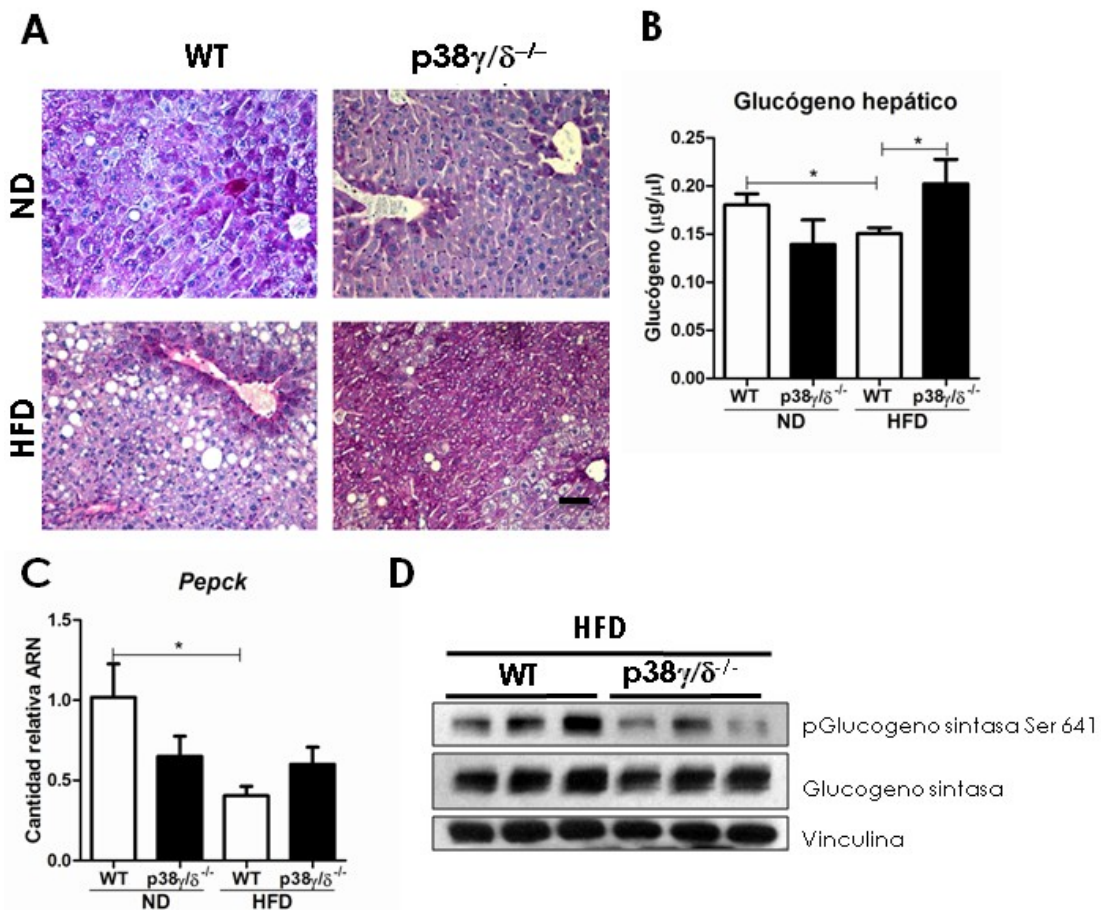
Con el fin de determinar si la falta de esteatosis en los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  les protegía frente a la necrosis hepática se midieron las transaminasas en plasma (Fig.

31A y 31B) observándose en los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  en HFD los niveles de ALT eran menores que en los animales WT.



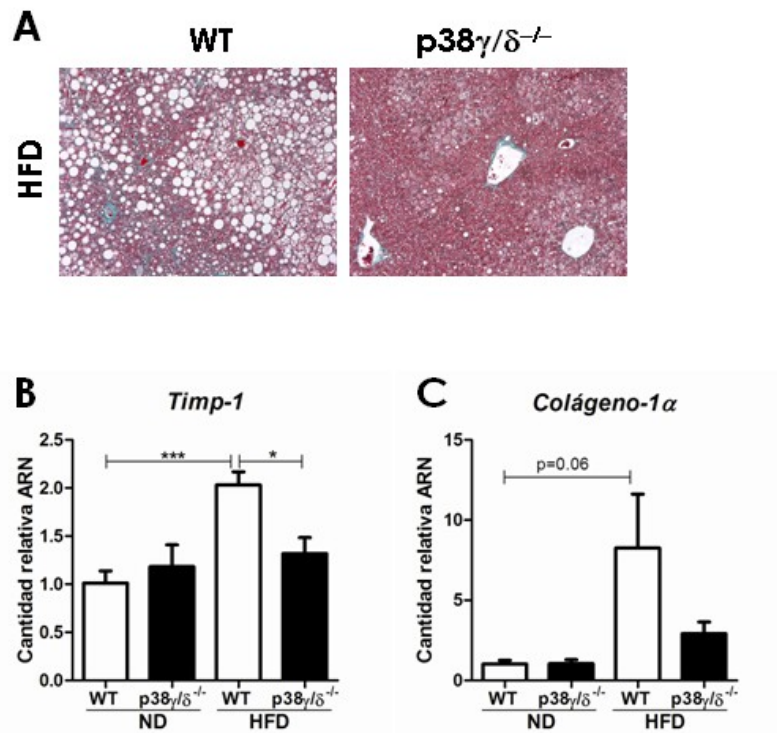
**Fig.31: Estado de daño hepático en animales WT o  $p38\gamma/\delta^{-/-}$ :** Los niveles de transaminasas hepáticas ALT (A) y AST (B) se cuantificaron en el plasma de animales WT y  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  alimentados con ND o HFD. Los resultados se representan como media  $\pm$  error estándar de la media SEM (n = 10). Las diferencias significativas están indicadas como ([\*\*]  $p < 0.01$ , [\*\*\*]  $p < 0.001$ ).

Nuestros resultados indican que los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  tras la HFD no almacenaban el exceso de energía como lípidos intrahepáticos. Ya que el glucógeno hepático es la principal fuente para mantener los niveles de glucosa en sangre en épocas de ayuno, pudiendo representar hasta el 10 % del peso del hígado, nos preguntamos si los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  podrían acumular este exceso de energía como glucógeno. Mediante la tinción del ácido peryódico de Schiff (P.A.S) se observó que, mientras en ND no existían diferencias en la acumulación de glucógeno entre los animales WT y  $p38\gamma/\delta^{-/-}$ , los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  acumulaban más glucógeno en el hígado que los animales WT en HFD (Fig. 32A). Para corroborar estos resultados se cuantificaron los niveles de glucógeno hepático obteniéndose que efectivamente los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  presentaron mayores niveles que los animales WT en HFD (Fig. 32B). Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de PEPCCK (Fig. 32C). Al mismo tiempo observamos mayores niveles de fosforilación en la serina 641 de la proteína glucógeno sintasa y por lo tanto de inhibición de esta enzima en el hígado de los animales WT alimentados con HFD (Fig. 32D).



**Fig.32: Determinación del glucógeno hepático:** **A.** Tejido hepático de animales WT o p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  en dietas HFD o ND se cortó en secciones de 8  $\mu\text{m}$  y se tiñó con P.A.S. para detectar el glucógeno hepático. Los cortes fueron examinados al microscopio y las fotos obtenidas con un aumento de 20X. La barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ . **B.** Cuantificación del glucógeno hepático de los lisados de animales WT o p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  mediante el ensayo de la hexoquinasa. **C.** Niveles de expresión hepática de *Pepck*, obtenidos mediante PCR cuantitativa. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM (n=10). Las diferencias significativas están indicadas como ([\*] p < 0.05). **D.** Western blot de lisados hepáticos de animales WT y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  en dieta HFD en los que se detectó la forma fosforilada y total de la glucógeno sintasa y la vinculina como control de carga. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM (n=10). Las diferencias significativas están indicadas como ([\*] p < 0.05).

Asimismo, para investigar si la carencia de estas proteínas podría proteger de la fibrosis hepática, se analizó la presencia de la misma mediante la tinción de Masson. En la figura 33A se observa que los animales WT tras la HFD desarrollaron no solo un alto grado de esteatosis, sino que también, comenzaron a presentar un incremento de las fibras de colágeno en el parénquima hepático. Sin embargo, este aumento en la fibrosis no estaba presente en los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  después de esta dieta. Además, al analizar los niveles de marcadores de fibrosis como Timp-1 y colágeno 1 $\alpha$ , se advirtió que en los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  los niveles de expresión de estos marcadores fueron menores que en los WT (Fig. 33B y 33C).

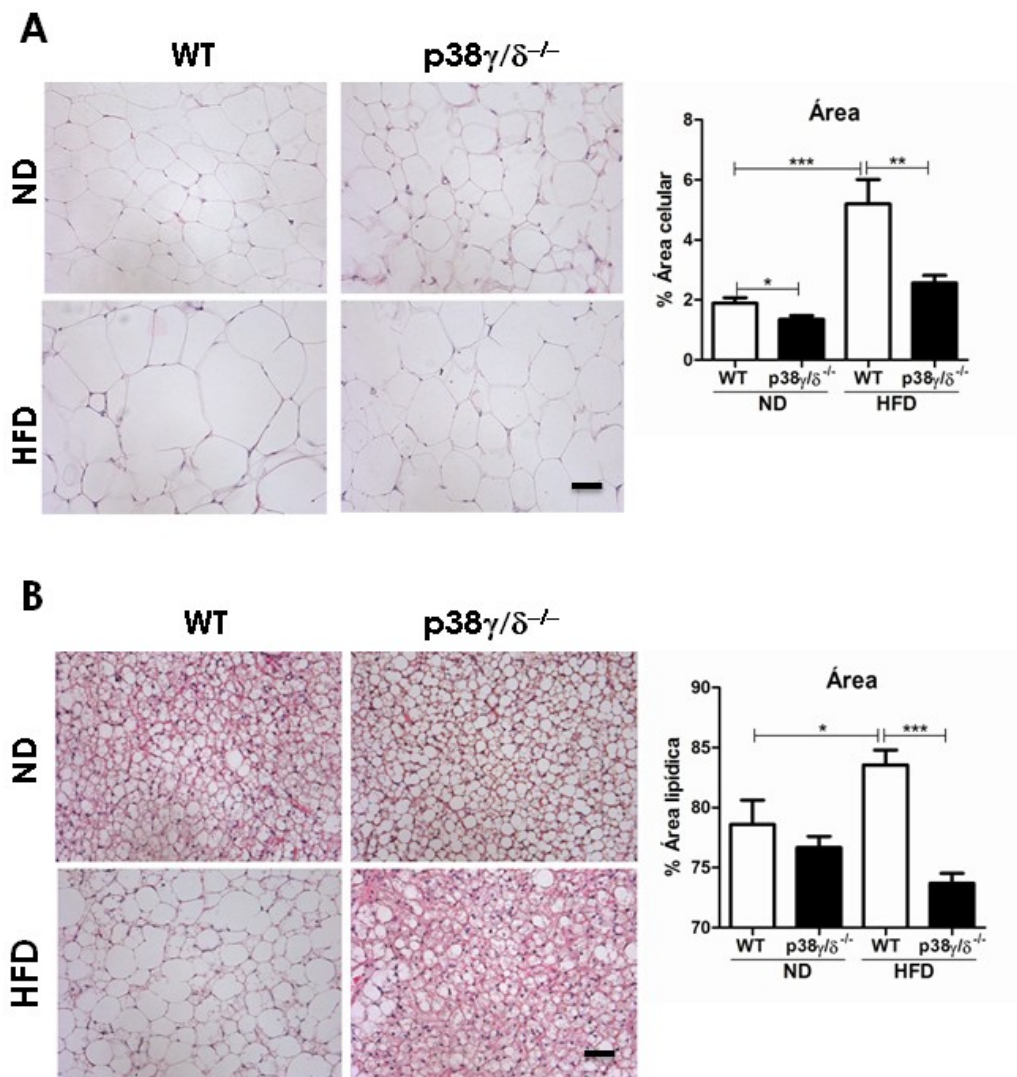


**Fig.33: Determinación del nivel de fibrosis hepática:** **A.** Las dietas HFD inducen fibrosis hepática en animales WT, no así en los p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ . Secciones de 5  $\mu$ m fueron cortadas y teñidas con tricrómica de Masson que tiñe las fibras de colágeno. Todos los cortes fueron examinados al microscopio y las fotos obtenidas con un aumento de 10X. La barra de escala corresponde a 60  $\mu$ m. **B y C.** Los niveles de expresión de *Timp-1* y *Colágeno tipo 1- $\alpha$*  se cuantificaron mediante PCR cuantitativa normalizando los valores de expresión con los niveles de *Gapdh* de cada muestra. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar (n = 10). Las diferencias significativas están indicadas como ([\*] p < 0.05, [\*\*\*] p < 0.001).

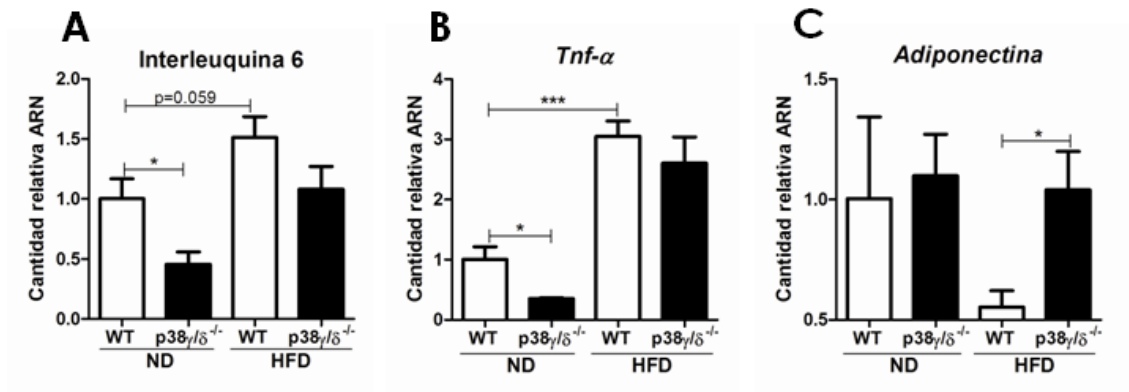
### 1.2.6 La carencia de p38 $\gamma/\delta$ disminuye los depósitos de lípidos en tejido adiposo tras HFD, disminuyendo también la expresión de citoquinas inflamatorias

El aumento de calorías en el organismo origina un incremento en el almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo. Para saber si la carencia de estas quinasas podría afectar al depósito de lípidos en el tejido graso, se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina del tejido adiposo epididimal y pardo. Mientras que en dietas ND no se observaron diferencias entre los animales WT y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ , en HFD los adipocitos del tejido adiposo blanco epididimal de los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  tenían menor tamaño que los de los animales WT, debido a una disminución en la acumulación de lípidos (Fig. 34A). En cuanto al tejido adiposo pardo, comprobamos que los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  también tenían menores depósitos lipídicos que los WT (Fig. 34B).

Está descrito que el tejido adiposo blanco es también un órgano secretor y puede liberar citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6. Mediante RT-PCR se analizaron los niveles de expresión de estas citoquinas en este tejido, observando que en ND los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup> presentaban menores niveles de ARN de estas citoquinas que los animales WT, no existiendo diferencias en HFD (Fig. 35A, 35B). Además de citoquinas, la grasa secreta adipoquinas, como la adiponectina, cuyos niveles de ARN disminuyen en el tejido adiposo de personas obesas. Cuando estudiamos los niveles de ARN de esta adipoquina se observó que en los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup> se mantenían los niveles de adiponectina mientras que en los WT disminuía tras la HFD (Fig. 35C).



**Fig.34: Determinación del incremento de lípidos en tejido adiposo:** Las dietas HFD inducen un incremento del acúmulo de lípidos en el tejido adiposo epididimal y pardo en animales WT, no siendo así en los p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup>. Secciones de 8  $\mu$ m de tejido adiposo epididimal (A) y pardo (B) fueron cortadas y teñidas con H/E. Todas los cortes fueron examinados al microscopio y las fotos obtenidas con un aumento de 20X. La barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m. Las imágenes fueron cuantificadas y analizadas con el software ImageJ del NIH determinando el área lipídica y el área de tamaño celular. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM. Las diferencias significativas están indicadas como ([\*] p < 0.05, [\*\*] p < 0.01, [\*\*\*] p < 0.001).

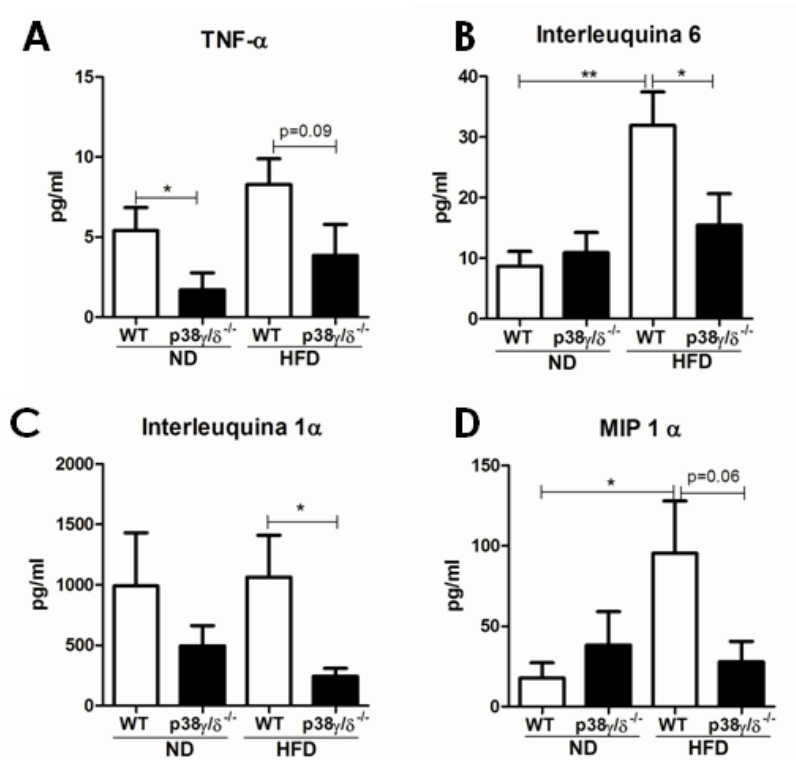


**Fig.35: Cuantificación de citoquinas y adipocinas en tejido adiposo epididimal:** Los niveles de expresión de IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B) y adiponectina (C) de animales WT o p38 $\gamma/\delta$ <sup>-/-</sup> en dietas ND o HFD fueron cuantificados mediante PCR cuantitativa de ADNc obtenido de ARNm de tejido adiposo epididimal. Los niveles de expresión fueron normalizados con los de GAPDH de las mismas muestras. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM (n=10). Las diferencias significativas están indicadas como ([\*] p < 0.05, [\*\*\*] p < 0.001).

### 1.2.7 La carencia de p38 $\gamma/\delta$ protege de la inflamación e infiltración hepática

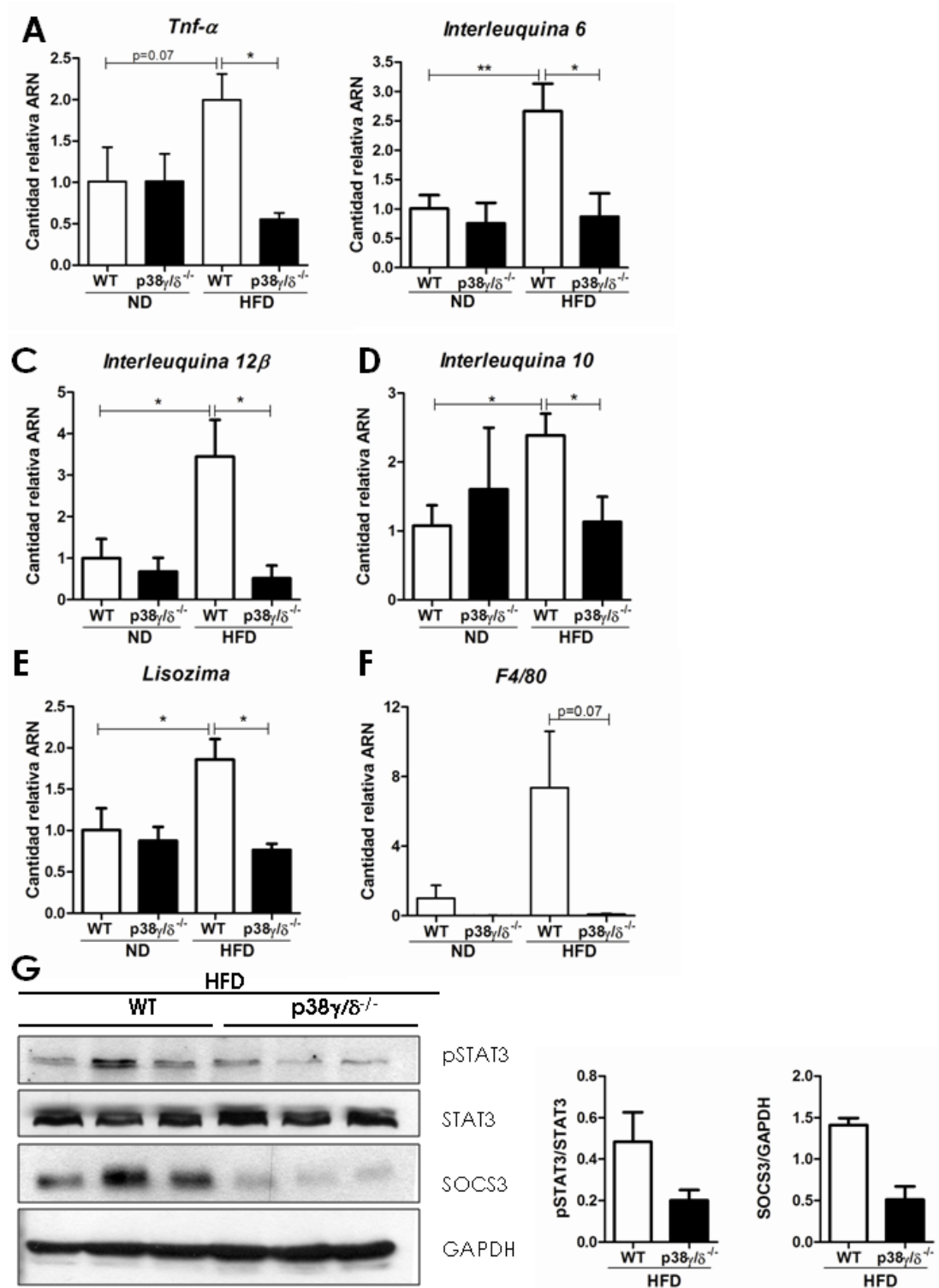
La obesidad es un estado de inflamación crónica que induce el incremento de citoquinas, las cuales pueden ser detectadas tanto en plasma como a nivel de ARN. A nivel plasmático, en HFD se detectaron menores niveles de citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$  y MIP1 $\alpha$  en los animales p38 $\gamma/\delta$ <sup>-/-</sup> respecto a los WT (Fig. 36A, 36B, 36C y 36D). Estos resultados indican que la carencia de estas dos quinasas podrían proteger frente a la inflamación.





**Fig.36: Niveles plasmáticos de citoquinas y quimioquinas: A- D.** Citoquinas y quimioquinas se detectaron en plasma de animales WT y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  tras la dieta ND o HFD. Los valores son expresados en picogramos/ml y los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM (n=10). Las diferencias significativas están indicadas como ([\*] p < 0.05, [\*\*] p < 0.01).

Para estudiar si el hígado estaba protegido frente a la inflamación, se cuantificó la expresión de citoquinas inflamatorias y anti-inflamatorias, así como de marcadores de migración leucocitaria mediante RT-PCR. Nuestros resultados muestran que tras la HFD los niveles de expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 $\beta$ , IL-10 en los hígados de los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  eran más bajos que los que presentaban los animales WT (Fig. 37A, 37B, 37C, 37D). Además, mientras que en los hígados de los animales WT los niveles de los marcadores de la infiltración como la lisozima y el F4/80 aumentaban tras la dieta HFD, este incremento no aparecía en los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  (Fig. 37E, 37F).



**Fig.37: Niveles de expresión de genes proinflamatorios en hígado:** La expresión de genes en hígado de animales WT o p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  en dietas ND o HFD fue cuantificada mediante PCR cuantitativa de ADNc obtenido de ARNm de hígado. Los datos de la expresión de *Tnf- $\alpha$*  (A), *Il-6* (B), *Il-12- $\beta$*  (C), *Il-10* (D), *Lisozima* (E) y *F4/80* (F) se calcularon mediante la normalización de los datos con la cantidad de *Gapdh* por cada muestra. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar (n = 10). Las diferencias significativas entre WT y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ , están indicadas ([\*] p < 0.05, [\*\*] p < 0.01). **G.** Lisados hepáticos de animales WT y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  en HFD fueron analizados mediante western blot. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti pSTAT3, STAT3, SOCS3 y GAPDH, esta último como control de carga.

Se ha descrito que en la obesidad hay una activación crónica del eje JAK-STAT3-SOCS3 debido al aumento de la IL-6 circulante. La activación crónica del eje JAK-STAT3 induce la expresión del regulador negativo de esta vía, SOCS3. Este se une al sustrato del receptor de insulina 1 y 2 facilitando la ubiquitinización y posterior degradación de estas proteínas, lo que lleva a una disminución de la señalización de la insulina por parte del hígado, produciendo resistencia a la insulina[331-333]. Ya que los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  tenían niveles menores de IL-6 tras HFD y estaban protegidos frente a la resistencia a insulina, se quiso estudiar si dicha protección podría estar mediada por la disminución en la IL-6. Para ello, se analizó la vía STAT3-SOCS3 en los lisados hepáticos de estos animales, observando menor fosforilación de STAT3 y menores niveles de proteína de SOCS3 en los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  que en los animales WT en HFD (Fig. 37G). Así, este podría ser el mecanismo por el cual los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  no desarrollan resistencia a la insulina.

### 1.3 $p38\gamma/\delta$ en tejido mieloide

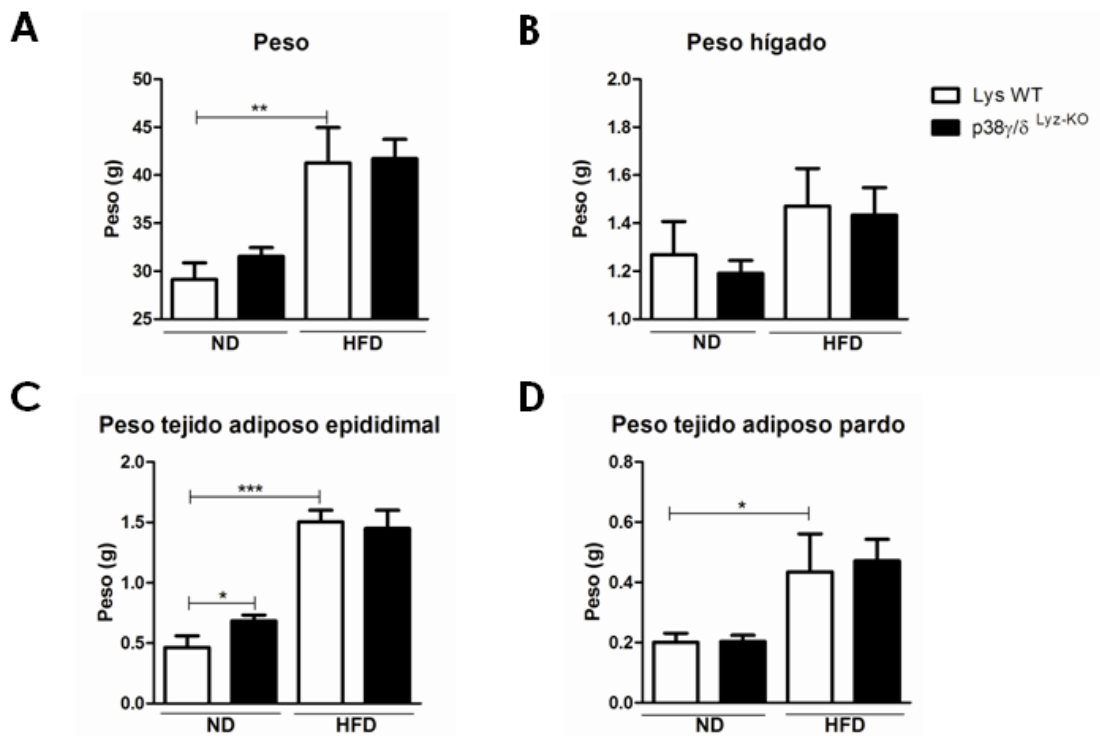
Nuestros resultados indican que la falta de  $p38\gamma$  y  $p38\delta$  protege a los animales del desarrollo de obesidad y enfermedades asociadas. Además, estas quinasas parecen tener un efecto inflamatorio que estaría mediando tanto la resistencia a la insulina en el hígado como la aparición de la esteatosis. Por ello, se decidió ver si la carencia de estas quinasas en el tejido mieloide podría producir la protección necesaria para evitar el desarrollo de la obesidad, diabetes tipo 2 y esteatosis hepática. Por ello, se generaron animales carentes de estas quinasas en tejido mieloide. Ratones condicionales, en los que los genes de  $p38\gamma$  y  $p38\delta$  estaban flanqueados con secuencias flox se cruzaron con la línea transgénica  $Lyzs-cre$  obteniendo animales  $p38\gamma/\delta^{Lyz-KO}$  y los controles  $Lyz-WT$ .

A las 8 semanas de edad, los animales experimentales y control comenzaron la dieta rica en grasa durante 20 semanas. Al final de este periodo se observó que no existían diferencias en el desarrollo de la obesidad inducida por HFD (Fig. 38A, 38B, 38C, 38D, 39D, 39E). Además, no se observó diferencias entre los animales  $p38\gamma/\delta^{Lyz-KO}$  y  $Lyz-WT$  en la actividad locomotora ni en el cociente respiratorio, sin embargo, el gasto energético era mayor en los animales  $p38\gamma/\delta^{Lyz-KO}$  en HFD respecto a los animales WT (Fig. 39A, 39B, 39C).

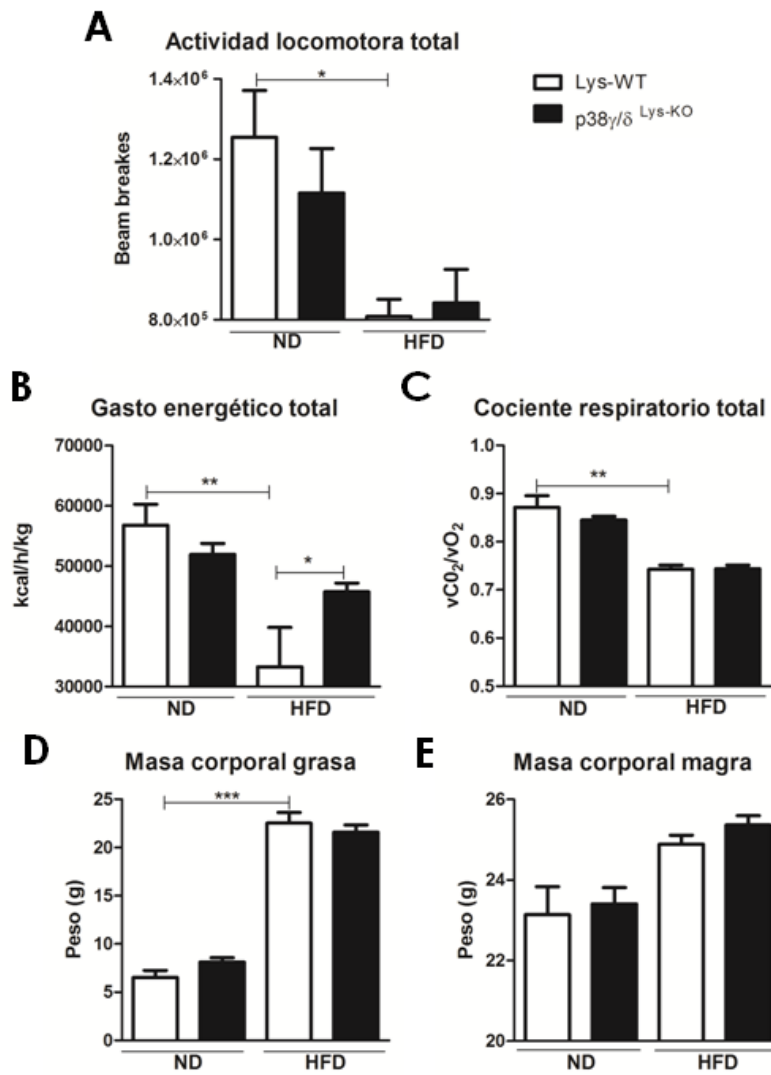
Como se ha mencionado, la obesidad produce un estado inflamatorio crónico que resulta en el desarrollo de resistencia a la insulina y de intolerancia a la glucosa. Para determinar si la falta de  $p38\gamma$  y  $p38\delta$  en tejido mieloide podría tener un efecto en

el desarrollo de la diabetes se realizaron las pruebas de GTT e ITT en estos animales. Mientras no existían diferencias en ND entre genotipos, en HFD los animales  $p38\gamma/\delta^{Lyz-KO}$  eran más tolerantes a la glucosa que los animales Lys-WT (Fig. 40A). Además, los niveles basales de glucosa en ND y HFD eran menores en los animales  $p38\gamma/\delta^{Lyz-KO}$  que en los animales Lys-WT (Fig. 40B). Sin embargo, tanto los Lys-WT como los  $p38\gamma/\delta^{Lyz-KO}$  eran resistentes a la insulina después de la HFD (Fig. 40C).

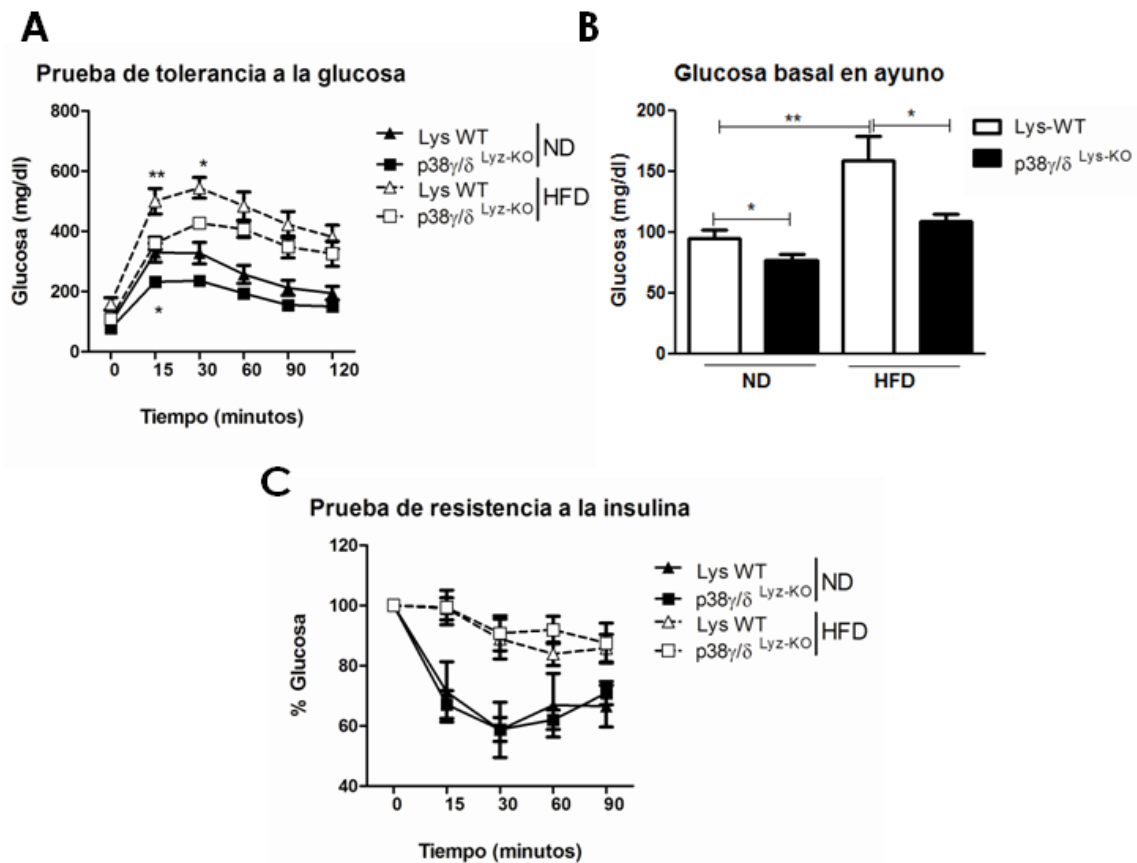
Como resumen, podemos decir que los animales  $p38\gamma/\delta^{Lyz-KO}$  presentan protección frente al desarrollo de intolerancia a la glucosa en HFD, sin embargo no están protegidos de la obesidad. Esto podría explicarse porque la carencia de estas quinasas solo en tejido mieloide no logra mimetizar el fenotipo de knock-out total, ya que los efectos de la ausencia de  $p38\gamma$  y  $p38\delta$  solo se verían en los tejidos susceptibles a los efectos de la inflamación por obesidad.



**Fig.38: Caracterización corporal de animales Lyz-WT y  $p38\gamma/\delta^{Lyz-KO}$ :** A-D. Animales Lyz-WT y  $p38\gamma/\delta^{Lyz-KO}$  tras 20 semanas en dieta ND o HFD se pesaron, así como sus tejidos post-mortem. Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 10$ ). Diferencias significativas entre Lyz-WT y  $p38\gamma/\delta^{Lyz-KO}$  están indicadas ([\*]  $p < 0.05$ , [\*\*]  $p < 0.01$ , [\*\*\*]  $p < 0.001$ ).



**Fig.39: Comparación del balance energético entre Lys-WT y p38 $\gamma/\delta$ <sup>Lys-KO</sup>:** Los ratones fueron analizados durante 48 horas en cajas metabólicas. **A.** Actividad física. **B.** Gasto energético. **C.** cociente respiratorio. **D y E.** Se cuantificó la masa corporal grasa y la masa corporal magra mediante resonancia magnética. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM. Las diferencias significativas están indicadas como ([\*]  $p < 0.05$ , [\*\*]  $p < 0.01$ , [\*\*\*]  $p < 0.001$ ).



**Fig.40: Niveles de glucosa en ratones Lyz-WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lyz-KO</sup>:** A Ratones macho Lyz-WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lyz-KO</sup> alimentados durante 20 semanas con ND o HFD se les realizó la prueba de tolerancia a la glucosa inyectando i.p. glucosa (1 g/kg) (A), se les midió los niveles de glucosa basal (B) y se les realizó la prueba de resistencia a la insulina inyectando i.p. insulina (0.75 U/kg) (C). Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (n = 10). Las diferencias significativas entre Lyz-WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lyz-KO</sup> están indicadas ([\*] p < 0.05, [\*\*] p < 0.01)

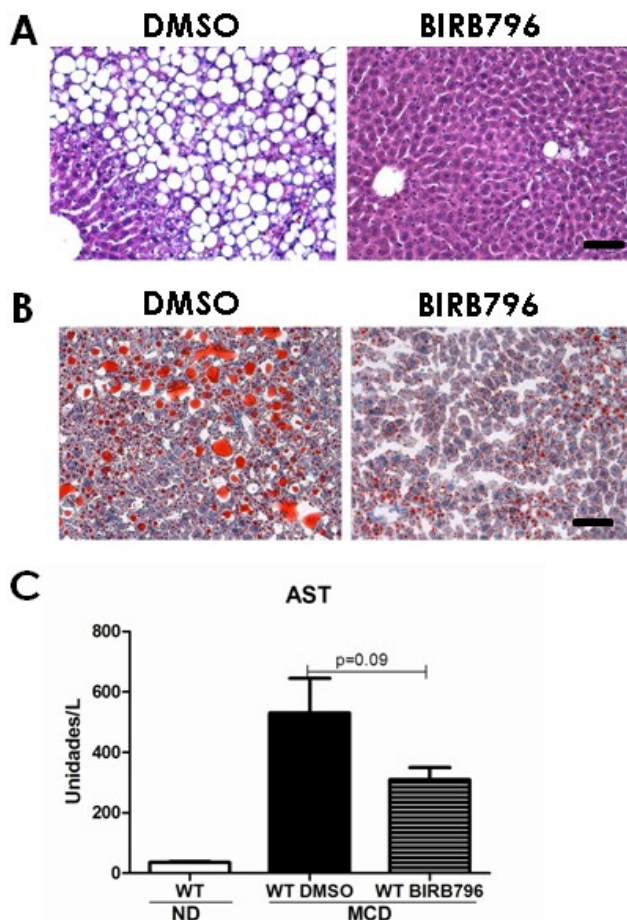
## 2. Modelos animales en dietas carentes de metionina y colina (MCD)

### 2.1 La inhibición de las p38 MAPKs reduce la esteatosis hepática y el daño hepático por MCD

En 1980, Ludwig definió el termino NASH (esteatohepatitis no alcohólica) en un estudio en pacientes con problemas hepáticos, en el cual se describía que las biopsias de dichos pacientes mostraban características relacionadas con un alto consumo de alcohol, pero sin existir un exceso en la ingesta del mismo. La mayoría eran obesos (90%), con hiperlipidemia y DM2, siendo además el 60% mujeres [112]. Hoy se sabe que

la esteatosis hepática es la enfermedad hepática más común y extendida en el mundo, debido en gran parte a los cambios en la dieta y el sedentarismo, por lo que estudiar el mecanismo molecular por el que se produce resulta de gran importancia. Para ello, en esta tesis se ha utilizado una dieta carente en metionina y colina (MCD) que induce esteatosis hepática sin incrementar el peso.

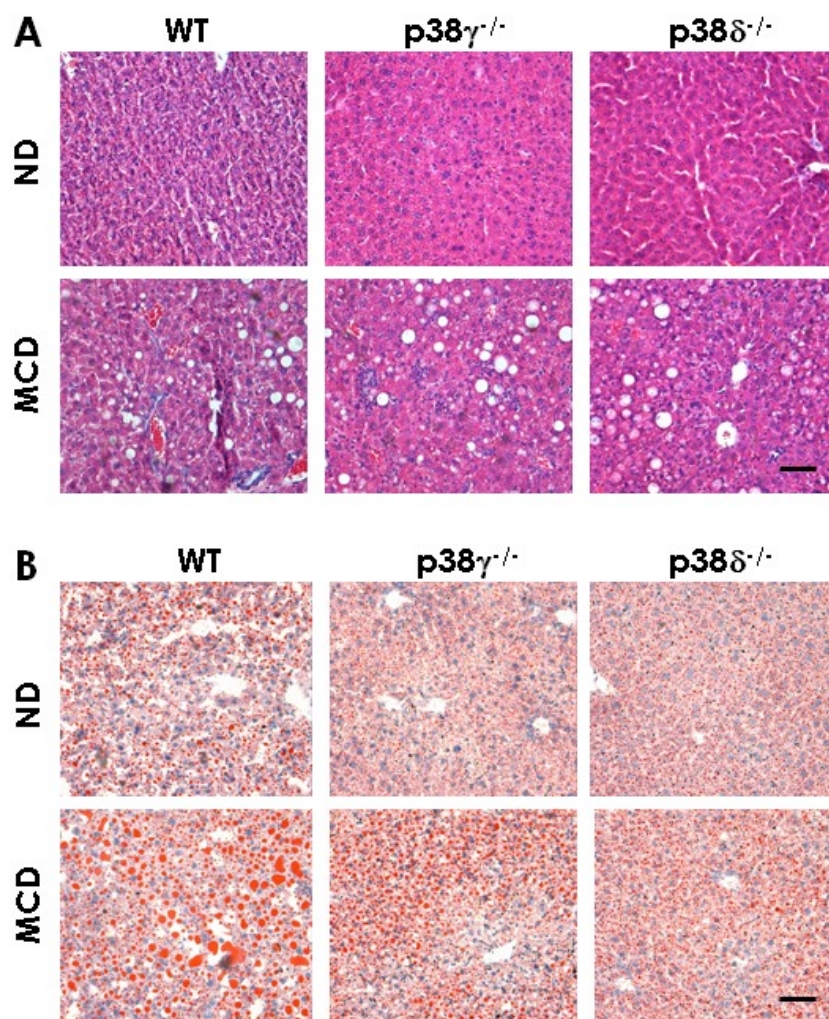
Para estudiar el papel de las p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  en la producción de la esteatosis hepática en primer lugar se utilizó un inhibidor de las p38. Aunque actualmente no existen inhibidores específicos de las quinasa p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ , el uso del doramapimod o BIRB796 (un inhibidor de todas las isoformas de las p38MAPK) podría ayudar a explicar si la carencia de las p38MAPK podría proteger frente al desarrollo de la esteatosis hepática. Así, se inyectaron animales WT con BIRB796 o con DMSO como control y se alimentaron con la dieta MCD *ad-libidum* durante 21 días. Cortes histológicos de hígado de estos animales fueron teñidos por H/E y oil red, comprobando que la inhibición de las p38MAPK en los animales inyectados con BIRB796, protegía frente a la esteatosis (Fig. 41A y 41B). Además, los animales inyectados con BIRB796 tenían menores niveles de AST que los inyectados con DMSO tras la dieta MCD (Fig. 41C).



**Fig.41: Determinación del nivel de esteatosis hepática:** **A.** Secciones de 8  $\mu$ m de tejido hepático de animales WT inyectados con inhibidor BIRB796 o DMSO en dieta MCD se cortaron y se tiñeron con H/E para detectar el grado de esteatosis hepática. **B.** Secciones de tejido hepático congelado en O.C. T se cortaron a 12  $\mu$ m y se tiñeron con oil red. Las fotografías de A y B fueron tomadas a un aumento de 20X y la barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m. **C.** Los niveles de AST se cuantificaron en el plasma de animales WT en ND y WT MCD inyectados con BIRB796 o DMSO. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM (n=10).

## 2.2 La carencia de p38 $\gamma$ y p38 $\delta$ no protege del desarrollo de la esteatosis hepática

Como se había observado que la inhibición de las p38 podía proteger del desarrollo de la esteatosis hepática, se decidió estudiar el desarrollo de esta enfermedad en animales carentes de las quinasas p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  alimentados con la dieta MCD durante 4 semanas.

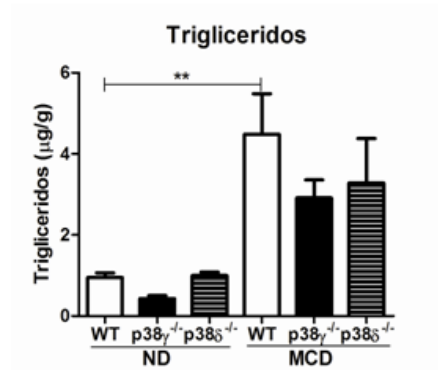


**Fig.42: Esteatosis hepática de animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>, p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> y WT: A.** Secciones de 8  $\mu$ m de tejido hepático de animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>, p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> y WT en dietas MCD o ND se cortaron y se tiñeron con H/E para detectar el grado de esteatosis hepática. **B.** Secciones de 12  $\mu$ m de tejido hepático congelado en O.C.T. Se cortaron y se tiñeron con oil red. Las fotografías de A y B fueron tomadas a un aumento de 20X, mientras que la barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m.

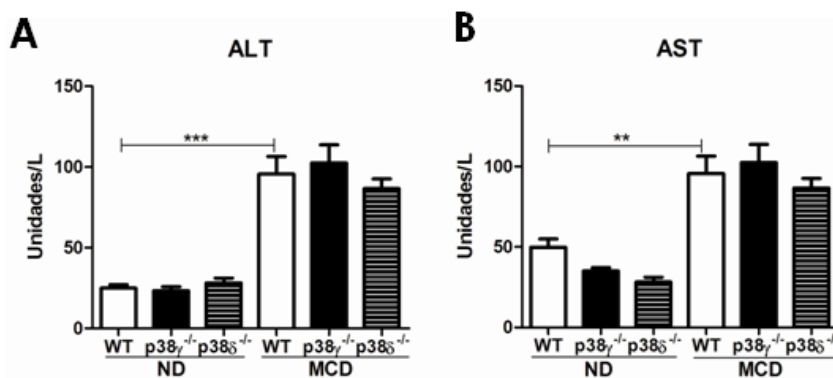
Tras este periodo, se observó que los hígados de los animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> y p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> alimentados con la dieta MCD, desarrollaban esteatosis hepática al igual que los animales WT (Fig. 42A, 42B). Para corroborarlo, se cuantificaron los lípidos hepáticos, no observando diferencias significativas en los niveles de triglicéridos entre genotipos



(Fig. 43). Asimismo, se analizó el grado de necrosis hepática midiendo los niveles de transaminasas en plasma, no observándose tampoco diferencias entre los animales de distinto genotipo (Fig. 44).



**Fig.43: Cuantificación de triglicéridos hepáticos de animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>, p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> y WT:** El total de triglicéridos hepáticos se cuantificó de hígados de animales WT, p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> y p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> tras un ayuno de 16 horas. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM. Las diferencias significativas se indican ([\*\*]  $p < 0.01$ ).



**Fig.44: Nivel de daño hepático en animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>, p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> y WT:** Los niveles de las transaminasas hepáticas ALT (A) y AST (B) se cuantificaron en el plasma de animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>, p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> y WT alimentados con ND o MCD. Los resultados se representan como media  $\pm$  error estándar de la media SEM ( $n = 10$ ). Las diferencias significativas se indican ([\*\*]  $p < 0.01$ , [\*\*\*]  $p < 0.001$ ).

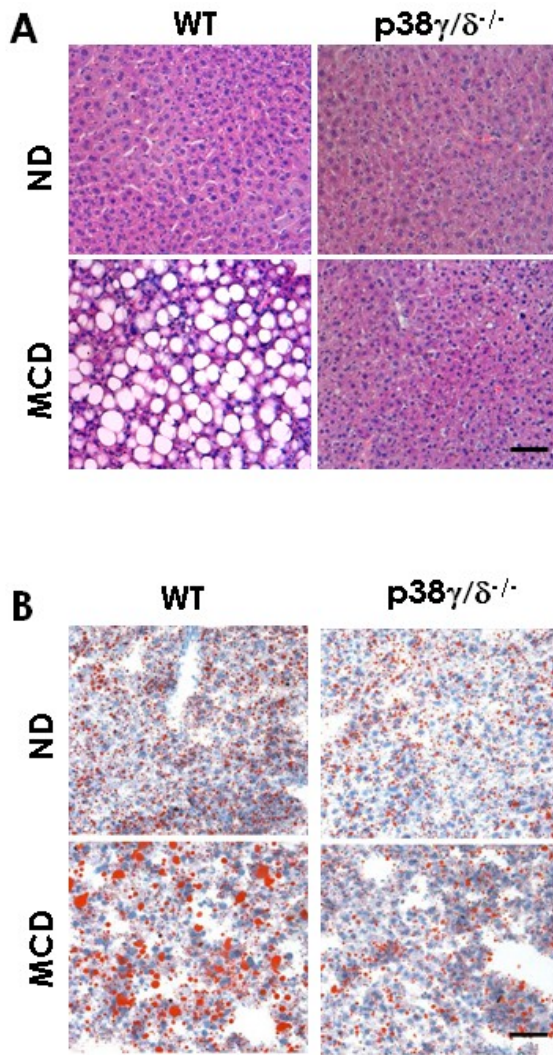
## 2.3 Papel de las p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>-/-</sup> en el desarrollo de esteatosis hepática inducida por MCD

### 2.3.1 La carencia de p38 $\gamma$ / $\delta$ protege del desarrollo de esteatosis hepática

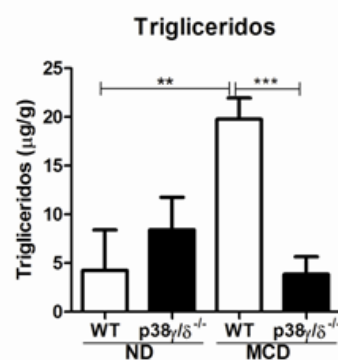
Nuestros resultados indican que p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  por sí solas no protegen frente a la esteatosis hepática, aunque disminuyen parcialmente la infiltración e inflamación

hepática. Por ello, se decidió estudiar si esta protección era mayor en los animales doble *knock-out* de estas quinasas.

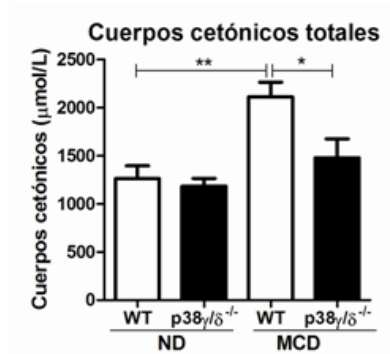
Ratones de 8 semanas de edad, se trataron con dieta MCD durante cuatro semanas. Tras este periodo, se analizaron las muestras de hígado, comprobando que los animales WT desarrollaban esteatosis hepática, pero que, sin embargo los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  presentaban protección frente al desarrollo de esta enfermedad (Fig. 45A y 45B). Para corroborarlo, se cuantificaron los triglicéridos hepáticos advirtiéndose que en dietas normales no existían diferencias entre los grupos (Fig. 46). Sin embargo, tras la dieta MCD, los animales WT aumentaron sus niveles de triglicéridos, siendo menores en los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  (Fig. 46). Por lo tanto, la carencia de  $p38\gamma$  y  $p38\delta$  protegería frente a la esteatosis. El exceso de triglicéridos en hígado induce un incremento de la  $\beta$ -oxidación y de la producción de cuerpos cetónicos, por ello se analizaron los niveles de los mismos. No se observaron diferencias entre ambos genotipos con dieta ND, pero tras la dieta MCD los animales WT presentaban un incremento de los niveles de cuerpos cetónicos totales, siendo estos niveles significativamente más bajos en los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  (Fig. 47).



**Fig.45: Nivel de esteatosis hepática tras dietas MCD:** **A.** Secciones de 8  $\mu\text{m}$  de tejido hepático de animales  $\text{p38}\gamma^{-/-}$ ,  $\text{p38}\delta^{-/-}$  y WT en dietas MCD o ND se cortaron y se tiñeron con H/E para detectar el grado de esteatosis hepática. **B.** Secciones de 12  $\mu\text{m}$  de tejido hepático congelado en O.C.T. Se cortaron y se tiñeron con oil red. Las fotografías de A y B fueron tomadas a un aumento de 20X, mientras que la barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

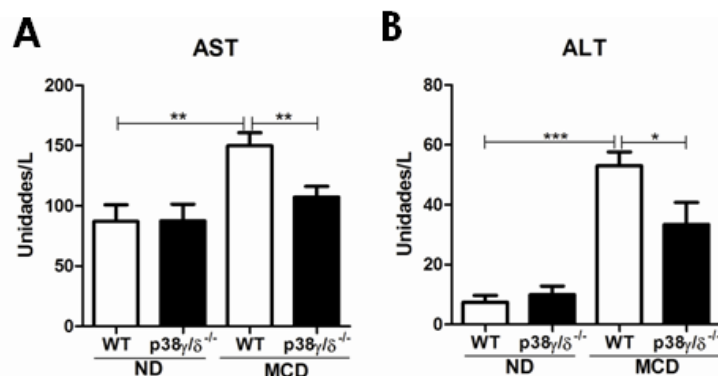


**Fig.46: Análisis de triglicéridos:** El total de triglicéridos hepáticos se midió de animales WT y  $\text{p38}\gamma/\delta^{-/-}$  en dietas ND o MCD, tras un ayuno de 16 horas. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM. Las diferencias significativas están indicadas como ([\*]  $p < 0.05$  [\*\*]  $p < 0.01$ , [\*\*\*]  $p < 0.001$ ).



**Fig.47: Cuantificación de cuerpos cetónicos:** Los niveles de cuerpos cetónicos se cuantificaron en el plasma de animales WT y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  en dietas ND o MCD. Los datos están representados como la media  $\pm$  error estándar de la media SEM. Las diferencias significativas están indicadas como [\*]  $p < 0.05$  [\*\*]  $p < 0.01$ , [\*\*\*]  $p < 0.001$ ).

También se estudió el nivel de necrosis midiendo las transaminasas hepáticas observando que, mientras en ND no existían diferencias entre los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  y WT, en MCD la AST y ALT fueron significativamente más bajas en los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  respecto a los WT (Fig. 48A y 48B). Estos resultados indican que la carencia de las p38 $\gamma/\delta$  tendría un efecto protector frente a la esteatosis, daño hepático y la necrosis.



**Fig.48: Determinación del nivel de necrosis hepática en animales WT y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  :A y B.** Los niveles de transaminasas hepáticas se cuantificaron en plasma de animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ , y WT alimentados con ND o MCD. Los resultados son representados como la media  $\pm$  error estándar;  $n = 10$ . Diferencias significativas entre WT y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  están indicadas [\*]  $p < 0.05$ , [\*\*]  $p < 0.01$ , [\*\*\*]  $p < 0.001$ ).

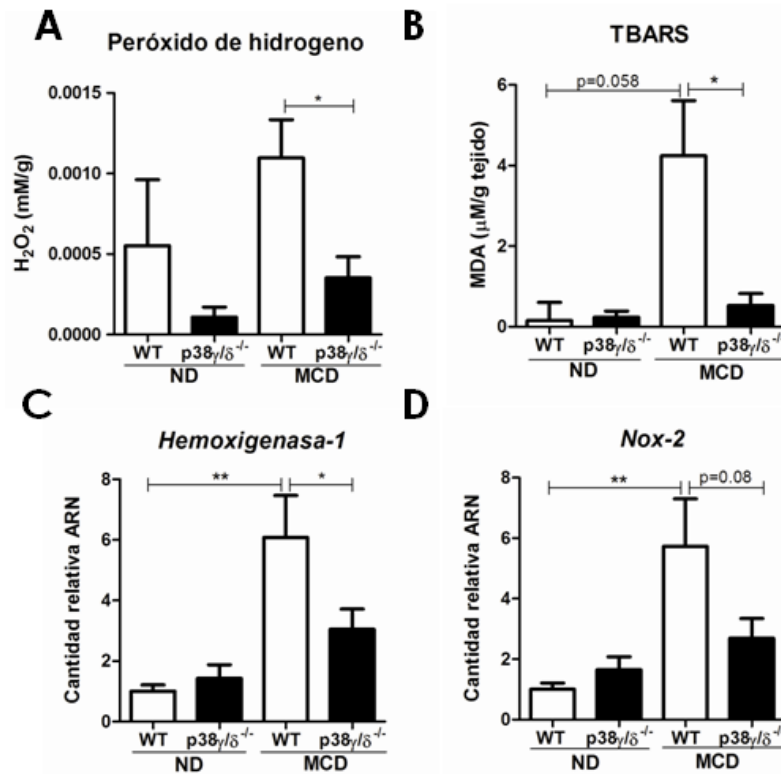
### 2.3.2 p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ tienen un menor grado de estrés oxidativo y peroxidación de lípidos

La  $\beta$ -oxidación mitocondrial es la principal ruta de oxidación de ácidos grasos. Sin embargo, en un hepatocito esteatótico con mitocondrias disfuncionales, una gran parte de los ácidos grasos se procesan por los sistemas oxidativos peroxisomal y

microsomal, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS), como por ejemplo el peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ . El aumento de ROS produce un incremento en la peroxidación de lípidos, la cual genera como producto final aldehídos reactivos que incrementan el daño oxidativo y que a la larga incrementan el daño hepático. Para analizar los niveles especies reactivas en hígado, se cuantificaron los niveles de  $H_2O_2$  hepáticos en animales con dietas control, tras los cual se observó que dichos niveles eran bajos en ambos genotipos. Sin embargo, tras la dieta MCD estos niveles aumentaron en los animales WT debido al exceso de lípidos y daño hepático, mientras que este aumento fue menor en los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  (Fig. 49A).

Asimismo, para cuantificar la peroxidación lipídica, se analizaron los niveles de malondialdehído, el cual es un producto de la peroxidación lipídica. Para ello realizamos la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) tras la cual se observó que en ND no existían diferencias entre genotipos, pero que sin embargo, en MCD los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  presentaban niveles más bajos de MDA que los animales WT (Fig. 49B). Estos resultados indican que la carencia de estas quinasas protege de la peroxidación lipídica respecto a los animales WT.

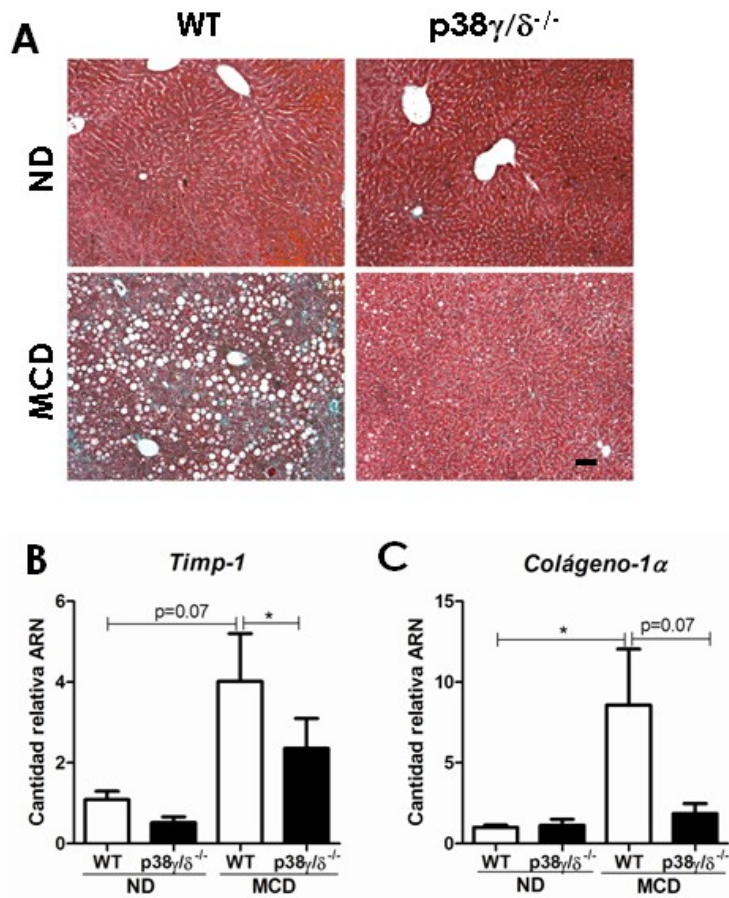
Para poder profundizar más en estos hallazgos, se analizó la expresión de genes involucrados en el estrés oxidativo, observando una reducción de NOX2 y de hemoxigenasa en los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  respecto los WT en MCD (Fig. 49C, 49D). Todo esto indica que la carencia de  $p38\gamma$  y  $p38\delta$  protege del daño producido por el estrés oxidativo.



**Fig.49: Determinación del nivel de estrés oxidativo en hígado de animales WT y p38γ/δ<sup>-/-</sup>:** **A.** La peroxidación lipídica **(A)** y los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> **(B)** fueron cuantificados a partir de lisados hepáticos obtenidos de animales WT y p38γ/δ<sup>-/-</sup> alimentados con ND o MCD. **C y D.** Los niveles de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, se analizaron a partir de ADNC obtenido de ARNm de hígado de animales WT y p38γ/δ<sup>-/-</sup> alimentados con dietas ND o MCD. Los genes Hemoxigenasa 1 y Nox-2 se normalizaron con los niveles de GAPDH de las propias muestras. Los resultados se representan como media ± error estándar de la media SEM (n = 10). Las diferencias significativas entre WT y p38γ/δ<sup>-/-</sup>, están indicadas ([\*] p < 0.05, [\*\*] p < 0.01).

### 2.3.3 La carencia de p38γ/δ favorece la protección frente al desarrollo de fibrosis hepática tras MCD

Una de las posibles consecuencias de la esteatosis hepática es el desarrollo de cirrosis, en la cual el hígado al ser incapaz de regenerar las áreas dañadas, reemplaza el tejido normal por tejido conectivo. Como consecuencia, el hígado pierde gran parte de su funcionalidad. Como se muestra en la tinción tricrómica de Masson (Fig. 50A), los hígados de los animales WT tras la MCD poseen fibras de tejido conectivo insertas en el parénquima hepático, mientras que estas fibras son casi imperceptibles en los animales p38γ/δ<sup>-/-</sup>. Para corroborar estos resultados se analizaron marcadores conocidos de fibrosis como son el colágeno 1α y el Timp-1. Estos marcadores aumentaron en los animales WT tras la dieta MCD, mientras que este aumento fue menos pronunciado en los animales p38γ/δ<sup>-/-</sup> con la misma dieta (Fig. 50B).

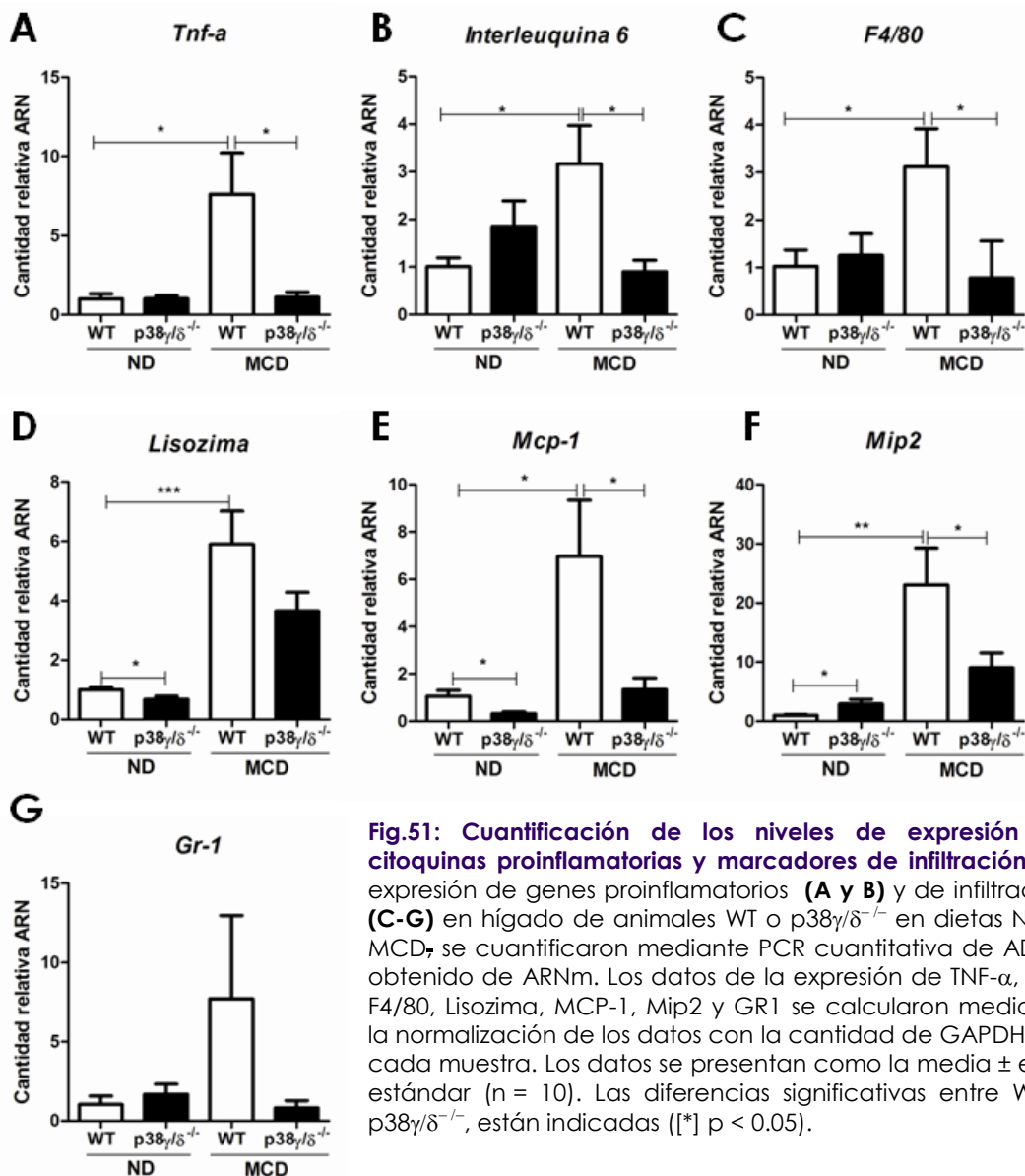


**Fig.50: Determinación del nivel de fibrosis hepática:** La fibrosis hepática se produce como consecuencia de la esteatohepatitis inducida por dietas MCD en animales WT, no así en los p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ . **A.** Secciones de 5  $\mu\text{m}$  de hígado se cortaron y se tiñeron con tricrómica de Masson, que permite ver las fibras de colágeno. Todos los cortes fueron examinados al microscopio, las fotos obtenidas con un aumento de 10X y la barra de escala corresponde a 60  $\mu\text{m}$ . **B y C.** Los niveles de expresión de TIMP-1 y colágeno tipo 1- $\alpha$  se cuantificaron mediante PCR cuantitativa. Los valores de expresión se normalizaron con los niveles de GAPDH de cada muestra. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar (n = 10). Las diferencias significativas están indicadas como ([\*] p < 0.05).

### 2.3.4 la carencia de p38 $\gamma/\delta$ disminuye la inflamación e infiltración del hígado

La esteatosis hepática, la necrosis y la peroxidación de lípidos inducen un estado inflamatorio en el hígado. Para estudiarlo analizamos los niveles de ARNm de marcadores de inflamación como TNF- $\alpha$  e IL-6 (Fig. 51A y 51B) y de infiltración como F4/80, Lisozima, MCP-1, Mip-2 y GR1 (Fig. 51C, 51D, 51E, 51F, 51G). En los animales alimentados con dietas control, los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 fueron bajos o imperceptibles, no existiendo diferencias entre los grupos. En cambio, tras la MCD, estas citoquinas aumentaron significativamente su nivel de expresión en los animales

WT, mientras que los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  presentaron niveles de expresión más bajos, lo que indicaría que estaban protegidos frente a la inflamación inducida por la dieta MCD. Asimismo, los niveles de F4/80, lisozima, MCP-1 y Mip2 aumentaron significativamente su nivel de expresión en los animales WT tras ser alimentados con dieta MCD. En cambio observamos que los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  presentaron niveles de expresión de F4/80, MCP-1 y Mip2 significativamente menores respecto a los animales WT tras la dieta MCD.



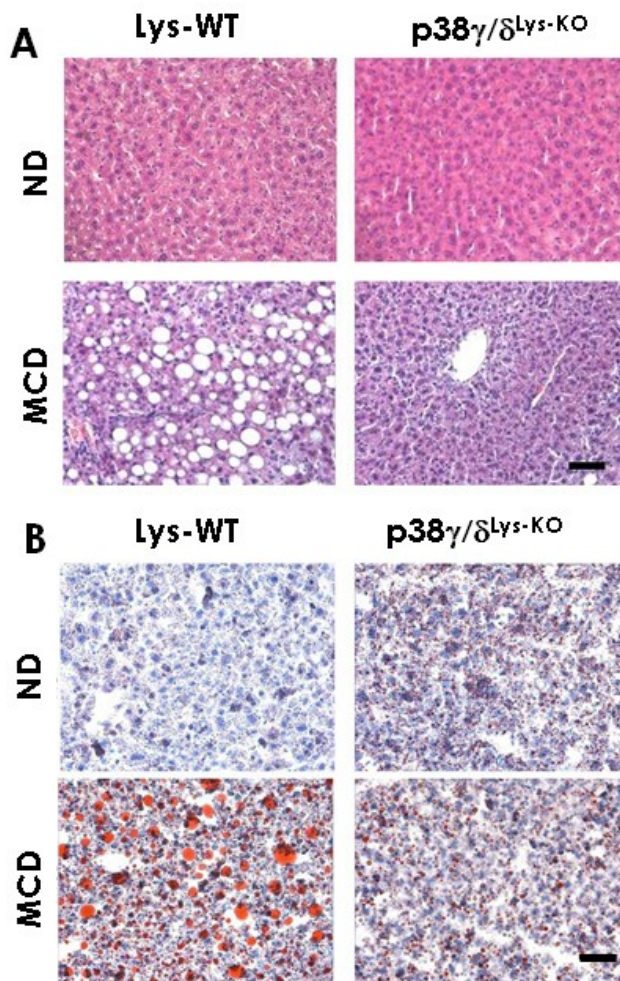
**Fig.51: Cuantificación de los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias y marcadores de infiltración:** La expresión de genes proinflamatorios (**A y B**) y de infiltración (**C-G**) en hígado de animales WT o  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  en dietas ND o MCD, se cuantificaron mediante PCR cuantitativa de ADNc obtenido de ARNm. Los datos de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6, F4/80, Lisozima, MCP-1, Mip2 y GR1 se calcularon mediante la normalización de los datos con la cantidad de GAPDH por cada muestra. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar (n = 10). Las diferencias significativas entre WT y  $p38\gamma/\delta^{-/-}$ , están indicadas ([\*] p < 0.05).



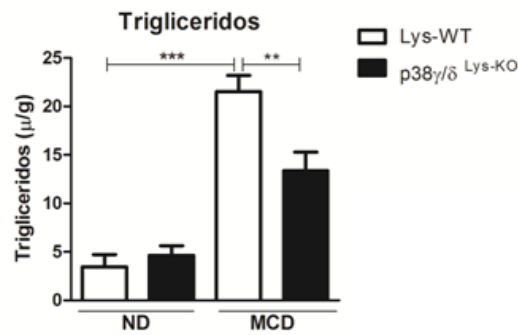
## 2.4 La carencia de p38 $\gamma/\delta$ en tejido mieloide protege del desarrollo de esteatosis hepática

Nuestro grupo recientemente ha demostrado que p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  participan en la producción de las citoquinas inflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  por células mieloides[242]. Por ello y a la vista de nuestros resultados con los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  en MCD, se decidió determinar qué papel tenían p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  en células mieloides en el desarrollo de la esteatosis. Así, se alimentaron animales Lys-WT y p38 $\gamma/\delta^{Lyz-KO}$  con dieta MCD y se estudió el desarrollo de la enfermedad.

Mediante histología se observó que, mientras en ND los animales de ambos genotipos tenían una morfología hepática normal, la esteatosis que aparecía en los animales Lys-WT tras la dieta MCD, estaba reducida en los animales p38 $\gamma/\delta^{Lyz-KO}$  (Fig. 52A). Estos resultados en los animales p38 $\gamma/\delta^{Lyz-KO}$  fueron corroborados mediante la tinción de oil red (Fig. 52B). Además, se cuantificaron los triglicéridos hepáticos observándose que los animales p38 $\gamma/\delta^{Lyz-KO}$  almacenaban menos triglicéridos que los Lys-WT en MCD (Fig. 53).



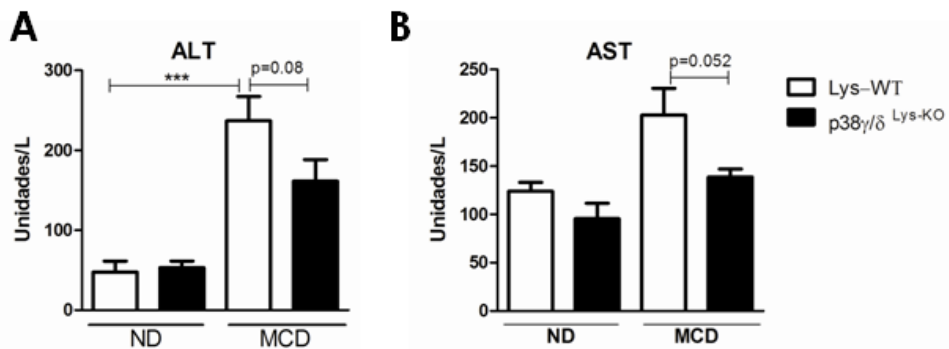
**Fig.52: Determinación del nivel de esteatosis hepática en animales condicionales de tejido mieloide: A.** Secciones de 8  $\mu$ m de tejido hepático de animales p38 $\gamma^{-/-}$ , p38 $\delta^{-/-}$  y WT en dietas MCD o ND se cortaron y se tiñeron con H/E para detectar el grado de esteatosis hepática. **B.** Tejido hepático congelado en O.C.T de animales Lys-WT y p38 $\gamma/\delta^{Lyz-KO}$  en dietas ND y MCD, se cortó en secciones de 12  $\mu$ m y se tiñó con oil red. Las fotografías de **A y B** fueron tomadas a un aumento de 20X, mientras que la barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m.



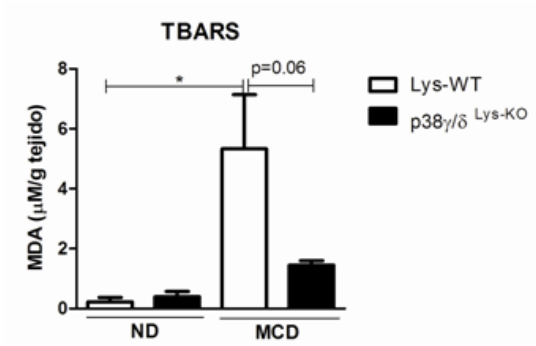
**Fig.53: Cuantificación de triglicéridos hepáticos:** Los niveles de triglicéridos se analizaron a partir de hígado de animales Lys-WT y p38γ/δ<sup>Lys-KO</sup> en dietas ND y MCD. Los datos son representados como la media ± error estándar de la media SEM (n=10). Las diferencias significativas están indicadas como ([\*\*] p < 0.01, [\*\*\*] p < 0.001).

Para determinar si la menor esteatosis que tenían los p38γ/δ<sup>Lys-KO</sup> correspondía con un menor grado de necrosis hepática, se midieron los niveles plasmáticos de las transaminasas. Tras la dieta MCD, los animales p38γ/δ<sup>Lys-KO</sup> tenían menores niveles de ALT respecto al Lys-WT y una tendencia a la disminución de los niveles plasmáticos de AST (Fig. 54A, 54B). Estos datos indicarían que la carencia de estas quinasas en la línea mieloide protegería contra la necrosis hepática.

Además, se quiso estudiar si el menor acúmulo de triglicéridos hepáticos resultaba en una menor peroxidación de lípidos. Para ello, se realizó la prueba de TBARS. Mientras en ND no se observaron diferencias entre los genotipos, en MCD los animales p38γ/δ<sup>Lys-KO</sup> presentaban menores niveles de peroxidación lipídica que los animales Lys-WT (Fig. 55).



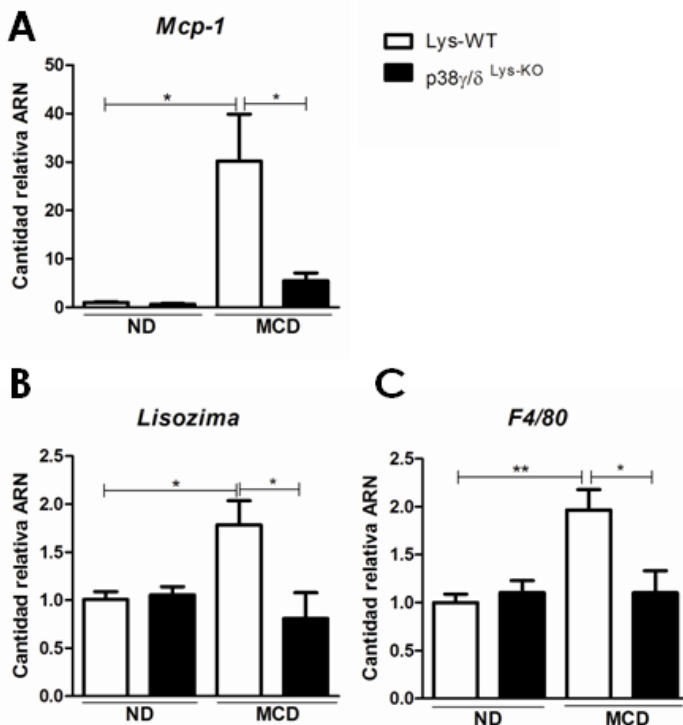
**Fig.54: Determinación del daño hepático en animales Lys-WT y p38γ/δ<sup>Lys-KO</sup>:** Las transaminasas hepáticas ALT (A) y AST (B) se cuantificaron en plasma de animales Lys-WT y p38γ/δ<sup>Lys-KO</sup> alimentados con ND o MCD. Los resultados se representan como media ± error estándar de la media SEM (n = 10). Las diferencias significativas entre Lys-WT y p38γ/δ<sup>Lys-KO</sup> están indicadas ([\*] p < 0.05, [\*\*\*] p < 0.001).



**Fig.55: Niveles de peroxidación lipídica en hígado de animales Lys-WT y p38 $\gamma/\delta$ <sup>Lys-KO</sup>:** Los niveles de MDA se cuantificaron a partir de lisados hepáticos obtenidos de animales Lys-WT y p38 $\gamma/\delta$ <sup>Lys-KO</sup> alimentados con ND o MCD. Los resultados se representan como media  $\pm$  error estándar de la media SEM (n = 10). Las diferencias significativas están indicadas ([\*] p < 0.05).

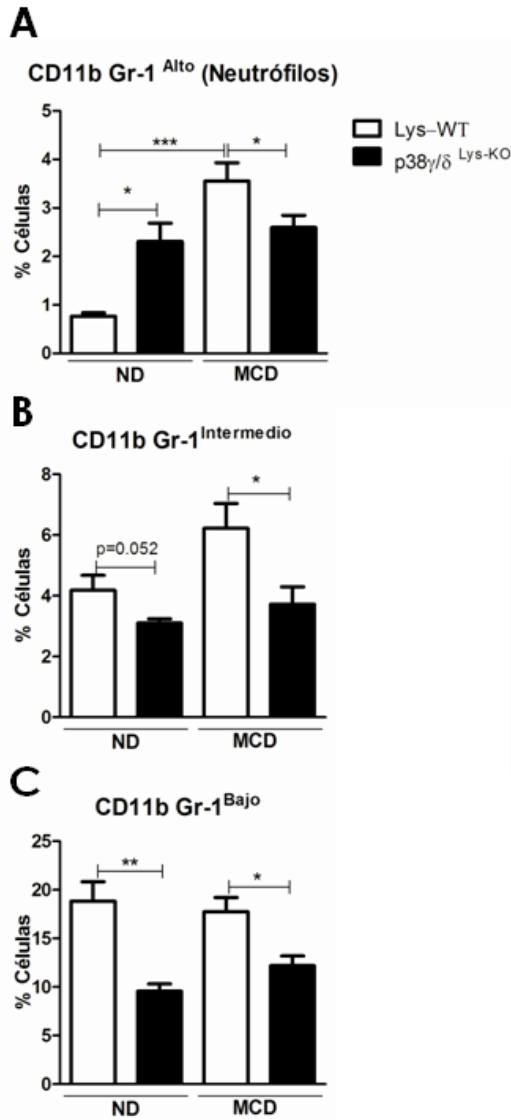
### 2.4.1 Los animales p38 $\gamma/\delta$ <sup>Lys-KO</sup> poseen menos infiltración hepática tras MCD

Para estudiar el papel de estas quinasas en la infiltración, cuantificamos la expresión de genes relacionados con este fenómeno en hígado. Se observó que mientras no se evidenciaban diferencias en ND en la expresión de genes de infiltración como MCP-1, lisozima y F4/80, estos estaban aumentados en ratones Lys-WT en MCD, los cuales fueron significativamente menores en los animales p38 $\gamma/\delta$ <sup>Lys-KO</sup> (Fig. 56A, 56B, 56C).



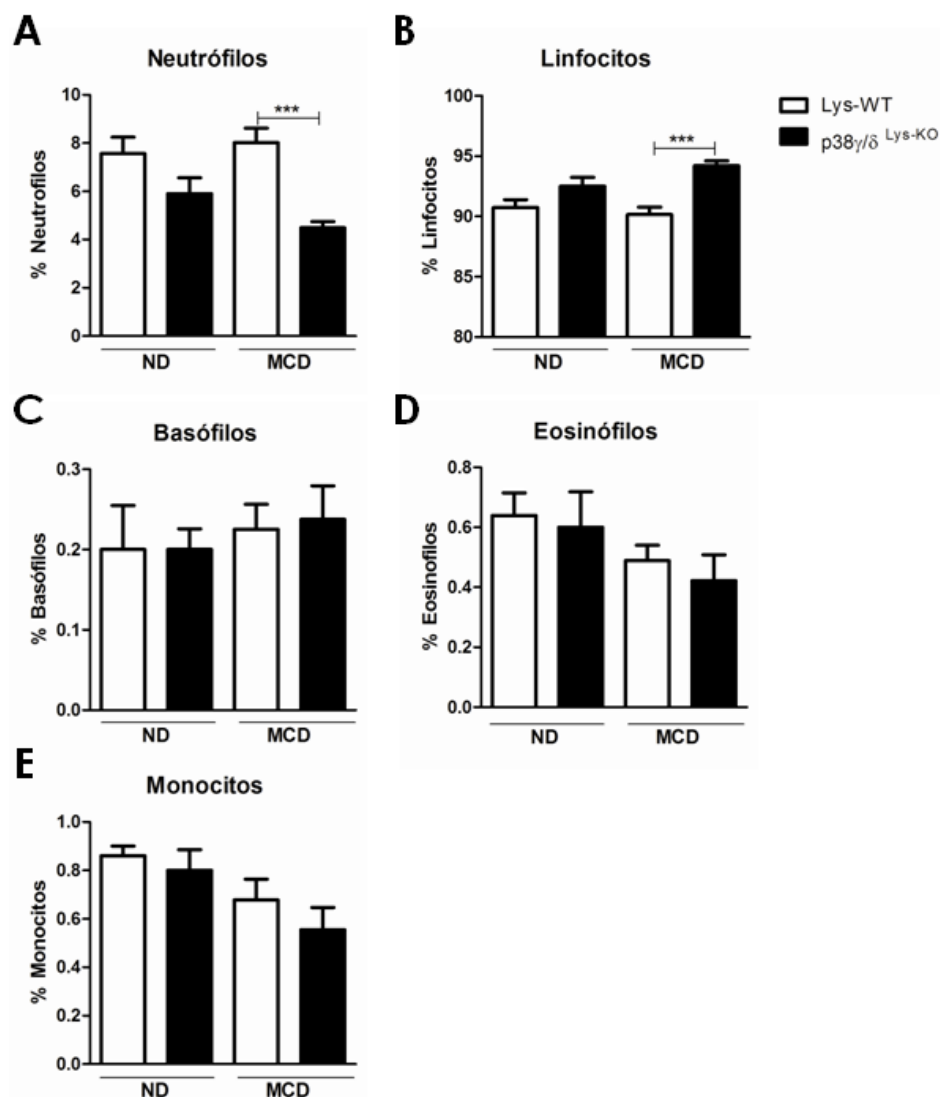
**Fig.56: Niveles de expresión de genes de infiltración:** La expresión de genes se cuantificaron en de hígado de animales Lys-WT y p38 $\gamma/\delta$ <sup>Lys-KO</sup> en dietas ND o MCD mediante PCR cuantitativa de ADNc obtenido de ARNm de hígado. Los resultados de la expresión de MCP-1 (A), Lisozima (B) y F4/80 (C) se calcularon mediante la normalización de los datos con la cantidad de GAPDH por cada muestra. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar (n = 10). Las diferencias significativas entre Lys-WT y p38 $\gamma/\delta$ <sup>Lys-KO</sup> están indicadas ([\*] p < 0.05, [\*\*] p < 0.01).

Para estudiar la infiltración de estos animales, se analizaron las poblaciones leucocitarias en el tejido hepático mediante citometría de flujo. Para ello utilizamos un doble marcaje con anticuerpos anti-Gr-1 y anti-CD11b para diferenciar células de origen mieloide. Gr-1 se expresa en monocitos, neutrófilos, subgrupos de macrófagos, células dendríticas, y células T, siendo en la periferia un marcador útil de neutrófilos. CD11b se expresa predominantemente en monocitos, macrófagos, células NK y granulocitos. Este marcaje nos permitió seleccionar a los leucocitos CD11b+, de los cuales obtuvimos tres subpoblaciones: Los leucocitos CD11b+Gr-1<sup>Alto</sup> que corresponden a neutrófilos y los C11b+Gr-1<sup>Intermedio</sup> y CD11b+Gr-1<sup>Bajo</sup> que corresponden a monocitos y macrófagos. Al realizar el marcaje descrito en hígados de animales Lys-WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lyz-KO</sup> en dieta ND o MCD observamos que la infiltración de neutrófilos (CD11b+Gr-1<sup>Alto</sup>) inicialmente era mayor en los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lyz-KO</sup> que los Lys-WT en ND, pero que esta diferencia se perdía en MCD, teniendo los Lys-WT mayores niveles de infiltración que los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lyz-KO</sup> (Fig. 57A). Por otro lado, observamos también menor infiltración de leucocitos correspondiente tanto a C11b+Gr-1<sup>Intermedio</sup> como en CD11b+Gr-1<sup>Bajo</sup> en los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lyz-KO</sup> que en los Lys-WT en ambos tipos de dieta (Fig. 57B, 57C).



**Fig.57: Determinación de la Infiltración leucocitaria en hígado: A-C.** A partir de hígados de animales Lys-WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lys-KO</sup> en dietas ND o MCD se extrajeron leucocitos hepáticos y se cuantificó la infiltración de las distintas poblaciones leucocitarias mediante FACS. Los resultados se representan como la media  $\pm$  error estándar (n = 10). Las diferencias significativas entre Lys-WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lys-KO</sup> están indicadas ([\*] p < 0.05, [\*\*] p < 0.01, [\*\*\*] p < 0.001).

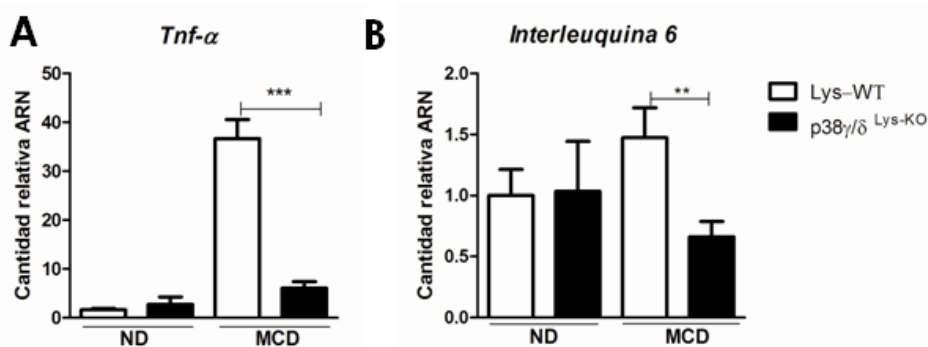
Para determinar si las diferencias observadas podían ser debidas a un defecto en la migración desde médula ósea a sangre se estudiaron los niveles de las poblaciones en sangre circulante. Se observó que tras la dieta MCD los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ <sup>Lys-KO</sup> tenían menos neutrófilos y más linfocitos en circulación en comparación a los Lys-WT (Fig. 58A, 58B) sin hallarse diferencias en basófilos, eosinófilos y monocitos (Fig. 58C, 58D, 58E).



**Fig.58: Poblaciones leucocitarias en sangre: A- E.** El porcentaje de poblaciones leucocitarias se determinó a partir de sangre total de animales Lys-WT y p38 $\gamma/\delta$ <sup>Lys-KO</sup> en dietas ND o MCD. Los resultados de las poblaciones se representaron como porcentajes de la población total y los datos como la media  $\pm$  error estándar (n = 10). Las diferencias significativas entre Lys-WT y p38 $\gamma/\delta$ <sup>Lys-KO</sup> están indicadas ([\*\*\*] p < 0.001).

Con esto podemos concluir que la carencia de estas quinasas en el tejido mieloide produce un menor grado de infiltración hepática seguramente debido a una menor migración desde la médula ósea.

Como hemos mencionado antes, en nuestro laboratorio ya habíamos descrito que estas quinasas controlan la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6, por lo que quisimos analizar si estas citoquinas estaban reguladas en este modelo. Para esto, se analizó el nivel de expresión de genes inflamatorios en tejido hepático, como son la IL-6 y el TNF- $\alpha$ , demostrando que niveles de expresión de estas citoquinas eran significativamente menores en los animales p38 $\gamma/\delta$ <sup>Lys-KO</sup> que en los animales Lys-WT en MCD (Fig. 59A, 59B).



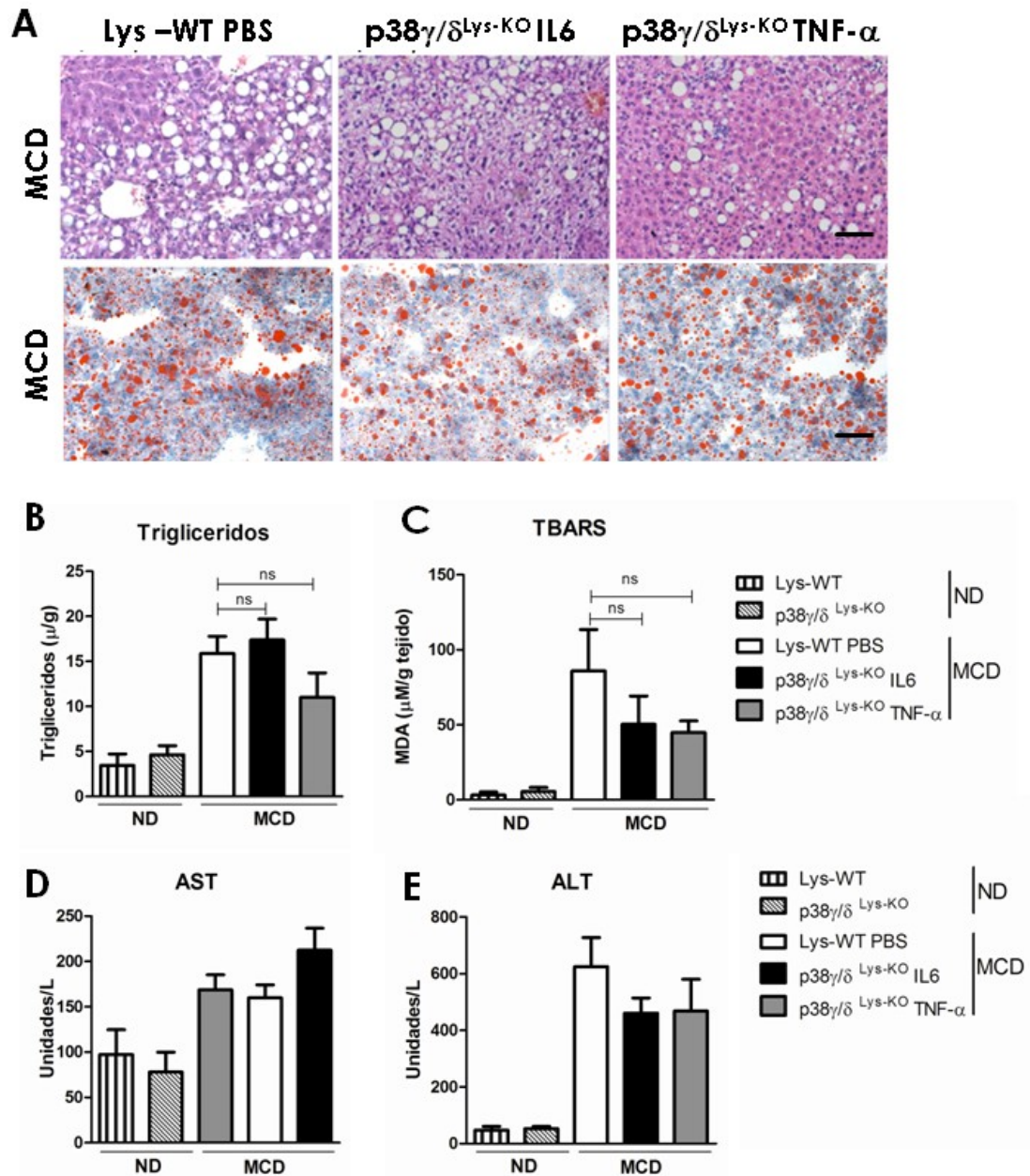
**Fig.59: Expresión de genes proinflamatorios en hígado:** La expresión de genes proinflamatorios se cuantificaron en hígado de animales Lys-WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ Lys-KO en dietas ND o MCD, mediante PCR cuantitativa de ADNc obtenido de ARNm. Los datos de la expresión de *Tnf- $\alpha$*  (A) e *Il-6* (B) se calcularon mediante la normalización de los datos con la cantidad de *Gapdh* por cada muestra. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar (n = 10). Las diferencias significativas entre Lys-WT y p38 $\gamma$ / $\delta$ Lys-KO están indicadas ([\*\*] p < 0.01, [\*\*\*] p < 0.001).

### 3. La adición exógena de TNF- $\alpha$ o IL-6 en animales p38 $\gamma$ / $\delta$ Lyz-KO produce la pérdida del fenotipo de protección

Puesto que la carencia de p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  en células mieloides protege frente a la esteatosis hepática a la vez que se observa una disminución en la producción de citoquinas inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  quisimos estudiar si el control que ejercen estas quinasas sobre la expresión de citoquinas como IL-6 y TNF- $\alpha$  podría estar involucrado en la protección observada. Para ello decidimos incorporar de manera exógena estas citoquinas inflamatorias. Así los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ Lyz-KO se les administró TNF- $\alpha$  o IL-6 de forma constante mediante el uso de bombas osmóticas mientras fueron alimentados con la dieta MCD.

En primer lugar analizamos los hígados de estos animales observando que los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ Lyz-KO que habían sido tratados con TNF- $\alpha$  o IL-6 presentaban esteatosis (Fig. 60A). Para corroborar este resultado se cuantificaron los triglicéridos hepáticos observando que los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ Lyz-KO con TNF- $\alpha$  o IL-6 tenían los mismos niveles de triglicéridos hepáticos que los animales Lys-WT en MCD (Fig. 60B). Por último, analizamos la peroxidación lipídica, obteniendo que los hígados de los animales p38 $\gamma$ / $\delta$ Lyz-KO tratados con TNF- $\alpha$  o IL-6 poseían niveles similares de MDA que los de los Lys-WT (Fig. 60C). Además, no había diferencias entre los niveles de transaminasas ALT y AST en los p38 $\gamma$ / $\delta$ Lyz-KO con TNF- $\alpha$  o IL-6 y Lys-WT en MCD (Fig. 60D, 60E).

Estos resultados indican que la administración exógena de citoquinas como la IL-6 y el TNF- $\alpha$  revierte la protección que observamos en los animales p38 $\gamma/\delta^{Lys-KO}$  frente a la esteatosis lo que podría significar que el fenotipo observado en estos animales esta mediado por una reducción en la producción de estas citoquinas en las células mieloides en los animales p38 $\gamma/\delta^{Lys-KO}$ .



**Fig.60: Pérdida de protección mediante citoquinas exógenas:** **A.** Secciones de 8 o 12  $\mu\text{m}$  de tejido hepático de animales p38 $\gamma^{-/-}$ , p38 $\delta^{-/-}$  y WT en dietas MCD o ND se cortaron y se tiñeron con H/E o oil red para detectar el grado de esteatosis hepática. Las fotografías fueron tomadas a un aumento de 20X, mientras que la barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ . **B y C.** los niveles de triglicéridos o MDA se cuantificaron a partir de hígado de animales Lys-WT y p38 $\gamma/\delta^{Lys-KO}$  en dietas ND y MCD. **D y E.** Los niveles de transaminasas hepáticas se analizaron en plasma de animales Lys-WT y p38 $\gamma/\delta^{Lys-KO}$  alimentados con ND o MCD. Los resultados se representan como media  $\pm$  error estándar de la media SEM (n = 10).





# Discusión

---



Los principales problemas de salud pública a nivel global incluyen la desnutrición, las enfermedades infecciosas y en las últimas décadas la obesidad. Esta condición produce un incremento en la morbilidad y mortalidad de enfermedades crónicas, siendo responsable del 2 al 8% de los costes de sanidad en Europa. Además es la causante del 10 al 13% de las muertes de la región[334]. La Organización Mundial de la Salud en el año 2010 estimó que el promedio de la población de 90 países presentaba un índice de masa corporal superior a 25, es decir con sobrepeso[335]. La epidemia de obesidad es debida a un cambio en la alimentación, unido al aumento de la vida sedentaria. Sin embargo, la obesidad tiene también componentes genéticos que predisponen al sobrepeso[336].

Las MAPK son una familia de proteínas con múltiples funciones, así se ha visto que controlan la proliferación y la supervivencia celular, la inflamación, la expresión de genes, la diferenciación y la apoptosis[337]. Dentro de esta familia se sabe muy poco acerca de las isoformas p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ , especialmente sobre sus posibles funciones en el desarrollo de la obesidad y enfermedades asociadas. Actualmente se disponen de ratones *Knock-outs* totales y condicionales de estas quinasas, por lo que en este trabajo de tesis nos planteamos el uso de estos modelos para el estudio de la función de estas quinasas en el desarrollo de la obesidad.

### **1.Existe un efecto compensatorio en los animales carentes de p38 $\gamma$ o p38 $\delta$**

En este trabajo, hemos evidenciado que p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  se compensan cuando una de ellas no se expresa. Así, mientras que los animales carentes de ambas quinasas estaban protegidos tras la HFD o la MCD, los animales *knock-out* para p38 $\gamma$  o p38 $\delta$  no estaban protegidos. La compensación entre estas dos quinasas se describió en el año 2005 en células de fibroblastos embrionarios de ratón, donde la carencia de p38 $\gamma$  era compensada por la presencia de p38 $\delta$ [293]. La compensación entre quinasas altamente relacionadas no es un hecho aislado, ya que en animales carentes de JNK se ha visto que JNK1 tiene un papel en el metabolismo de la glucosa el cual puede ser en parte compensado por JNK2[209]. Asimismo, Conze en el año 2002, describió que en células CD8<sup>+</sup>T de animales carentes de JNK2, JNK1 no logra compensar completamente la ausencia de esta isoforma. Sin embargo, la carencia de JNK3 no es compensada por JNK1 o JNK2 para evitar la apoptosis de neuronas del hipocampo [338].

También se ha observado que animales knock-out para la MAPK RSK2 han presentado compensación por otras isoformas de RSK, no siendo un buen modelo para el estudio del síndrome de Coffin-Lowry[339], aunque este fenómeno ha servido para explicar que este síndrome necesita de más de una mutación para que se desarrolle. En un modelo *knock-out* para la proteína MK2, se observó que desarrollaban una respuesta inflamatoria alterada, siendo susceptibles a infecciones. En estos animales se ha visto que la aplicación ectópica de MK3 puede rescatar el fenotipo de los *knock-out* de MK2, además de observarse que en el doble *knock-out* de estas quinasas presentaban una menor producción de TNF- $\alpha$  en respuesta a estímulos inflamatorios[340].

A veces la carencia de una quinasa puede aumentar la expresión de otras quinasas altamente relacionadas, así el ARN de interferencia para ERK1 incrementaba los niveles de ERK2[341]. Este efecto compensatorio de ERK1 también se ha visto en animales condicionales para células progenitoras, ya que la delección de ERK2 es letal. En estos animales se ha observado que ERK1 puede compensar la carencia de ERK2 en la neurogenesis[342].

Respecto a las p38 se ha descrito que las isoformas p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  presentan funciones sinérgicas en el desarrollo cardíaco, sin embargo, la presencia de p38 $\beta$  no compensa el defecto en el desarrollo embrionario que aparece en los animales carentes de p38 $\alpha$ [343].

Una explicación de este efecto compensatorio es que las MAPK comparten sustratos con otras quinasas, o bien los sustratos están presentes en tejidos específicos[140, 222], además estas MAPK pueden ser activadas por distintas MKK o proteínas "upstream", que a su vez activan a otras quinasas[144].

Nuestros experimentos con animales *knock-out* para p38 $\gamma$  o p38 $\delta$ , demuestran que no presentaban protección frente al desarrollo de la obesidad tras dietas HFD. A pesar de esto, los animales p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> en HFD presentaban un mayor gasto energético, lo que podría producir la disminución del peso del hígado, tejido graso epididimal y pardo observada en estos animales.

Por lo demás, aunque los animales p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> y p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> desarrollan esteatosis hepática en HFD, en ND los animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> presentan menor acúmulo de triglicéridos en el hígado. Esto podría ser debido a un aumento de su exportación en forma de VLDL, de hecho nuestros resultados muestran que existía un aumento significativo de éstas partículas en los animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Estos lípidos exportados finalmente podrían acumularse en otros tejidos. El incremento de lípidos y más específicamente de VLDL se correlaciona con el desarrollo de resistencia a la insulina[344], lo que explicaría porque observamos resistencia a la insulina en los animales p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> en ND respecto a los

animales WT. Asimismo, el *knock-out* de p38 $\delta$ , presenta un fenotipo diferente al descrito por Sumara en 2009[313], en donde la carencia de esta isoforma confiere una mejor tolerancia a la glucosa debido a una mejor secreción de insulina. Nuestros resultados muestran que los animales p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> en ND no son más tolerantes a la glucosa y no presentaban mayores niveles de insulina circulante respecto al control. Estas diferencias con los resultados publicados con anterioridad podrían ser debidas al uso de distintas dietas ND. Es común el uso de comida de cría para la alimentación de los animales, la cual posee mayor cantidad de grasa. En nuestro caso hemos utilizado una comida ND en la que solo el 10% de las calorías provenían de la grasa. Un dato que apoyaría esta hipótesis es que observamos más tolerancia a la glucosa cuando alimentamos estos animales con dietas ricas en grasa, asemejándose a lo descrito el 2009 en estos animales[313].

Para el estudio de la esteatohepatitis hemos utilizado dos modelos animales, la alimentación con dietas ricas en grasa para inducir obesidad y la alimentación con MCD, en donde se produce esteatosis hepática sin inducción de la obesidad. Esta dieta carente en metionina y colina induce esteatosis hepática al impedir la exportación de las partículas VLDL, produciendo un nivel de esteatosis similar al observado en humanos con NAFLD. Los animales *knock-out* simples desarrollaban esteatosis en el mismo grado que los animales WT. Asimismo, la mayor protección frente al desarrollo de la esteatosis hepática se observó en los animales doble *knock-out* de p38 $\gamma/\delta$  en las dietas MCD, lo cual discutiremos más adelante.

En resumen, hemos demostrado que solo la carencia de ambas isoformas p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  simultáneamente protege a los animales de diabetes y de esteatosis hepática. Esto podría ser debido a que las isoformas p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  se compensan, teniendo cada isoforma una función diferente en distintos tejidos, lo cual puede producir un efecto de enmascaramiento producto de esta compensación. Asimismo, esto produce el efecto sinérgico que observamos al estar ausentes ambas quinasas, logrando una mayor protección.

## 2. La carencia de p38 $\gamma/\delta$ protege de la obesidad

Se ha descrito que las MAPK están involucradas en una multitud de procesos metabólicos incluyendo la adipogénesis, la señalización de insulina, la captación de glucosa, el metabolismo de los ácidos grasos, la lipogénesis y el gasto energético[207, 345-351].

Para estudiar el papel de p38 $\gamma/\delta$  en el desarrollo de la obesidad hemos alimentado a animales carentes de estas quinasas con dieta rica en grasa, en la que el 60% de las calorías provienen de la grasa. Este modelo es uno de los más utilizados en los estudios de enfermedades asociadas a la obesidad, ya que el exceso de grasa en la dieta es una de las principales causas del desarrollo de la obesidad al incrementarse la ingesta de energía[352-354]. Además la acumulación de lípidos en el organismo aumenta con las dietas ricas en grasas[355, 356]. Esto también se ha demostrado en estudios con roedores, en donde al cambiar la dieta normal por una rica en grasa ( $\geq 35\%$  de la energía proviene de grasa) estos animales incrementan su ingesta de energía, produciéndose un aumento de peso, con la consiguiente aparición de obesidad[357-359].

Resultados de nuestro laboratorio muestran que la protección observada en los animales carentes de p38 $\gamma/\delta$  no es debida a su carencia específica en músculo, tejido adiposo o hígado, ya que los animales condicionales para estos tejidos se vuelven obesos al ser alimentados con dietas ricas en grasa. Estos resultados indicarían así, que la protección frente a la obesidad debe ser producida por la señalización de p38 $\gamma/\delta$  en otro tejido. En esta tesis demostramos que la carencia de estas isoformas de p38 en macrófagos tampoco produce protección frente al desarrollo de la obesidad, aunque previene la inflamación asociada a la obesidad, protegiendo así frente al desarrollo de la diabetes.

Además los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  acumulan menor cantidad de materia grasa corporal lo que se correlacionaba con un decremento en el peso de tejidos específicos como en el tejidos adiposo epididimal, pardo e hígado, tras la dieta grasa. Esta disminución en la cantidad de grasa corporal podría explicarse por el incremento del gasto energético que estos animales presentan en HFD respecto a los animales WT. Asimismo, estos animales poseen un aumento de la actividad locomotora tanto de noche como de día. Resultados similares se han obtenido con otros modelos animales por ejemplo los animales carentes de MKP-1[360] o de animales carentes en SNC de JNK1[216], CPT-1[361], ACC $\beta$  [362], los cuales son resistentes al desarrollo de la obesidad producida por la edad y por dietas ricas en grasa debido a un mayor gasto energético[216, 360, 361]. Mientras que los animales carentes de JNK1 en SNC tenían una alteración de eje hipotálamo-hipofisaria que resultaba en un incremento en la producción de hormonas tiroideas, en nuestro caso observamos un incremento de T4 en sangre en los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  en ND sin embargo no observamos cambios en TRH ni en TSH. Las hormonas tiroideas actúan a nivel de tejidos periféricos como el músculo y el tejido adiposo pardo aumentando el metabolismo basal. Además, observamos un incremento de los niveles de ACTH tanto en ND como en HFD. Este aumento de ACTH

podría ser responsable de la protección frente a la obesidad en los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$ , ya que se ha descrito el papel de este eje en la homeostasis energética, además, la administración de ACTH produce la disminución en la ingesta de alimentos y el peso de tejido adiposo[363, 364]. A su vez esta descrito que disminuye la glicemia[365]. Esta disminución en la glicemia también la hemos observado en los animales carentes de  $p38\gamma$  y  $p38\delta$ . A su vez, la hipoglicemia podría explicar el aumento de la actividad locomotora durante el día con el fin de obtener alimento y aumentar así los niveles de glucosa en sangre.

Por lo demás, los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  alimentados con HFD eran tolerantes a la glucosa y sensibles a la insulina, a pesar de estar bajo una dieta HFD. Respecto a esto, publicaciones anteriores hacen referencia al hecho de que lesiones en SNC en la región del núcleo supraquiasmático (el cual es un centro primario de la regulación de los ritmos circadianos), causan la abolición diurna de la homeostasis de la glucosa en todo el organismo[366] alterando no solamente el ritmo de utilización de la glucosa sino que también la producción de glucosa hepática[367]. Un posible papel de estas quinasas podría ser en el control de los ciclos circadianos ya que se ha descrito que las MAPK son activadas en SNC por estímulos de luz, siendo indispensables para la mantención de estos ciclos[368]. Además, se ha descrito que la glándula pineal de rata aumenta la fosforilación de  $p38\alpha$  y MKK3/6 durante la noche[369]. Por estas causas no podemos descartar un papel de las isoformas  $p38\gamma$  y  $p38\delta$  en el control del ritmo circadiano. Asimismo, investigaciones previas relacionan el uso de dietas HFD con la inducción de cambios en el ciclo circadiano en roedores, alterando la actividad locomotora, la expresión de genes relacionados a este ciclo y que finalmente tienen relación con el desarrollo de la obesidad[370]. Para ver la implicación de estas quinasas en el control de los ciclos circadianos sería necesario medir la actividad neuronal utilizando electrodos[368], incremento de expresión de genes relacionados a ciclo circadiano como *Bmal1*, *Clock*, *Cry1*, *Cry2*, *DBP/E4BP4*, *REV-ERB/ROR-regulatory elements (RREs)* en periodos de luz-oscuridad y la medición de la ingesta de alimento en día y noche. Además sería importante ver los niveles de producción de glucosa hepática e incorporación de glucosa en distintos tejidos mediante "clamp hipersulinemico-euglicemico" tanto de noche como de día. Todo esto podría aclararnos si estas quinasas presentan algún papel a nivel del control de ciclos circadianos y su efecto en tejidos periféricos.

Nuestros resultados indicarían que  $p38\gamma/\delta$  actuaría a nivel del sistema nervioso central, reduciendo el gasto energético y disminuyendo la actividad locomotora. Este efecto a nivel de SNC podría afectar a otros tejidos, En conclusión y a la luz de los



datos antes mencionados, la hipótesis que planteamos, es que la disminución de peso en los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  es producida por un efecto a nivel del SNC. La carencia de estas quinasas induciría a un mayor gasto energético y actividad locomotora en estos animales, lo cual produciría además una protección frente al desarrollo de enfermedades asociadas como la DM2 y la esteatosis hepática. Para comprobar el posible papel de  $p38\gamma/\delta$  en SNC, estamos generando los animales condicionales en SNC, y también se inyectarán en los ventrículos lentivirus con cre en animales LoxP de  $p38\gamma/\delta$ .

### **3. La carencia de $p38\gamma/\delta$ protege del desarrollo de dislipidemia**

La disminución de la obesidad observada en los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  podría afectar al desarrollo de otras patologías concomitantes, ya que la acumulación ectópica de lípidos está asociada al desarrollo de enfermedades cardíacas[371, 372], síndrome metabólico[373], esteatohepatitis[374, 375], resistencia a la insulina[371, 376], DM2[377, 378], aterosclerosis e hipertensión, entre muchas [379, 380].

Nuestros resultados demuestran que los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  están protegidos frente a la dislipidemia inducida por la alimentación con dietas HFD. Estos animales tras HFD poseían menores niveles de colesterol total, LDL y HDL que los animales control, por lo que la doble carencia de estas quinasas podría tener un papel en el control de la homeostasis lipídica en el organismo. Esto se diferencia a lo expuesto en ratones carentes de la MAPK JNK1, en los cuales tras ser alimentados con dietas ricas en grasa se observó una reducción de todos los depósitos de lípidos en el organismo y de tamaño de los adipocitos. Sin embargo no se observaron diferencias en los niveles de triglicéridos plasmáticos, colesterol o ácidos grasos libres, indicando que el metabolismo lipídico, la ingesta y absorción de nutrientes no se altera al carecer de JNK1[207], aunque en el condicional de músculo para JNK1 sí se observó una disminución de los niveles circulantes de colesterol [213].

Para reforzar el papel de estas quinasas en la dislipidemia sería interesante poder cuantificar la tasa de secreción de triglicéridos lo que sería un indicativo de la producción hepática de VLDL en estos animales y la tasa de síntesis de lípidos *de novo* en hígado, lo que nos permitiría ver si existe una correlación entre los resultados de la expresión de genes como ACOX1, SREBP-1C con la síntesis de lípidos observada.

### 4. La carencia de las MAPK p38 $\gamma/\delta$ protege del desarrollo de diabetes

En la génesis de la diabetes se acepta la interrelación entre los mecanismo de señalización hormonales y proinflamatorios que finalmente producen la enfermedad. Las señales de inflamación pueden influenciar negativamente la sensibilidad a la insulina, la tolerancia a la glucosa y el control del metabolismo en su totalidad lo que puede llevar finalmente al desarrollo de la DM2.

En cuanto a la p38 $\alpha$  en el desarrollo de la DM2, existen numerosos estudios sobre el papel de esta quinasa en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Muchos de estos estudios analizan los efectos inflamatorios de la citoquina TNF- $\alpha$  en células 3T3-L1 y modelos murinos relacionados con la ruta de insulina. TNF- $\alpha$  induce la activación de serina-treonina quinasas que incrementan la fosforilación en serinas y treoninas del SRI-1 e impiden la unión del SRI-1 a PI3K y al receptor de insulina (RI). Recientemente se ha descrito un papel de XBP1, un factor de transcripción, el cual es fosforilado por p38, permitiendo el control de la glicemia en obesidad, por lo que se sugiere que la inhibición de p38 podría ser perjudicial en el control de la homeostasis de la glucosa en obesidad[381].

Nuestro estudio demuestra que los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  presentan protección frente a la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina, lo cual podría deberse a que no desarrollan obesidad, con lo que mantienen una mayor sensibilidad a insulina en el hígado, no así en tejido adiposo y músculo como observamos en la Fig. 23. Además, como ya hemos mencionado, los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  presentan menores niveles de glucosa y durante la ITT la glicemia tarda más tiempo en llegar a niveles normales en estos animales. Esto concuerda con el aumento de ACTH que observamos en estos ratones y que resultaría en la liberación de cortisol por parte de la corteza adrenal que inducirían la liberación de insulina[382, 383]. Sin embargo, el aumento de ACTH no produce el síndrome de Cushing en estos animales, el cual se caracteriza por obesidad, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, problemas de fertilidad e hipercolesterolemia[384].

Por otro lado, los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  acumulan más glucógeno hepático que los WT en HFD. En publicaciones anteriores se ha descrito el papel estimulador de p38 $\alpha$  en la gluconeogenesis tanto en diabetes tipo 1 como 2 [360, 385-387], puesto que estimula transcripción de genes gluconeogénicos como PEPCK, G6Pasa y PGC-1 $\alpha$

través de la fosforilación del factor de transcripción CREB[386, 388, 389]. Sin embargo, en los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  no hemos observado cambios en estos genes respecto a los animales control tras dietas HFD. Otra posible explicación sería la regulación en la fosforilación de glucógeno sintasa, la cual es una enzima clave en la síntesis de glucógeno. Esto podría ocurrir, ya que observamos mayores niveles fosforilación de la glucógeno sintasa, produciéndose la inhibición de esta enzima. Así, se podría explicar así la disminución de glucógeno hepático en los animales WT respecto a los  $p38\gamma/\delta^{-/-}$ . Por otro lado, los animales WT en ND parecen tener una tendencia a poseer mayores depósitos de glucógeno en comparación a los  $p38\gamma/\delta^{-/-}$ . Esto puede ser debido a que presentan mayores niveles de insulina basal en comparación a los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$ .

Como hemos mencionado, en músculo a diferencia de lo observado en hígado, los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$  presentaban mayor resistencia a la insulina tras HFD que los animales WT. Se ha descrito que p38 en músculo  $\alpha$  puede incrementar la captación de glucosa[390-392]. Contrario a esto se ha descrito que la acción de TNF- $\alpha$  podría inducir la resistencia a la insulina a través de la activación de p38 en músculo[393, 394]. Podríamos pensar que la carencia de  $p38\gamma/\delta$  podría incrementar en músculo la señalización de insulina. Este efecto no se observa en HFD en los animales  $p38\gamma/\delta^{-/-}$ , seguramente por la activación de otras quinasas que inhiben la ruta, como JNK, que se ha descrito que participa en la resistencia a insulina en músculo[395]. Otro posible mecanismo que explica este efecto de resistencia a la insulina en el musculo es el incremento de actividad locomotora observada en estos animales tras la HFD. La actividad locomotora y el incremento del gasto energético inducen un incremento del estrés oxidativo en el músculo. Este ambiente oxidante se ha descrito que inhibe la señalización de insulina en este tejido por parte de  $p38\alpha$ , por lo que la carencia de las isoformas de  $p38\gamma/\delta$  podría tener algún efecto compensatorio que incremente esta acción de  $p38\alpha$ , induciendo la inhibición de la señalización de insulina en músculo. Esto puede ser comprobado midiendo los niveles de activación de p38 en este tejido en estos animales. También sería interesante realizar estudios con animales condicionales de músculo para  $p38\gamma/\delta$ , lo que podría darnos mayores respuestas y descartar la acción de otros tejidos en este fenómeno.

En el tejido adiposo numerosos estudios sugieren un papel importante de las p38 en la captación/disposición de glucosa mediada por insulina. El bloqueo de p38, mediante el uso de inhibidores o dominantes negativos, produce tras un estímulo de insulina una disminución de la captación de glucosa en células 3T3-L1 diferenciadas[350, 396]. Contrario a esto, se ha descrito que p38 no está involucrada en la captación de glucosa tras insulina en adipocitos[283, 397, 398]. En nuestros estudios hemos visto que la carencia de  $p38\gamma/\delta$  no protege de la resistencia a la

insulina en tejido adiposo tras HFD, por lo que su función podría asemejarse a los resultados obtenidos al inhibir p38 $\alpha$  en células 3T3-L1[350, 396].

Nuestros resultados sugieren que la resistencia a insulina en tejido adiposo de animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  tras HFD, no puede atribuirse a un mayor acúmulo lipídico en el tejido adiposo ya que los ratones p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  no presentan incremento de lípidos o del tamaño de las células adiposas. Sin embargo, podríamos atribuir la resistencia a la insulina en este tejido a un incremento del estado inflamatorio, pues los niveles de expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  en este tejido, son similares a los de un animal WT tras HFD, pudiendo ser esta la causa en la aparición de resistencia a insulina en el tejido adiposo[376, 399, 400].

En animales carentes de p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  en tejido mieloide, vemos que a pesar de ser obesos tras HFD, presentan una mayor tolerancia a la glucosa respecto a los controles. Esto nos indica que la carencia de p38 $\gamma/\delta$  en tejidos periféricos también tiene un papel en la protección del desarrollo de la diabetes. Sin embargo, este efecto es mayor al estar ausente en todo el organismo.

Resumiendo, podemos decir que la protección frente al desarrollo de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa puede deberse a diversos factores como:

- a) Los menores niveles de obesidad en los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ , los cuales protegerían frente al desarrollo de la resistencia a la insulina. Así se sabe que mayores depósitos de lípidos en tejidos producen resistencia a la insulina [371, 376].
- b) La carencia de p38 $\gamma/\delta$  en hígado podría proteger frente al desarrollo de resistencia a la insulina de manera directa.
- c) Se ha descrito la importancia del eje JAK-STAT3 en el desarrollo de la resistencia a insulina por acción de IL-6 [87, 331-333]. Nosotros observamos menores niveles de inflamación presentados en los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  lo cual podría proteger de la activación de este eje y del desarrollo de la resistencia a insulina en hígado. Además los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  también tienen una tendencia a tener menores niveles de TNF- $\alpha$  en hígado, citoquina implicada en el desarrollo de la resistencia a la insulina, como ya hemos mencionado.

Podemos concluir que la doble carencia de p38 $\gamma/\delta$  protege del desarrollo de intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia.

## **5. Papel de p38 $\gamma$ y p38 $\delta$ en el desarrollo de la esteatosis hepática**

La esteatosis hepática (NAFLD) se presenta con más frecuencia en individuos con dislipidemias, obesidad, resistencia a la insulina y DM2[113]. Nuestros resultados demuestran que la ausencia de p38 $\gamma/\delta$  protege frente al desarrollo de esteatosis hepática.

Se ha descrito que p38 $\alpha$  inhibe la lipogénesis hepática[348] y su inhibición incrementa la transcripción de genes lipogénicos como SREBP-1c y la expresión de su coactivador PGC1- $\beta$ , lo cual produce un aumento de los niveles de triglicéridos plasmáticos y del contenido lipídico del hígado[348].

Los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  estaban protegidos de la esteatosis hepática tras la dieta HFD, sin embargo la carencia de las isoformas p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  no inhibía la expresión de los genes lipogénicos como SREBP-1c, así como el coactivador PGC1- $\beta$ , como lo hace la p38 $\alpha$ . Sin embargo, la cantidad de SREBP-1c maduro es menor en el hígado de animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ , lo cual se explica por un aumento de fosforilación producida por la AMPK. Esta quinasa estaba aumentada en los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  tras HFD y se sabe fosforila a SREBP-1c impidiendo su escisión proteolítica y con ello su acción sobre genes diana. Además se ha descrito su papel en el control de la homeostasis lipídica en hígado al ser sobre-expresada en este órgano[401]. Asimismo se ha descrito que animales carentes de ACC1, proteína regulada por AMPK, en hígado poseen menor acumulo de lípidos en dietas normales, además de presentar menor síntesis de colesterol y ácidos grasos en hepatocitos [402].

En cuanto a PGC1- $\beta$ , la cual controla la biogénesis mitocondrial y la homeostasis energética, se ha descrito que disminuye su expresión en obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2[403-405]. También se ha descrito su función in vivo en ratones *knock-out*, siendo la carencia de esta proteína un factor fundamental de la aparición de esteatosis hepática tras HFD[406, 407] ya que PGC1- $\beta$  es necesaria para la ruptura de lípidos en el hígado y la supresión de la síntesis hepática en respuesta a la dietas ,por lo que su incremento en los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  podría ser un factor de protección frente al desarrollo de la esteatosis hepática. Sin embargo, esto es controversial ya que otros autores hacen referencia a su inhibición como posible diana farmacológica para la NAFLD[403].

También, observamos un aumento de la expresión de Acetil-CoA oxidasa. Esta enzima lipolítica, participa en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Su aumento podría

disminuir el acúmulo de lípidos en el hígado. Por último, existe un aumento del gasto energético total y un aumento de la actividad locomotora, lo que podría impedir que se acumulen en exceso lípidos en diversos tejidos. Además se ha descrito que el incremento del gasto energético induce a la reducción de la esteatosis hepática en ratones[408].

Para comprobar nuestras hipótesis, serían necesarios nuevos experimentos para dilucidar cuál podría ser el mecanismo. Entre ellos, inhibir farmacológicamente o mediante shRNA la AMPK o ACOX1 en hígado de animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ . Además de lo ya mencionado respecto a la utilización de lentivirus con cre en animales LoxP de p38 $\gamma/\delta$  y de animales condicionales para cerebro de estas quinasas, también podríamos ver la expresión de genes involucrados en gasto energético y metabolismo mitocondrial en músculo, hígado y tejido adiposo, como PGC-1 $\alpha$ , FATP1, ATGL, RII $\alpha$ , Acox3 en tejido adiposo; ACTN3, NR1D2, ATP1B1, SLC24A3 en músculo; factor de crecimiento de fibroblastos 21, PGC1- $\alpha$  entre muchos en hígado.

A su vez, quisimos estudiar el desarrollo de la esteatosis hepática sin el componente de la obesidad, para ello utilizamos una dieta carente en metionina y colina (MCD) gracias a la cual podemos buscar nuevos mecanismos inductores de esta patología que puedan ser independientes de el exceso de grasa en el organismo.

Primero, para demostrar la eficacia de este modelo y el papel de las p38 en el desarrollo de la esteatosis hepática, se inhibieron todas las isoformas de p38 con BIRB796 en animales WT alimentados con MCD demostrando que la inhibición de p38 protege del desarrollo de esteatosis hepática. A su vez, los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  estaban protegidos del desarrollo de esteatosis inducida por la alimentación con MCD. Esta protección además se reflejaba en una disminución del estrés oxidativo, y de la inflamación, siendo ésta, la primera vez que se demuestra la implicación de estas quinasas en el desarrollo de la esteatosis hepática.

Nuestras observaciones indicaron que la inflamación podría ser un componente del desarrollo de esta enfermedad. Se han descrito múltiples funciones de las p38, y muchas de ellas relacionadas con la inflamación. Por ejemplo, p38 $\alpha$  controla el desarrollo de enfermedades inflamatorias tales como psoriasis[312, 409], artritis reumatoide[410, 411], asma[412], enfermedad de Crohn[413], entre otras. Las primeras observaciones de esta proteína en procesos inflamatorios se debieron a su papel en la regulación de la síntesis de IL-1 y TNF- $\alpha$  a nivel de transcripción y traducción en monocitos estimulados por endotoxinas[219, 414, 415]. También se ha visto que regula la producción de IL-6 por estímulo de TNF- $\alpha$ [416] y además p38 $\alpha$  regularía a COX2[417, 418]. La función de las p38 $\beta$  en inflamación parece no ser importante en el

organismo[419, 420], por lo que hasta la fecha dentro de la familia de las p38, sería la isoforma alfa la que controlaría la mayor parte de los procesos inflamatorios. A su vez, en nuestro laboratorio hemos demostrado que p38 $\gamma/\delta$  controla la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6[242], dos citoquinas claves en el desarrollo de la esteatosis hepática[421, 422], lo cual nos permitió concluir que las quinasas p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  podrían tener un papel activo en la inflamación asociada a la NAFLD.

Para continuar con esta línea de investigación, utilizamos a los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  en dietas MCD. Nuestros resultados demuestran que estos animales presentaban un menor grado de expresión de citoquinas inflamatorias en hígado (TNF- $\alpha$  e IL-6.). Sin embargo, la carencia de estas quinasas no parece estar involucrada en un cambio en la polarización M1-M2 que se ha descrito ocurre en animales carentes de JNK1/2 y que produce protección frente al desarrollo de esta enfermedad[215].

Asimismo, observamos que estos animales presentaban un menor estado oxidativo en el hígado, que unido a un menor estado inflamatorio podría ser fundamental para prevenir la necrosis hepática, la cual se sabe es una etapa del proceso de evolución de la NAFLD[139].

También para estudiar el papel de estas quinasas en el desarrollo de la esteatosis hepática, utilizamos animales carentes de estas quinasas en tejido mieloide, ya que como mencionamos antes la inflamación es un componente fundamental en el desarrollo de esta enfermedad[423-426]. Este hecho puede deberse a la infiltración de células inflamatorias y la producción de citoquinas por parte de estas células o células residentes. Ya que se ha descrito que los productos de macrófagos como citoquinas, prostanoïdes, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno intermediarias influyen en la función y viabilidad de los macrófagos y de las células vecinas como hepatocitos, células esteladas, células endoteliales y otras células inmunes que pasan a través del hígado[424, 427]. Dado que el hígado posee una de las más grandes poblaciones de macrófagos residentes, las células de Kupffer, no es de sorprender que estas células estén involucradas en la patogénesis de muchas enfermedades hepáticas [428-430].

Asimismo se ha descrito que existe infiltrado de neutrófilos en pacientes con NAFLD y que estos neutrófilos inducen a la producción de citoquinas y quimioquinas que perpetúan el estado inflamatorio observado en esta enfermedad[431, 432].

Al estudiar a los animales p38 $\gamma/\delta^{Lyz-KO}$ , condicionales para tejido mieloide, observamos que estos presentaban una disminución de TNF e IL-6 en hígado, lo cual podría proteger del desarrollo de la esteatosis [139, 433, 434]. También, estos animales presentaban cambios en la infiltración de neutrófilos, monocitos y macrófagos en el hígado, lo cual nos lleva a pensar que la inflamación y la infiltración de leucocitos al hígado es una parte importante del proceso de desarrollo de esta enfermedad. A

pesar de nuestros resultados no podemos por el momento descartar que esta menor infiltración sea debida a una función específica de estas quinasas en las células mieloides o debida a la falta de TNF e IL-6.

Finalmente, quisimos comprobar el hecho de que la disminución de citoquinas proinflamatorias podría tener un papel en el desarrollo de la enfermedad. Para ello decidimos aplicar de forma ectópica TNF- $\alpha$  e IL-6, lo cual ha sido ampliamente utilizado para demostrar el efecto de estas citoquinas en distintas enfermedades[435-439]. Nuestros resultados indican que los animales carentes de p38 $\gamma/\delta$  en tejido mieloide en dietas MCD, a los cuales aplicamos citoquinas exógenas, revertían el fenotipo de protección, lo cual se relaciona a lo descrito por muchos autores que ven en la inflamación un componente fundamental para el desarrollo de esta enfermedad[110, 119, 139, 421, 422, 434]. Todas estas observaciones demuestran que estas quinasas participan activamente en la inflamación producida en esteatosis hepática, por lo que el estudio de estas proteínas puede ayudar a la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

## 6. La inhibición de p38 $\gamma/\delta$ puede tener un fin terapéutico

Experimentos con pérdida de función, como el uso de dominantes negativos, silenciamiento de genes por ARN de interferencia e inhibidores de componentes de las MAPK se han utilizado para estudiar esta vía y ver la función celular particular en cada tejido. Esto ha demostrado que la activación de las MAPK tiene cierto solapamiento “upstream”[144] y que además estas quinasas comparten algunos sustratos, por lo que suelen inhibir más de una diana[140, 222]. Los inhibidores farmacológicos de las MAPK son una alternativa viable para comprender los requerimientos funcionales de esta vía. Muchos inhibidores se unen al bolsillo de unión a ATP de estas quinasas, lo que produce una alta especificidad que deriva de la interacción con el exterior del bolsillo de ATP.

Hasta la fecha son 63 los estudios clínicos que se han realizado sobre el papel de las p38 en diversas enfermedades[440], pero ninguno de ellos se realiza en obesidad, diabetes o esteatosis hepática. Para el estudio de estas quinasas se han utilizado inhibidores, pero pocos han avanzado hasta la fase de ensayos clínicos como, VX745[441], RWJ67657[442], SC80036, AVE-9940, AMG-548[443], ninguno de los cuales han superado la fase I de ensayos clínicos. Por ejemplo, SB203580 fue el primer inhibidor



de p38 y se estudió su uso como antiinflamatorio, comprobando que produce muy pocos efectos secundarios sobre el sistema inmune [444, 445], por lo que su uso como inhibidor farmacológico se sigue estudiando. A su vez, los ensayos clínicos de BIRB796, un inhibidor de todas las isoformas de p38, se abandonaron en el año 2005 por la aparición de efectos adversos como la hepatotoxicidad, debida en parte a metabolitos de este compuesto [254, 446, 447]. Sin embargo, y a pesar de estos fracasos en la búsqueda de un fármaco, actualmente existe desde el año 2011 en la Unión Europea un inhibidor de p38 $\gamma$  aprobado para su uso en el tratamiento de la fibrosis pulmonar, [448]. Esto nos anima ya que parece por tanto que la inhibición de p38 $\gamma$  no sería tóxica en humanos.

Hasta el momento no ha sido totalmente exitosa la búsqueda de nuevos fármacos que inhiban esta vía, pero gracias a estas investigaciones se sabe más sobre la ruta de las p38. Los problemas para encontrar un buen fármaco se deben quizás a que a pesar de la identificación de muchos sustratos de esta vía y el análisis de sus funciones en procesos específicos, aún no se comprende del todo aspectos como mecanismos de feedback, aspectos espacio temporal y el contexto específico de la señalización, por lo que los nuevos descubrimientos acerca de la función de estas quinasas ayudarán a desarrollar mejores fármacos para numerosas enfermedades relacionadas con esta vía.

En resumen, con el trabajo de esta tesis y antecedentes anteriores podemos decir que las MAPK son unas proteínas de las cuales se desconoce mucho sobre su función en distintos aspectos de la homeostasis del organismo. Pero con nuestras observaciones hemos demostrado que *in vivo* también existe un efecto de compensación entre estas isoformas en patologías como la obesidad y que existe un efecto de protección mayor al carecer de las isoformas p38 $\gamma/\delta$ . El efecto descrito en este trabajo entrega nuevos conocimientos sobre las funciones de estas quinasas en la obesidad y patologías asociadas como la DM2 y la esteatohepatitis no alcohólica. A su vez hemos observado que la carencia de ambas quinasas induce un incremento del gasto energético y la actividad locomotora, además incrementa la lipólisis e inhibe la lipogénesis a través de distintas rutas. Esto lleva a un decremento de las consecuencias de la obesidad, por lo que también se induce a la protección frente a DM2 y la esteatosis hepática. Además nuestras observaciones demuestran que la inflamación es un componente esencial en el desarrollo de la esteatosis hepática en donde vemos que al disminuir esta, gracias a la carencia de p38 $\gamma/\delta$ , se produce una protección casi total frente a esta enfermedad.

Estos nuevos conocimientos sobre esta ruta, ayudarán a desarrollar futuras dianas terapéuticas o descubrir nuevos marcadores para estas enfermedades.



# Conclusiones

---

1. Las isoformas p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  se compensan in vivo, lo que confirma lo observado en líneas celulares anteriormente. Este efecto de compensación impide que se produzca protección frente a la obesidad o a la esteatosis hepática al carecer de solo una de estas isoformas.
2. La carencia de p38 $\gamma/\delta$  protege frente al desarrollo de la obesidad.
3. Los animales p38 $\gamma/\delta^{-/-}$  están protegidos frente a la resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 inducida por la obesidad.
4. La carencia de p38 $\gamma/\delta$  protege del desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica inducida por obesidad .
5. La protección frente a la obesidad puede ser debida a un incremento del gasto energético y de actividad locomotora.
6. La carencia de p38 $\gamma/\delta$  en tejido mieloide protege frente al desarrollo de la esteatosis hepática producida por dietas deficientes en metionina y colina.
7. p38 $\gamma/\delta$  controla la infiltración y producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 en esteatosis hepática.
8. La aplicación exógena de IL-6 y TNF- $\alpha$  en animales carentes de p38 $\gamma/\delta$  en tejido mieloide produce la perdida del fenotipo de protección que se observa en estos animales.



# Agradecimientos

---





El final de una etapa es siempre triste y alegre a la vez. Tengo pena, porque ha sido un periodo largo de mi vida, en el cual he aprendido mucho, pero al mismo tiempo tengo alegría de saber que comenzaré nuevos desafíos y nuevas historias que agregar a mi vida.

Cuando llegue a España no era mi intención hacer el doctorado, pero el destino así lo quiso y no me arrepiento, porque debe ser una de las experiencias más duras que he vivido en la vida, y no es que me guste sufrir, pero los humanos siempre aprendemos más de las experiencias más difíciles, esas que nos hacen llorar y quitan toda nuestra energía.

Lo más duro no ha sido emprender camino fuera de mi tierra, que sin duda para los que saben a qué me refiero, es muy, muy difícil y te lleva mucho tiempo de adaptación...sin contar con todo el papeleo que hay que hacer y sin ayuda de nadie...No lo más difícil ha sido aprender del mundo de la ciencia...un mundo que jamás imagine sería así de complicado y fácil a la vez. El mundo de la ciencia es increíble, te pueden ocurrir las cosas más maravillosas y terribles del mundo en un solo día. Puedes trabajar horas y horas, hasta la madrugada y no ver un solo resultado positivo o algo que sirva, y por lo mismo tu trabajo puede no ser valorado...

He aprendido que en ciencias no puedes enfermarte ni ser débil, y que siempre puede haber alguien que con gusto acabe lo que has comenzado y nadie se acordará de lo que has hecho tú. También he aprendido que es uno de los pocos trabajos donde la imaginación es apreciada y donde la verdad da gusto venir a trabajar...por algo nos quedamos hasta tan tarde...esto nos hace felices, nos llena de esperanza y soñamos con el hecho de que al fin pueda salir lo que queremos...de que va a resultar todo bien.

A veces ocurre que todo va bien y puedes compartir tus ideas con tus amigos científicos mientras bebes unas cervezas, pensando en mil ideas y buscando soluciones a todo...que grandes momentos...jamás los voy a olvidar. Incluso cuando salíamos de viaje seguíamos hablando de ciencia; y lo hacíamos por gusto. La ciencia es un trabajo de pasión sin duda alguna. Ya que en que otro sitio se trabaja en paro o a media jornada haciendo más de 40 hrs semanales... y todo esto sin siquiera molestarnos...sin embargo, esto es algo de lo que también debemos aprender y ser autocríticos... no todo es culpa de la forma en que se han hecho las cosas hasta ahora...en nuestras manos está el poder cambiar las situaciones injustas que se viven en ciencias, ya que como dijo alguna vez Bertolt Brecht "la injusticia es humana pero más humana es la lucha contra la injusticia".

Por todo esto y mucho más el mundo de la ciencia es fascinante, es de luz y sombra, es atrayente y apasionante...un mundo del que estoy feliz de haber sido parte, a pesar de todo, a pesar de algunos.

Lo que me llevo en el corazón luego de vivir en el mundo de la ciencia es infinito, son sueños, son alegrías y tristezas, pero sobre todo son cosas que me han hecho crecer como ser humano, que siento que me han tocado el alma y que jamás podre olvidar, por esto, lo mínimo que puedo hacer en estos momentos en que acaba esta etapa de mi vida es agradecer a todos los que me han motivado, apoyado y han estado ahí para mí...

## Agradecimientos

---

A Guadalupe, agradezco el que me haya permitido hacer la tesis doctoral y que me haya enseñado en los inicios todo lo que sabía, pero por sobre todo que me haya mostrado lo difícil y fácil que la ciencia puede ser para unos u otros. Gracias por tu apoyo en esta tesis.

A Nuria mi codirectora de tesis y compañera de laboratorio agradezco su paciencia conmigo, especialmente en esta etapa de mi vida, donde la paciencia no ha sido mi característica. Mil gracias por tus fantásticas ediciones, siempre recordare con cariño tu esfuerzo...y espero te guste como haya escrito esta parte de la tesis que no la verás hasta muy tarde ☺

Quiero agradecer especialmente a mis compañeros de laboratorio, muchas gracias chicos por todo el apoyo y los buenos momentos en nuestro call center, en las poyatas y fuera del lab, siempre los recordaré. Eli, Bárbara, Edgar gracias por todo y mucho ánimo!!! que la recta final ya está cerca y les irá fantástico. Toñi, muchas gracias por tus consejos y por tu aporte al laboratorio, eres un sol y una mujer fantástica. A nuestros geniales técnicos Elena y Luis...mil gracias por hacernos la vida más fácil, por apoyarnos y aguantarnos en todo, son increíbles y espero la vida solo les traiga cosas buenas a los dos.

A mis "otros" compañeros de laboratorio en el CNIC a los Sancho, a los Paco, a los Ramiro, a los Pilar, a los Juanmi, muchas gracias chicos por estar ahí, por ayudar cuando se necesitaba, por prestarnos cosas y conocimientos...mil gracias. A Noe por las conversaciones de pasillo a las 10 de la noche y por siempre escuchar, a María por la alegría que pone al labo, a Adela por su amabilidad, Elena, a Ruth, a Salva, Helena, Sonia, Nahikari, Arantxa por sus conocimientos , ayuda y simpatía. Ufff espero no haber olvidado a nadie, porque todos los de la planta 2 y 1 norte merecen mi agradecimiento...muchas gracias a todos de corazón.

A todo el personal del CNIC, por su gran profesionalidad y por supuesto por la gran calidad humana, que hizo más fácil mi aprendizaje y estancia en este centro. Al personal de animalario por toda su ayuda y conocimientos entregados en estos años, a Juanjo, María José y Andrea que nos cortaron mil colitas y nos organizaron la colonia de ratones de manera maravillosa...muchas gracias.

A nuestro magnifico lab manager Antonio y la gran nueva adquisición del CNIC Laura ...muchas gracias por la ayuda en innumerables ocasiones en que los iba a molestar con preguntas de todo tipo, por responder mis dudas, por escuchar y realmente por ser la piedra base en donde se sustenta el departamento de Biología vascular e inflamación.

A Almudena y Eduardo, muchas gracias!!! son los mejores en lo que hacen, los más pacientes y con buena disposición para solucionar nuestros problemas...que no han sido pocos!!! Gracias.

Gracias a las unidades de Celómica, de Virus, de Bioinformática, de Compras, a las personas de Almacén, a las personas de Recursos Humanos, muchas gracias por el apoyo, por la ayuda y guía siempre ofrecida de manera amable.

A Petri por tener nuestra planta impecable y por las grandes conversaciones de cualquier tema a las tantas de la noche.

Al CNIC, muchas gracias por estos maravillosos años...son geniales.

Mi segunda parte de agradecimientos es muy especial, ya que comencé el doctorado en el CNB...y para los que no lo sabían hasta hace poco forme parte del CSIC, así que debo y quiero agradecer a esas increíbles personas con las que compartí casi dos años.

En los comienzos de mi doctorado en el CNB, estaba algo asustada por toda la nueva experiencia, pero pronto fui bienvenida por los predoctorales y doctores del CNB... chicos son maravillosos y es verdad que el ambiente de unión que hay en ese centro es inigualable. Cuanta ayuda, cuantos café y cervezas nos hemos tomado juntos. Como hemos visto que crecíamos y nos equivocábamos...cuantas experiencias juntos. Me alegro el haberlos conocido y sin duda son una de las mejores partes de haber hecho el doctorado.

A mis "compis" del 417 y 414 Eva, Sheila, Lola, Gloria....muchas gracias chicas han sido unas excelentes compañeras y amigas de laboratorio. Me hicieron sentir bienvenida a su grupo cuando estaba sola y eso jamás lo podre olvidar, especialmente nuestros desayunos y cuanta conversación de pasillo tuvimos...muchas gracias. También no puedo dejar de agradecer a Hugh y Mar, por lo mismo, ya que me aceptaron como una más del grupo y me hicieron sentir siempre bienvenida.

A Vicen...mi primer compañero de laboratorio en el 413, muchas gracias por tus chistes y por tu alegría, espero todo salga perfecto para ti y seguro lo logras de eso no tengo duda.

A todo el DIO, a mis amigos que siempre estuvieron ahí, que me alegraron el día, especialmente cuando estuve enferma y fueron el único apoyo que tuve. Mil gracias chicos!!!! son lo máximo...Laurita, Dimitrí, Rubén, Jorge, Javi, Julia, Denise, María, Gonzalo, Amaia, Lorena, Rosa a las italianas Rachele, Carla, Francesca... espero no haber olvidado a nadie...mil gracias, por los buenos momentos, por las conversaciones, por escuchar, por las ideas...en fin por estos años..Gracias!!!

A mis amigos a los que me hicieron sentir que no estaba sola en España: Pedro, Gema y Aracelí, muchas gracias, por "adoptarme" por hacerme sentir bien y querida, por responder mis múltiples dudas culturales, históricas y de cualquier índole...por ser pacientes y por sobre todo por ser mis amigos...gracias a ustedes quiero a esta tierra y estoy muy feliz de estar acá y ser una española más. Han hecho de estos años una aventura, con nuestros muchos viajes, y salidas...lo he pasado genial, son maravillosos y espero que recuerden que una parte de Chile los quiere con locura. Y por supuesto anhelo que algún día hagamos nuestro viaje al círculo polar y podamos ver las auroras boreales juntos. Un beso los quiero!!!!

A Myriam, muchas gracias por todo tu apoyo enana, juntas empezamos esta aventura en tierras lejanas y ahora comenzaremos otras nuevas...muchas gracias por tu apoyo, por ser mi amiga y hacerme los días más felices...y como dirías tú...te quiero chiquita!!!!

A Diana, muchas gracias plantita por hacer mis días de vacaciones en Chile bonitos, como si nunca me hubiera ido, por hacerme bienvenidas y despedidas, por acompañarme en todo, por preguntar siempre por mí, por ser mi apoyo en la distancia...Graciasjjjjjj

Una parte de mi no puede dejar de agradecer a las personas que me inspiraron en el inicio, cuando salí de la carrera de veterinaria y me impulsaron a seguir mis sueños con cariño y sabiduría...A mi querido Dr. González, muchas gracias por su apoyo en estos años, por enviarme chistes, por alentarme, por hacer que quisiera ser mejor. A la Dra. Nora Araya que dirigió mi tesis de pregrado, muchas gracias por decirme que si podía, que era capaz, por no renunciara a mis sueños, mil gracias por ser tan gran mentora, humilde y llena de sabiduría que me entregó un año de su vida sin orgullo o afán de protagonismo...mil gracias.

Debo y quiero agradecer a mi familia, a mi mamá...la mejor de todas, la más paciente, la que me da ánimos siempre, la que hace que mis pequeñas tormentas personales se calmen, la que me dice que todo irá bien y jamás se equivoca...mil gracias mamá por ser un ejemplo de fortaleza en mi vida y de bondad, doy especial gracias por eso porque tu corazón es invaluable y te quiero mucho. A mi hermana por su apoyo e innumerables traducciones, muchas gracias Coté, eres capaz de muchas cosas, eres inteligente y muy divertida y espero todos tus sueños se hagan realidad. A mi papá muchas gracias por impulsarme por darme apoyo y ayudarme a cumplir mis metas y sueños personales. A mi tío Christian, que aunque sé jamás me dejaste decirte tío, lo eres y te doy las gracias por el sacrificio enorme que hiciste en vida por nosotros y que dejo en parte cumplir con mis sueños...muchas gracias donde quiera que estés. A mi abuelita querida...mi única abuelita!!! muchas gracias por darme todo tú cariño siempre. A mi hermano Diego, por sus enseñanzas y ejemplo de vida...que me recuerdan lo afortunada que soy, y que no debo darme por vencida jamás...los quiero!!!

Finalmente tengo que hacer dos agradecimientos que son bastante poco convencionales y más de alguno no comprenderá, especialmente porque el mundo de la ciencia se caracteriza por ser racional, pero los quiero hacer porque se lo merecen y porque me sale del corazón...

A Dios, porque también hay científicos con fé!!! y no puedo dejar de agradecerle a él las oportunidades que me ha dado en esta vida, llena de momentos fantásticos que me ayudan a crecer...Gracias!!!.

Y debo agradecer a esos seres que dan día a día su vida por el avance de la ciencia. Muchas gracias a todos los animales de laboratorio que utilice, a los que usan otros científicos y que han permitido los más grandes e increíbles descubrimientos de la humanidad, que permiten que tengamos medicinas, vacunas, que nos ayudaron a llegar al espacio, que permiten que millones de seres humanos vivan mejor...mil gracias...algún día el hombre reconocerá este sacrificio, no le parecerá ridículo y podremos ser lo suficientemente inteligentes para no depender de ustedes.

Gracias a todos los que han sido parte de esta aventura!!!!



# Bibliografía

---



## Bibliografía

1. OMS, O.M.d.I.S., *Obesity and overweight*. 2006.
2. OMS, O.M.d.I.S.D.d.N.p.I.S.y.e.D.N.B.d.D.G.s.e.I.O., *Prevalence of obesity, ages 20+, age standardized. Both sexes, 2008*. 2008.
3. OMS, O.M.d.I.S., *Obesity: Preventing and managing the global epidemic*. WHO Technical Report Series, 2000(894).
4. OMS, O.M.d.I.S.O.d.S.G.G. [Obesity: Situation and trends] 2008; Available from: [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/obesity\\_text/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/).
5. Taskforce, I.O. *The Global Epidemic*. 2010; Available from: <http://www.iaso.org/iotf/obesity/obesitytheglobalepidemic/>.
6. Horton, E.S., *Role of environmental factors in the development of noninsulin-dependent diabetes mellitus*. Am J Med, 1983. **75**(5B): p. 32-40.
7. Boden, G., *Free fatty acids-the link between obesity and insulin resistance*. Endocr Pract, 2001. **7**(1): p. 44-51.
8. Cruz, N.G., et al., *The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2012.
9. Costello, M.F., et al., *The treatment of infertility in polycystic ovary syndrome: a brief update*. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2012. **52**(4): p. 400-3.
10. Motta, A.B., *The role of obesity in the development of polycystic ovary syndrome*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(17): p. 2482-91.
11. Subramanian, S. and A. Chait, *Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(5): p. 819-25.
12. Nikolopoulou, A. and N.P. Kadoglou, *Obesity and metabolic syndrome as related to cardiovascular disease*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2012. **10**(7): p. 933-9.
13. Muller, M.J., et al., *Beyond the body mass index: tracking body composition in the pathogenesis of obesity and the metabolic syndrome*. Obes Rev, 2012. **13 Suppl 2**: p. 6-13.
14. Dulloo, A.G. and J.P. Montani, *Body composition, inflammation and thermogenesis in pathways to obesity and the metabolic syndrome: an overview*. Obes Rev, 2012. **13 Suppl 2**: p. 1-5.
15. Landsberg, L., et al., *Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment: a position paper of the obesity society and the american society of hypertension*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2013. **15**(1): p. 14-33.
16. Sowers, J.R., A. Whaley-Connell, and M.R. Hayden, *The Role of Overweight and Obesity in the Cardiorenal Syndrome*. Cardiorenal Med, 2011. **1**(1): p. 5-12.
17. Roos, C.J., P.H. Quax, and J.W. Jukema, *Cardiovascular metabolic syndrome: mediators involved in the pathophysiology from obesity to coronary heart disease*. Biomark Med, 2012. **6**(1): p. 35-52.
18. Chrysant, S.G. and G.S. Chrysant, *New insights into the true nature of the obesity paradox and the lower cardiovascular risk*. J Am Soc Hypertens, 2013. **7**(1): p. 85-94.
19. Mandavia, C.H., et al., *Over-nutrition and metabolic cardiomyopathy*. Metabolism, 2012. **61**(9): p. 1205-10.
20. Allman-Farinelli, M.A., *Obesity and venous thrombosis: a review*. Semin Thromb Hemost, 2011. **37**(8): p. 903-7.
21. Mannarino, M.R., F. Di Filippo, and M. Pirro, *Obstructive sleep apnea syndrome*. Eur J Intern Med, 2012. **23**(7): p. 586-93.
22. S., O., et al., *Litiasis vesicular: Su relación con el Síndrome Metabólico y la Obesidad*. REVISTA BIOQUIMICA Y PATOLOGIA CLINICA, 2008. **72**(2): p. 29-34.



23. Leamy, A.K., R.A. Egnatchik, and J.D. Young, *Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease*. Prog Lipid Res, 2013. **52**(1): p. 165-74.
24. Anand, G. and P.O. Katz, *Gastroesophageal reflux disease and obesity*. Rev Gastroenterol Disord, 2008. **8**(4): p. 233-9.
25. Sokolove, J. and C.M. Lepus, *Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations*. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2013. **5**(2): p. 77-94.
26. Ferraz-Amaro, I., et al., *Metabolic syndrome in rheumatoid arthritis*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 710928.
27. Berenbaum, F., F. Eymard, and X. Houard, *Osteoarthritis, inflammation and obesity*. Curr Opin Rheumatol, 2013. **25**(1): p. 114-8.
28. Nocera, J., et al., *The impact of behavioral intervention on obesity mediated declines in mobility function: implications for longevity*. J Aging Res, 2011. **2011**: p. 392510.
29. Lash, M.M. and A. Armstrong, *Impact of obesity on women's health*. Fertil Steril, 2009. **91**(5): p. 1712-6.
30. Jungheim, E.S., et al., *Obesity and reproductive function*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2012. **39**(4): p. 479-93.
31. Hahler, B., *An overview of dermatological conditions commonly associated with the obese patient*. Ostomy Wound Manage, 2006. **52**(6): p. 34-6, 38, 40 passim.
32. Shipman, A.R. and G.W. Millington, *Obesity and the skin*. Br J Dermatol, 2011. **165**(4): p. 743-50.
33. Vucenik, I. and J.P. Stains, *Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1271**: p. 37-43.
34. Pater, L.E., et al., *Relationship between prostate-specific antigen, age, and body mass index in a prostate cancer screening population*. Am J Clin Oncol, 2012. **35**(5): p. 490-2.
35. Ma, Y., et al., *Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53916.
36. Haakinson, D.J., et al., *The impact of obesity on breast cancer: a retrospective review*. Ann Surg Oncol, 2012. **19**(9): p. 3012-8.
37. McCullough, N., O. Muldoon, and M. Dempster, *Self-perception in overweight and obese children: a cross-sectional study*. Child Care Health Dev, 2009. **35**(3): p. 357-64.
38. Hawkins, M.A. and J.C. Stewart, *Do negative emotional factors have independent associations with excess adiposity?* J Psychosom Res, 2012. **73**(4): p. 243-50.
39. Dahl, A.K. and L.B. Hassing, *Obesity and Cognitive Aging*. Epidemiol Rev, 2012.
40. Coleman, A.L. and G. Kodjebacheva, *Risk factors for glaucoma needing more attention*. Open Ophthalmol J, 2009. **3**: p. 38-42.
41. Cheung, N. and T.Y. Wong, *Obesity and eye diseases*. Surv Ophthalmol, 2007. **52**(2): p. 180-95.
42. Chakravarthy, U., et al., *Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis*. BMC Ophthalmol, 2010. **10**: p. 31.
43. Shaw, J.E., R.A. Sicree, and P.Z. Zimmet, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. **87**(1): p. 4-14.
44. James, D.E. and R.C. Piper, *Insulin resistance, diabetes, and the insulin-regulated trafficking of GLUT-4*. J Cell Biol, 1994. **126**(5): p. 1123-6.
45. Lacy, P.E., *Endocrine secretory mechanisms. A review*. Am J Pathol, 1975. **79**(1): p. 170-88.
46. Rorsman, P. and E. Renstrom, *Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells*. Diabetologia, 2003. **46**(8): p. 1029-45.
47. Aguilar-Bryan, L., et al., *Toward understanding the assembly and structure of KATP channels*. Physiol Rev, 1998. **78**(1): p. 227-45.

48. Chang, L., S.H. Chiang, and A.R. Saltiel, *Insulin signaling and the regulation of glucose transport*. Mol Med, 2004. **10**(7-12): p. 65-71.
49. White, M.F., *The insulin signalling system and the IRS proteins*. Diabetologia, 1997. **40 Suppl 2**: p. S2-17.
50. Muoio, D.M. and C.B. Newgard, *Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 193-205.
51. Pessin, J.E. and A.R. Saltiel, *Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 165-9.
52. Shulman, G.I., *Cellular mechanisms of insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 171-6.
53. Gual, P., et al., *MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632*. Diabetologia, 2003. **46**(11): p. 1532-42.
54. Greene, M.W., et al., *Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8199-211.
55. Harrington, L.S., et al., *The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins*. J Cell Biol, 2004. **166**(2): p. 213-23.
56. Shah, O.J., Z. Wang, and T. Hunter, *Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies*. Curr Biol, 2004. **14**(18): p. 1650-6.
57. Gao, Z., et al., *Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(8): p. 2024-34.
58. Tzatsos, A. and K.V. Kandror, *Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(1): p. 63-76.
59. Furukawa, N., et al., *Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis*. Cell Metab, 2005. **2**(2): p. 119-29.
60. Danielsson, A., et al., *Short-term overeating induces insulin resistance in fat cells in lean human subjects*. Mol Med, 2009. **15**(7-8): p. 228-34.
61. Liu, H.Y., et al., *Prolonged treatment of primary hepatocytes with oleate induces insulin resistance through p38 mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2007. **282**(19): p. 14205-12.
62. Archuleta, T.L., et al., *Oxidant stress-induced loss of IRS-1 and IRS-2 proteins in rat skeletal muscle: role of p38 MAPK*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(10): p. 1486-93.
63. Goldstein, B.J., et al., *Regulation of insulin action by protein tyrosine phosphatases*. Vitam Horm, 1998. **54**: p. 67-96.
64. Kulas, D.T., B.J. Goldstein, and R.A. Mooney, *The transmembrane protein-tyrosine phosphatase LAR modulates signaling by multiple receptor tyrosine kinases*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 748-54.
65. Goldstein, B.J., et al., *Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein*. J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 4283-9.
66. Hashimoto, N., W.R. Zhang, and B.J. Goldstein, *Insulin receptor and epidermal growth factor receptor dephosphorylation by three major rat liver protein-tyrosine phosphatases expressed in a recombinant bacterial system*. Biochem J, 1992. **284** ( Pt 2): p. 569-76.

67. Lu, X.M., R. Tompkins, and A. Fischman, *Burn injury-induced IRS-1 degradation in mouse skeletal muscle*. Int J Burns Trauma, 2013. **3**(1): p. 37-48.
68. Rui, L., et al., *SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 42394-8.
69. Balasubramanyam, M., R. Sampathkumar, and V. Mohan, *Is insulin signaling molecules misguided in diabetes for ubiquitin-proteasome mediated degradation?* Mol Cell Biochem, 2005. **275**(1-2): p. 117-25.
70. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haeften, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. Lancet, 2005. **365**(9467): p. 1333-46.
71. Mlinar, B. and J. Marc, *New insights into adipose tissue dysfunction in insulin resistance*. Clin Chem Lab Med, 2011. **49**(12): p. 1925-35.
72. Samuel, V.T., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism*. Lancet, 2010. **375**(9733): p. 2267-77.
73. Dresner, A., et al., *Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity*. J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 253-9.
74. Vamecq, J., et al., *Mitochondrial dysfunction and lipid homeostasis*. Curr Drug Metab, 2012. **13**(10): p. 1388-400.
75. Griffin, M.E., et al., *Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade*. Diabetes, 1999. **48**(6): p. 1270-4.
76. Kim, J.K., et al., *PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance*. J Clin Invest, 2004. **114**(6): p. 823-7.
77. Itani, S.I., et al., *Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I $\kappa$ B $\alpha$* . Diabetes, 2002. **51**(7): p. 2005-11.
78. Hotamisligil, G.S., et al., *IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance*. Science, 1996. **271**(5249): p. 665-8.
79. Matthews, V.B., et al., *Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance*. Diabetologia, 2010. **53**(11): p. 2431-41.
80. Seki, E., D.A. Brenner, and M. Karin, *A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches*. Gastroenterology, 2012. **143**(2): p. 307-20.
81. Vallerie, S.N. and G.S. Hotamisligil, *The role of JNK proteins in metabolism*. Sci Transl Med, 2010. **2**(60): p. 60rv5.
82. Nieto-Vazquez, I., et al., *Insulin resistance associated to obesity: the link TNF- $\alpha$* . Arch Physiol Biochem, 2008. **114**(3): p. 183-94.
83. Yang, X., et al., *Relative contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced lipolysis in adipocytes*. J Biol Chem, 2011. **286**(47): p. 40477-85.
84. Cawthorn, W.P. and J.K. Sethi, *TNF- $\alpha$  and adipocyte biology*. FEBS Lett, 2008. **582**(1): p. 117-31.
85. Sethi, J.K., et al., *Characterisation of receptor-specific TNF $\alpha$  functions in adipocyte cell lines lacking type 1 and 2 TNF receptors*. FEBS Lett, 2000. **469**(1): p. 77-82.
86. Moller, D.E., *Potential role of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes*. Trends Endocrinol Metab, 2000. **11**(6): p. 212-7.
87. Senn, J.J., et al., *Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13740-6.

88. Franckhauser, S., et al., *Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice*. *Diabetologia*, 2008. **51**(7): p. 1306-16.
89. Kubota., N., et al., *Adiponectin-Dependent and -Independent Pathways in Insulin-Sensitizing and Antidiabetic Actions of Thiazolidinediones*. *Diabetes*, 2006. **55**: p. s2-s37.
90. Steinberg, G.R. and B.E. Kemp, *AMPK in Health and Disease*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(3): p. 1025-78.
91. Kodiha and Stochaj, *Targeting AMPK for Therapeutic Intervention in Type 2 Diabetes*. *Medical Complications of Type 2 Diabetes*, Dr. Colleen Croniger (Ed.), 2011.
92. Yoon, M.J., et al., *Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha*. *Diabetes*, 2006. **55**(9): p. 2562-70.
93. Yamauchi, T., et al., *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects*. *Nature*, 2003. **423**(6941): p. 762-9.
94. Muoio, D.M., et al., *Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle*. *Diabetes*, 1997. **46**(8): p. 1360-3.
95. Schapira, A.H.V., *Mitochondrial diseases*. *The Lancet*. **379**(9828): p. 1825-1834.
96. Goodpaster, B.H., *Mitochondrial deficiency is associated with insulin resistance*. *Diabetes*, 2013. **62**(4): p. 1032-5.
97. Schiff, M., et al., *Mitochondria and diabetes mellitus: untangling a conflictive relationship?* *J Inherit Metab Dis*, 2009. **32**(6): p. 684-98.
98. Ritov, V.B., et al., *Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. **298**(1): p. E49-58.
99. Turner, N. and L.K. Heilbronn, *Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance?* *Trends Endocrinol Metab*, 2008. **19**(9): p. 324-30.
100. Matveyenko, A.V. and P.C. Butler, *Beta-cell deficit due to increased apoptosis in the human islet amyloid polypeptide transgenic (HIP) rat recapitulates the metabolic defects present in type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2006. **55**(7): p. 2106-14.
101. Butler, A.E., et al., *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2003. **52**(1): p. 102-10.
102. Fonseca, S.G., J. Gromada, and F. Urano, *Endoplasmic reticulum stress and pancreatic  $\beta$ -cell death*. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 2011. **22**(7): p. 266-274.
103. Samuel, V.T. and G.I. Shulman, *Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links*. *Cell*, 2012. **148**(5): p. 852-71.
104. Poitout, V. and R.P. Robertson, *Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction*. *Endocr Rev*, 2008. **29**(3): p. 351-66.
105. Robertson, R.P., *Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes*. *Curr Opin Pharmacol*, 2006. **6**(6): p. 615-9.
106. Pierce, M., et al., *Risk and prevention of type II diabetes: offspring's views*. *Br J Gen Pract*, 2001. **51**(464): p. 194-9.
107. S., S., *THE GENETICS OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS : A REVIEW* *Journal of Scientific Research*, 2011. **55**: p. 35-48.
108. Yatsuji, S., et al., *Clinical features and outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis compared with cirrhosis caused by chronic hepatitis C*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **24**(2): p. 248-54.
109. Neuschwander-Tetri, B.A. and S.H. Caldwell, *Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference*. *Hepatology*, 2003. **37**(5): p. 1202-1219.

110. Farrell, G.C. and C.Z. Larter, *Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S99-S112.
111. Sheth, S.G., F.D. Gordon, and S. Chopra, *Nonalcoholic steatohepatitis*. Ann Intern Med, 1997. **126**(2): p. 137-45.
112. Ludwig, J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. Mayo Clin Proc, 1980. **55**(7): p. 434-8.
113. Adams, L.A. and P. Angulo, *Treatment of non-alcoholic fatty liver disease*. Postgrad Med J, 2006. **82**(967): p. 315-22.
114. Venook, A.P., et al., *The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective*. Oncologist, 2010. **15** Suppl 4: p. 5-13.
115. Belfiore, F. and S. Iannello, *Insulin resistance in obesity: metabolic mechanisms and measurement methods*. Mol Genet Metab, 1998. **65**(2): p. 121-8.
116. Machado, M. and H. Cortez-Pinto, *Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005. **17**(8): p. 823-6.
117. Angulo, P., et al., *Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 1999. **30**(6): p. 1356-62.
118. Cortez-Pinto, H., et al., *Non-alcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome?* Clin Nutr, 1999. **18**(6): p. 353-8.
119. Reid, A.E., *Nonalcoholic steatohepatitis*. Gastroenterology, 2001. **121**(3): p. 710-23.
120. Perez Aguilar, F., et al., *Non-alcoholic steatohepatitis: physiopathological, clinical and therapeutic implications*. Rev Esp Enferm Dig, 2004. **96**(9): p. 628-39; 440-8.
121. Loria, P., A. Lonardo, and F. Anania, *Liver and diabetes. A vicious circle*. Hepatol Res, 2013. **43**(1): p. 51-64.
122. Browning, J.D. and J.D. Horton, *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury*. The Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**(2): p. 147-152.
123. Stoeckman, A.K. and H.C. Towle, *The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 27029-35.
124. Kersten, S., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting*. J Clin Invest, 1999. **103**(11): p. 1489-98.
125. Koo, S.-H., A.K. Dutcher, and H.C. Towle, *Glucose and Insulin Function through Two Distinct Transcription Factors to Stimulate Expression of Lipogenic Enzyme Genes in Liver*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(12): p. 9437-9445.
126. Memon, R.A., et al., *Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice*. Endocrinology, 2000. **141**(11): p. 4021-31.
127. Matsusue, K., et al., *Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes*. J Clin Invest, 2003. **111**(5): p. 737-47.
128. Shimomura, I., Y. Bashmakov, and J.D. Horton, *Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30028-32.
129. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor*. Cell, 1994. **79**(7): p. 1147-56.
130. Jones, J.R., et al., *Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(17): p. 6207-12.
131. Perez-Aguilar, F., *[Etiopathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis]*. Gastroenterol Hepatol, 2005. **28**(7): p. 396-406.

132. Rolo, A.P., J.S. Teodoro, and C.M. Palmeira, *Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(1): p. 59-69.
133. Kojima, H., et al., *Mitochondrial abnormality and oxidative stress in nonalcoholic steatohepatitis*. Alcohol Clin Exp Res, 2007. **31**(1 Suppl): p. S61-6.
134. Pessayre, D., et al., *Mitochondria in steatohepatitis*. Semin Liver Dis, 2001. **21**(1): p. 57-69.
135. Videla, L.A., et al., *Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients*. Clin Sci (Lond), 2004. **106**(3): p. 261-8.
136. Kaplan, L.M., *Leptin, obesity, and liver disease*. Gastroenterology, 1998. **115**(4): p. 997-1001.
137. Marchesini, G., et al., *Metformin in non-alcoholic steatohepatitis*. Lancet, 2001. **358**(9285): p. 893-4.
138. Chen, J., et al., *Inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal (HNE). Role of HNE adduct formation with the enzyme subunits*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1380**(3): p. 336-44.
139. Farrell, G.C., et al., *NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications*. Gut Liver, 2012. **6**(2): p. 149-71.
140. Chen, Z., et al., *MAP kinases*. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2449-76.
141. Yang, S.H., A.D. Sharrocks, and A.J. Whitmarsh, *MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation*. Gene, 2013. **513**(1): p. 1-13.
142. Wagner, E.F. and A.R. Nebreda, *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 537-49.
143. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. FASEB J, 1995. **9**(9): p. 726-35.
144. Raman, M. and M.H. Cobb, *MAP kinase modules: many roads home*. Curr Biol, 2003. **13**(22): p. R886-8.
145. Grewal, S., D.M. Molina, and L. Bardwell, *Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-docking sites in MAPK kinases function as tethers that are crucial for MAPK regulation in vivo*. Cell Signal, 2006. **18**(1): p. 123-34.
146. Ray, L.B. and T.W. Sturgill, *Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells*. J Biol Chem, 1988. **263**(25): p. 12721-7.
147. Gotoh, Y., et al., *Microtubule-associated-protein (MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. Identity with the mitogen-activated MAP kinase of fibroblastic cells*. Eur J Biochem, 1990. **193**(3): p. 661-9.
148. Boulton, T.G., et al., *An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control*. Science, 1990. **249**(4964): p. 64-7.
149. Boulton, T.G., et al., *ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF*. Cell, 1991. **65**(4): p. 663-75.
150. Kolch, W., *Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(11): p. 827-37.
151. Blank, J.L., et al., *Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathways involving mitogen-activated protein kinase and c-Jun kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5361-8.
152. Karandikar, M., S. Xu, and M.H. Cobb, *MEKK1 binds raf-1 and the ERK2 cascade components*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40120-7.
153. Chadee, D.N. and J.M. Kyriakis, *MLK3 is required for mitogen activation of B-Raf, ERK and cell proliferation*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(8): p. 770-6.
154. Gotoh, Y. and E. Nishida, *Activation mechanism and function of the MAP kinase cascade*. Mol Reprod Dev, 1995. **42**(4): p. 486-92.

155. Salmeron, A., et al., *Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase*. EMBO J, 1996. **15**(4): p. 817-26.
156. Gotoh, I., M. Adachi, and E. Nishida, *Identification and characterization of a novel MAP kinase kinase kinase, MLTK*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 4276-86.
157. MacGillivray, M.K., T.F. Cruz, and C.A. McCulloch, *The recruitment of the interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase (IRAK) into focal adhesion complexes is required for IL-1beta -induced ERK activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(31): p. 23509-15.
158. Waetzig, V. and T. Herdegen, *MEKK1 controls neurite regrowth after experimental injury by balancing ERK1/2 and JNK2 signaling*. Mol Cell Neurosci, 2005. **30**(1): p. 67-78.
159. Lange-Carter, C.A., et al., *A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf*. Science, 1993. **260**(5106): p. 315-9.
160. Lu, Z., et al., *The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2*. Mol Cell, 2002. **9**(5): p. 945-56.
161. Marais, R., J. Wynne, and R. Treisman, *The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain*. Cell, 1993. **73**(2): p. 381-93.
162. Pages, G., et al., *Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1374-7.
163. Yao, Y., et al., *Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12759-64.
164. Hatano, N., et al., *Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development*. Genes Cells, 2003. **8**(11): p. 847-56.
165. Saba-El-Leil, M.K., et al., *An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development*. EMBO Rep, 2003. **4**(10): p. 964-8.
166. Tran, S.E., et al., *MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16484-90.
167. Kitagawa, D., et al., *Activation of extracellular signal-regulated kinase by ultraviolet is mediated through Src-dependent epidermal growth factor receptor phosphorylation. Its implication in an anti-apoptotic function*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 366-71.
168. Park, J.S., et al., *Roles for basal and stimulated p21(Cip-1/WAF1/MDA6) expression and mitogen-activated protein kinase signaling in radiation-induced cell cycle checkpoint control in carcinoma cells*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(12): p. 4231-46.
169. Lu, Z. and S. Xu, *ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis*. IUBMB Life, 2006. **58**(11): p. 621-31.
170. Foncea, R., et al., *Extracellular regulated kinase, but not protein kinase C, is an antiapoptotic signal of insulin-like growth factor-1 on cultured cardiac myocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273**(2): p. 736-44.
171. Nagata, Y. and K. Todokoro, *Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis*. Blood, 1999. **94**(3): p. 853-63.
172. Buckley, S., et al., *ERK activation protects against DNA damage and apoptosis in hyperoxic rat AEC2*. Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 1): p. L159-66.
173. Kim, S.J., et al., *ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status*. J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 1332-9.
174. Wang, X., et al., *The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival*. Biochem J, 1998. **333** ( Pt 2): p. 291-300.

175. Anderson, C.N. and A.M. Tolkovsky, *A role for MAPK/ERK in sympathetic neuron survival: protection against a p53-dependent, JNK-independent induction of apoptosis by cytosine arabinoside*. J Neurosci, 1999. **19**(2): p. 664-73.
176. Cheung, E.C. and R.S. Slack, *Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis*. Sci STKE, 2004. **2004**(251): p. PE45.
177. Kulich, S.M. and C.T. Chu, *Sustained extracellular signal-regulated kinase activation by 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease*. J Neurochem, 2001. **77**(4): p. 1058-66.
178. Tang, D., et al., *ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53*. J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 12710-7.
179. Billecke, C., et al., *Polynuclear platinum anticancer drugs are more potent than cisplatin and induce cell cycle arrest in glioma*. Neuro Oncol, 2006. **8**(3): p. 215-26.
180. Zhou, G., Z.Q. Bao, and J.E. Dixon, *Components of a new human protein kinase signal transduction pathway*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12665-9.
181. Lee, J.D., R.J. Ulevitch, and J. Han, *Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **213**(2): p. 715-24.
182. Mody, N., et al., *An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro*. Biochem J, 2003. **372**(Pt 2): p. 567-75.
183. Hayashi, M. and J.D. Lee, *Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice*. J Mol Med (Berl), 2004. **82**(12): p. 800-8.
184. Kato, Y., et al., *Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor*. Nature, 1998. **395**(6703): p. 713-6.
185. Carvajal-Vergara, X., et al., *Multifunctional role of Erk5 in multiple myeloma*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4492-9.
186. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine*. J Biol Chem, 1990. **265**(28): p. 17355-63.
187. Ip, Y.T. and R.J. Davis, *Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(2): p. 205-19.
188. Bode, A.M. and Z. Dong, *The functional contrariety of JNK*. Mol Carcinog, 2007. **46**(8): p. 591-8.
189. Fleming, Y., et al., *Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7*. Biochem J, 2000. **352 Pt 1**: p. 145-54.
190. Weston, C.R. and R.J. Davis, *The JNK signal transduction pathway*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(2): p. 142-9.
191. Verrecchia, F., et al., *A central role for the JNK pathway in mediating the antagonistic activity of pro-inflammatory cytokines against transforming growth factor-beta-driven SMAD3/4-specific gene expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1585-93.
192. Chow, C.W., et al., *Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway*. Science, 1997. **278**(5343): p. 1638-41.
193. Chow, C.W., et al., *c-Jun NH(2)-terminal kinase inhibits targeting of the protein phosphatase calcineurin to NFATc1*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(14): p. 5227-34.
194. Fuchs, S.Y., et al., *MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10541-6.
195. Gupta, S., et al., *Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway*. Science, 1995. **267**(5196): p. 389-93.



196. Kaminska, B., et al., *Rapid phosphorylation of Elk-1 transcription factor and activation of MAP kinase signal transduction pathways in response to visual stimulation*. Mol Cell Neurosci, 1999. **13**(6): p. 405-14.
197. Minden, A., et al., *c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(10): p. 6683-8.
198. Chen, Y.R., C.F. Meyer, and T.H. Tan, *Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 631-4.
199. Zhang, W. and H.T. Liu, *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. Cell Res, 2002. **12**(1): p. 9-18.
200. Oh, S.W., et al., *JNK regulates lifespan in Caenorhabditis elegans by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(12): p. 4494-9.
201. Nateri, A.S., B. Spencer-Dene, and A. Behrens, *Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development*. Nature, 2005. **437**(7056): p. 281-5.
202. Kuan, C.Y., et al., *The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development*. Neuron, 1999. **22**(4): p. 667-76.
203. Masuda, A., et al., *Th2 cytokine production from mast cells is directly induced by lipopolysaccharide and distinctly regulated by c-Jun N-terminal kinase and p38 pathways*. J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3801-10.
204. Chen, C.Y., et al., *Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway*. Science, 1998. **280**(5371): p. 1945-9.
205. Huang, C., K. Jacobson, and M.D. Schaller, *MAP kinases and cell migration*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 20): p. 4619-28.
206. Yamauchi, J., et al., *Endothelin suppresses cell migration via the JNK signaling pathway in a manner dependent upon Src kinase, Rac1, and Cdc42*. FEBS Lett, 2002. **527**(1-3): p. 284-8.
207. Hirosumi, J., et al., *A central role for JNK in obesity and insulin resistance*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 333-6.
208. AE, F., et al., *Increased C-jun N terminal kinase (JNK) activity may link insulin resistance and inflammation in human central obesity*. Endocrine Abstracts; 23rd Joint Meeting of the British Endocrine Societies with the European Federation of Endocrine Societies, 2004. **7**(49).
209. Tuncman, G., et al., *Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(28): p. 10741-6.
210. Aguirre, V., et al., *The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307)*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 9047-54.
211. Lee, Y.H., et al., *c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade*. J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 2896-902.
212. Sabio, G., et al., *A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance*. Science, 2008. **322**(5907): p. 1539-43.
213. Sabio, G., et al., *Role of muscle c-Jun NH2-terminal kinase 1 in obesity-induced insulin resistance*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(1): p. 106-15.
214. Sabio, G., et al., *Prevention of steatosis by hepatic JNK1*. Cell Metab, 2009. **10**(6): p. 491-8.
215. Han, M.S., et al., *JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation*. Science, 2013. **339**(6116): p. 218-22.
216. Sabio, G., et al., *Role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in metabolic regulation by JNK1*. Genes Dev, 2010. **24**(3): p. 256-64.

217. Belgardt, B.F., et al., *Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(13): p. 6028-33.
218. Han, J., et al., *A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells*. Science, 1994. **265**(5173): p. 808-11.
219. Lee, J.C., et al., *A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis*. Nature, 1994. **372**(6508): p. 739-46.
220. Rouse, J., et al., *A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins*. Cell, 1994. **78**(6): p. 1027-37.
221. Freshney, N.W., et al., *Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27*. Cell, 1994. **78**(6): p. 1039-49.
222. Kim, E.K. and E.-J. Choi, *Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2010. **1802**(4): p. 396-405.
223. Raingeaud, J., et al., *MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 1247-55.
224. Cuenda, A., et al., *Purification and cDNA cloning of SAPKK3, the major activator of RK/p38 in stress- and cytokine-stimulated monocytes and epithelial cells*. EMBO J, 1996. **15**(16): p. 4156-64.
225. Remy, G., et al., *Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3*. Cell Signal, 2010. **22**(4): p. 660-7.
226. Cuenda, A., et al., *Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38)*. EMBO J, 1997. **16**(2): p. 295-305.
227. Brancho, D., et al., *Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo*. Genes Dev, 2003. **17**(16): p. 1969-78.
228. Cuevas, B.D., A.N. Abell, and G.L. Johnson, *Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3159-71.
229. Tanaka, N., et al., *Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis*. EMBO Rep, 2002. **3**(8): p. 785-91.
230. Wang, L., et al., *Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for activation of p38alpha and p38delta MAPK isoforms by TGF-beta 1 in murine mesangial cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 47257-62.
231. Alonso, G., et al., *Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40641-8.
232. Jiang, Y., et al., *Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17920-6.
233. Lechner, C., et al., *ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4355-9.
234. Stein, B., et al., *p38-2, a novel mitogen-activated protein kinase with distinct properties*. J Biol Chem, 1997. **272**(31): p. 19509-17.
235. Li, Z., et al., *The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **228**(2): p. 334-40.
236. Goedert, M., et al., *Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases*. EMBO J, 1997. **16**(12): p. 3563-71.
237. Lee, J.C., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials*. Pharmacol Ther, 1999. **82**(2-3): p. 389-97.

238. Court, N.W., et al., *Cardiac expression and subcellular localization of the p38 mitogen-activated protein kinase member, stress-activated protein kinase-3 (SAPK3)*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(4): p. 413-26.
239. Uddin, S., et al., *Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 147-52.
240. Hale, K.K., et al., *Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 4246-52.
241. Hu, M.C., et al., *Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines*. J Biol Chem, 1999. **274**(11): p. 7095-102.
242. Gonzalez-Teran, B., et al., *Eukaryotic elongation factor 2 controls TNF-alpha translation in LPS-induced hepatitis*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 164-78.
243. Ittner, A., et al., *Regulation of PTEN activity by p38delta-PKD1 signaling in neutrophils confers inflammatory responses in the lung*. J Exp Med, 2012. **209**(12): p. 2229-46.
244. Jiang, Y., et al., *Structure-function studies of p38 mitogen-activated protein kinase. Loop 12 influences substrate specificity and autophosphorylation, but not upstream kinase selection*. J Biol Chem, 1997. **272**(17): p. 11096-102.
245. Wang, Z., et al., *The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-A resolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2327-32.
246. Wang, Z., et al., *Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases*. Structure, 1998. **6**(9): p. 1117-28.
247. Patel, S.B., et al., *The three-dimensional structure of MAP kinase p38beta: different features of the ATP-binding site in p38beta compared with p38alpha*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2009. **65**(Pt 8): p. 777-85.
248. Bellon, S., et al., *The structure of phosphorylated p38gamma is monomeric and reveals a conserved activation-loop conformation*. Structure, 1999. **7**(9): p. 1057-65.
249. Gum, R.J., et al., *Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket*. J Biol Chem, 1998. **273**(25): p. 15605-10.
250. Evers, P.A., et al., *Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution*. Chem Biol, 1998. **5**(6): p. 321-8.
251. Wilson, K.P., et al., *Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27696-700.
252. Ding, C., *Drug evaluation: VX-702, a MAP kinase inhibitor for rheumatoid arthritis and acute coronary syndrome*. Curr Opin Investig Drugs, 2006. **7**(11): p. 1020-5.
253. Hope, H.R., et al., *Anti-inflammatory properties of a novel N-phenyl pyridinone inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase: preclinical-to-clinical translation*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **331**(3): p. 882-95.
254. Iwano, S., et al., *A possible mechanism for hepatotoxicity induced by BIRB-796, an orally active p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor*. J Appl Toxicol, 2011. **31**(7): p. 671-7.
255. Kuma, Y., et al., *BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19472-9.
256. Hazzalin, C.A., et al., *p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient*. Curr Biol, 1996. **6**(8): p. 1028-31.

257. Raingeaud, J., et al., *Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7420-6.
258. Tan, Y., et al., *FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2*. EMBO J, 1996. **15**(17): p. 4629-42.
259. Han, J., et al., *Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation*. Nature, 1997. **386**(6622): p. 296-9.
260. Zhao, M., et al., *Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 21-30.
261. Yang, S.H., A. Galanis, and A.D. Sharrocks, *Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(6): p. 4028-38.
262. Janknecht, R. and T. Hunter, *Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a*. EMBO J, 1997. **16**(7): p. 1620-7.
263. Price, M.A., F.H. Cruzalegui, and R. Treisman, *The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light*. EMBO J, 1996. **15**(23): p. 6552-63.
264. Whitmarsh, A.J., et al., *Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element*. Science, 1995. **269**(5222): p. 403-7.
265. Huang, C., et al., *Vanadium induces AP-1- and NFkappB-dependent transcription activity*. Int J Oncol, 1998. **13**(4): p. 711-5.
266. Zechner, D., et al., *MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 8232-9.
267. Wang, X.Z. and D. Ron, *Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase*. Science, 1996. **272**(5266): p. 1347-9.
268. Tanaka, K., et al., *Induction of Ets-1 in endothelial cells during reendothelialization after denuding injury*. J Cell Physiol, 1998. **176**(2): p. 235-44.
269. Zervos, A.S., et al., *Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(23): p. 10531-4.
270. Kim, J., et al., *Analysis of the phosphorylation of human heat shock transcription factor-1 by MAP kinase family members*. J Cell Biochem, 1997. **67**(1): p. 43-54.
271. Heidenreich, O., et al., *MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 14434-43.
272. McLaughlin, M.M., et al., *Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(14): p. 8488-92.
273. Thomas, G., J. Haavik, and P. Cohen, *Participation of a stress-activated protein kinase cascade in the activation of tyrosine hydroxylase in chromaffin cells*. Eur J Biochem, 1997. **247**(3): p. 1180-9.
274. Fukunaga, R. and T. Hunter, *MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates*. EMBO J, 1997. **16**(8): p. 1921-33.
275. Waskiewicz, A.J., et al., *Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2*. EMBO J, 1997. **16**(8): p. 1909-20.
276. Deak, M., et al., *Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB*. EMBO J, 1998. **17**(15): p. 4426-41.
277. New, L., et al., *Cloning and characterization of RLPK, a novel RSK-related protein kinase*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 1026-32.

278. Pierrat, B., et al., *RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38alpha mitogen-activated protein kinase (p38alphaMAPK)*. J Biol Chem, 1998. **273**(45): p. 29661-71.
279. Reynolds, C.H., et al., *Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro*. J Neurochem, 1997. **69**(1): p. 191-8.
280. Adams, R.H., et al., *Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development*. Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 109-16.
281. Allen, M., et al., *Deficiency of the stress kinase p38alpha results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells*. J Exp Med, 2000. **191**(5): p. 859-70.
282. Mudgett, J.S., et al., *Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10454-9.
283. Turban, S., et al., *Insulin-stimulated glucose uptake does not require p38 mitogen-activated protein kinase in adipose tissue or skeletal muscle*. Diabetes, 2005. **54**(11): p. 3161-8.
284. Marie, C., S. Roman-Roman, and G. Rawadi, *Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in interleukin-8 production by human monocytes and polymorphonuclear cells stimulated with lipopolysaccharide or Mycoplasma fermentans membrane lipoproteins*. Infect Immun, 1999. **67**(2): p. 688-93.
285. Miyazawa, K., et al., *Regulation of interleukin-1beta-induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(38): p. 24832-8.
286. Garcia, J., et al., *A Mycoplasma fermentans-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kappaB activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways*. J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 34391-8.
287. Nishida, K., et al., *p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(24): p. 10611-20.
288. Bulavin, D.V., S.A. Amundson, and A.J. Fornace, *p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 92-7.
289. Lavoie, J.N., et al., *Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20608-16.
290. Wang, S., et al., *Regulation of Rb and E2F by signal transduction cascades: divergent effects of JNK1 and p38 kinases*. EMBO J, 1999. **18**(6): p. 1559-70.
291. Rousseau, S., et al., *p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells*. Oncogene, 1997. **15**(18): p. 2169-77.
292. Murray, H.J. and J.J. O'Connor, *A role for COX-2 and p38 mitogen activated protein kinase in long-term depression in the rat dentate gyrus in vitro*. Neuropharmacology, 2003. **44**(3): p. 374-80.
293. Sabio, G., et al., *p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP*. EMBO J, 2005. **24**(6): p. 1134-45.
294. Hasegawa, M., et al., *Stress-activated protein kinase-3 interacts with the PDZ domain of alpha1-syntrophin. A mechanism for specific substrate recognition*. J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12626-31.
295. Sabio, G., et al., *Stress- and mitogen-induced phosphorylation of the synapse-associated protein SAP90/PSD-95 by activation of SAPK3/p38gamma and ERK1/ERK2*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 1): p. 19-30.

296. Perdiguero, E., et al., *Xp38gamma/SAPK3 promotes meiotic G(2)/M transition in Xenopus oocytes and activates Cdc25C*. EMBO J, 2003. **22**(21): p. 5746-56.
297. Meng, F., et al., *p38gamma mitogen-activated protein kinase contributes to oncogenic properties maintenance and resistance to poly (ADP-ribose)-polymerase-1 inhibition in breast cancer*. Neoplasia, 2011. **13**(5): p. 472-82.
298. Cerezo-Guisado, M.I., et al., *Evidence of p38gamma and p38delta involvement in cell transformation processes*. Carcinogenesis, 2011. **32**(7): p. 1093-9.
299. Qi, X., et al., *p38gamma mitogen-activated protein kinase integrates signaling crosstalk between Ras and estrogen receptor to increase breast cancer invasion*. Cancer Res, 2006. **66**(15): p. 7540-7.
300. Gillespie, M.A., et al., *p38-{gamma}-dependent gene silencing restricts entry into the myogenic differentiation program*. J Cell Biol, 2009. **187**(7): p. 991-1005.
301. Cuenda, A. and P. Cohen, *Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis*. J Biol Chem, 1999. **274**(7): p. 4341-6.
302. Tortorella, L.L., C.B. Lin, and P.F. Pilch, *ERK6 is expressed in a developmentally regulated manner in rodent skeletal muscle*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **306**(1): p. 163-8.
303. Pogozelski, A.R., et al., *p38gamma mitogen-activated protein kinase is a key regulator in skeletal muscle metabolic adaptation in mice*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7934.
304. Risco, A., et al., *p38gamma and p38delta kinases regulate the Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cytokine production by controlling ERK1/2 protein kinase pathway activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(28): p. 11200-5.
305. Jenkins, S.M., et al., *Modulation of tau phosphorylation and intracellular localization by cellular stress*. Biochem J, 2000. **345 Pt 2**: p. 263-70.
306. Feijoo, C., et al., *Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 2): p. 397-408.
307. Goedert, M., et al., *Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases*. FEBS Lett, 1997. **409**(1): p. 57-62.
308. Knebel, A., et al., *Stress-induced regulation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by SB 203580-sensitive and -insensitive pathways*. Biochem J, 2002. **367**(Pt 2): p. 525-32.
309. Alevy, Y.G., et al., *IL-13-induced airway mucus production is attenuated by MAPK13 inhibition*. J Clin Invest, 2012. **122**(12): p. 4555-68.
310. Adhikary, G., et al., *PKC-delta and -eta, MEKK-1, MEK-6, MEK-3, and p38-delta are essential mediators of the response of normal human epidermal keratinocytes to differentiating agents*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(8): p. 2017-30.
311. Eckert, R.L., et al., *p38 Mitogen-activated protein kinases on the body surface--a function for p38 delta*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(5): p. 823-8.
312. Johansen, C., et al., *The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin*. Br J Dermatol, 2005. **152**(1): p. 37-42.
313. Sumara, G., et al., *Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis*. Cell, 2009. **136**(2): p. 235-48.
314. Knebel, A., N. Morrice, and P. Cohen, *A novel method to identify protein kinase substrates: eEF2 kinase is phosphorylated and inhibited by SAPK4/p38delta*. EMBO J, 2001. **20**(16): p. 4360-9.
315. Schindler, E.M., et al., *p38delta Mitogen-activated protein kinase is essential for skin tumor development in mice*. Cancer Res, 2009. **69**(11): p. 4648-55.

316. Sauer, B. and N. Henderson, *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5166-70.
317. Sternberg, N., D. Hamilton, and R. Hoess, *Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome*. J Mol Biol, 1981. **150**(4): p. 487-507.
318. Buettner, R., J. Scholmerich, and L.C. Bollheimer, *High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents*. Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(4): p. 798-808.
319. Kohli, R. and A.E. Feldstein, *NASH animal models: are we there yet?* J Hepatol, 2011. **55**(4): p. 941-3.
320. Richard, M.J., et al., *Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid*. Clin Chem, 1992. **38**(5): p. 704-9.
321. Patel, S., K. Macaulay, and J.R. Woodgett, *Tissue-specific analysis of glycogen synthase kinase-3alpha (GSK-3alpha) in glucose metabolism: effect of strain variation*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e15845.
322. Lorentz, K. and B. Flatter, *Clinical application of a new method for the determination of aminoacylase in human serum*. Clin Chim Acta, 1975. **63**(3): p. 271-4.
323. Nishikawa, Y., K. Fukumoto, and F. Watanabe, *Clinical evaluation of serum guanase activity in liver diseases*. Clin Biochem, 1984. **17**(5): p. 327-30.
324. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
325. García-Segura, J.M., *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*. 4a reimp. ed. Ciencias químicas. Química básica ; 2. 2008, Madrid: Editorial Síntesis. 398 p.
326. Fischer, A.H., et al., *Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections*. CSH Protoc, 2008. **2008**: p. pdb prot4986.
327. Gomori, G., *The periodic-acid Schiff stain*. Am J Clin Pathol, 1952. **22**(3): p. 277-81.
328. Gallou-Kabani, C., et al., *C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome*. Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(8): p. 1996-2005.
329. D., L., et al., *Harrison's Principles of Internal Medicine, Approach to the Patient With Liver Disease*. 2005, New York: McGraw-Hill.
330. Li, Y., et al., *AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice*. Cell Metab, 2011. **13**(4): p. 376-88.
331. Kim, H.J., et al., *Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo*. Diabetes, 2004. **53**(4): p. 1060-7.
332. Klover, P.J., A.H. Clementi, and R.A. Mooney, *Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity*. Endocrinology, 2005. **146**(8): p. 3417-27.
333. Klover, P.J., et al., *Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice*. Diabetes, 2003. **52**(11): p. 2784-9.
334. WHO/EUROPE, *Obesity*. 2013.
335. Organización Mundial de la Salud, W. *Global Infobase WHO Available at: Mortalities*. 2010; Available from: <https://apps.who.int/infobase/>.
336. Haidar, Y.M. and B.C. Cosman, *Obesity epidemiology*. Clin Colon Rectal Surg, 2011. **24**(4): p. 205-10.
337. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.

338. Yang, D.D., et al., *Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene*. *Nature*, 1997. **389**(6653): p. 865-70.
339. Brüning, J.C., et al., *Ribosomal subunit kinase-2 is required for growth factor-stimulated transcription of the c-Fos gene*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. **97**(6): p. 2462-2467.
340. Ronkina, N., et al., *The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(1): p. 170-81.
341. Lefloch, R., J. Pouyssegur, and P. Lenormand, *Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(1): p. 511-27.
342. Samuels, I.S., et al., *Deletion of ERK2 mitogen-activated protein kinase identifies its key roles in cortical neurogenesis and cognitive function*. *J Neurosci*, 2008. **28**(27): p. 6983-95.
343. del Barco Barrantes, I., et al., *Genetic analysis of specific and redundant roles for p38alpha and p38beta MAPKs during mouse development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(31): p. 12764-9.
344. Choi, S.H. and H.N. Ginsberg, *Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance*. *Trends Endocrinol Metab*, 2011. **22**(9): p. 353-63.
345. Bost, F., et al., *The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity*. *Biochimie*, 2005. **87**(1): p. 51-6.
346. Bost, F., et al., *The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis*. *Diabetes*, 2005. **54**(2): p. 402-11.
347. Puigserver, P., et al., *Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1*. *Mol Cell*, 2001. **8**(5): p. 971-82.
348. Xiong, Y., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase plays an inhibitory role in hepatic lipogenesis*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(7): p. 4975-82.
349. Burns, K.A. and J.P. Vanden Heuvel, *Modulation of PPAR activity via phosphorylation*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1771**(8): p. 952-60.
350. Somwar, R., et al., *A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(52): p. 50386-95.
351. Barger, P.M., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha: a potential role in the cardiac metabolic stress response*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(48): p. 44495-501.
352. Lissner, L., et al., *Dietary fat and the regulation of energy intake in human subjects*. *Am J Clin Nutr*, 1987. **46**(6): p. 886-92.
353. Rolls, B.J. and V.A. Hammer, *Fat, carbohydrate, and the regulation of energy intake*. *Am J Clin Nutr*, 1995. **62**(5 Suppl): p. 1086S-1095S.
354. Rolls, B.J. and D.J. Shide, *The influence of dietary fat on food intake and body weight*. *Nutr Rev*, 1992. **50**(10): p. 283-90.
355. Horton, T.J., et al., *Fat and carbohydrate overfeeding in humans: different effects on energy storage*. *Am J Clin Nutr*, 1995. **62**(1): p. 19-29.
356. Lean, M.E. and W.P. James, *Metabolic effects of isoenergetic nutrient exchange over 24 hours in relation to obesity in women*. *Int J Obes*, 1988. **12**(1): p. 15-27.
357. Chang, S., et al., *Metabolic differences between obesity-prone and obesity-resistant rats*. *Am J Physiol*, 1990. **259**(6 Pt 2): p. R1103-10.
358. Sclafani, A., *Dietary-induced overeating*. *Ann N Y Acad Sci*, 1989. **575**: p. 281-9; discussion 290-1.



359. Salmon, D.M. and J.P. Flatt, *Effect of dietary fat content on the incidence of obesity among ad libitum fed mice*. Int J Obes, 1985. **9**(6): p. 443-9.
360. Wu, J.J., et al., *Mice lacking MAP kinase phosphatase-1 have enhanced MAP kinase activity and resistance to diet-induced obesity*. Cell Metab, 2006. **4**(1): p. 61-73.
361. Wolfgang, M.J., et al., *The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(19): p. 7282-7.
362. Abu-Elheiga, L., et al., *Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2*. Science, 2001. **291**(5513): p. 2613-6.
363. Vergoni, A.V., R. Poggioli, and A. Bertolini, *Corticotropin inhibits food intake in rats*. Neuropeptides, 1986. **7**(2): p. 153-8.
364. Fehm, H.L., et al., *The melanocortin melanocyte-stimulating hormone/adrenocorticotropin(4-10) decreases body fat in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(3): p. 1144-8.
365. Bailey, C.J. and P.R. Flatt, *Insulin releasing effects of adrenocorticotropin (ACTH 1-39) and ACTH fragments (1-24 and 18-39) in lean and genetically obese hyperglycaemic (ob/ob) mice*. Int J Obes, 1987. **11**(2): p. 175-81.
366. Cailotto, C., et al., *The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved?* Eur J Neurosci, 2005. **22**(10): p. 2531-40.
367. Kalsbeek, A., et al., *The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis*, in *Progress in Brain Research*, E.F.M.A.H.D.F.S.E.J.W.v.S. A. Kalsbeek and R.M. Buijs, Editors. 2006, Elsevier. p. 283-307.
368. Akashi, M., et al., *Mitogen-activated protein kinase is a functional component of the autonomous circadian system in the suprachiasmatic nucleus*. J Neurosci, 2008. **28**(18): p. 4619-23.
369. Chik, C.L., et al., *Adrenergic regulation and diurnal rhythm of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the rat pineal gland*. Endocrinology, 2004. **145**(11): p. 5194-201.
370. Kohsaka, A., et al., *High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice*. Cell Metab, 2007. **6**(5): p. 414-21.
371. Sironi, A.M., et al., *Early hypertension is associated with reduced regional cardiac function, insulin resistance, epicardial, and visceral fat*. Hypertension, 2008. **51**(2): p. 282-8.
372. Fox, C.S., et al., *Pericardial fat, intrathoracic fat, and measures of left ventricular structure and function: the Framingham Heart Study*. Circulation, 2009. **119**(12): p. 1586-91.
373. Despres, J.P., et al., *Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(6): p. 1039-49.
374. Cusi, K., *Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis*. Clin Liver Dis, 2009. **13**(4): p. 545-63.
375. Tsukamoto, H., *Fat paradox in liver disease*. Keio J Med, 2005. **54**(4): p. 190-2.
376. Kopecky, J., et al., *Modulation of lipid metabolism by energy status of adipocytes: implications for insulin sensitivity*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **967**: p. 88-101.
377. Hill, M.J., D. Metcalfe, and P.G. McTernan, *Obesity and diabetes: lipids, 'nowhere to run to'*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(2): p. 113-23.
378. Schuster, D.P., *Obesity and the development of type 2 diabetes: the effects of fatty tissue inflammation*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2010. **3**: p. 253-62.
379. Klop, B., J.W. Elte, and M.C. Cabezas, *Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets*. Nutrients, 2013. **5**(4): p. 1218-40.

380. Ebbert, J.O. and M.D. Jensen, *Fat depots, free fatty acids, and dyslipidemia*. *Nutrients*, 2013. **5**(2): p. 498-508.
381. Lee, J., et al., *p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis*. *Nat Med*, 2011. **17**(10): p. 1251-60.
382. Greenwood, F.C. and J. Landon, *Assessment of hypothalamic pituitary function in endocrine disease*. *J Clin Pathol*, 1966. **19**(3): p. 284-92.
383. Wynn, V., *The assessment of hypothalamic-pituitary-adrenocortical function in man*. *Proc R Soc Med*, 1967. **60**(9): p. 909-10.
384. Tritos, N.A. and B.M. Biller, *Advances in medical therapies for Cushing's syndrome*. *Discov Med*, 2012. **13**(69): p. 171-9.
385. Cao, W., et al., *p38 Mitogen-activated protein kinase plays a stimulatory role in hepatic gluconeogenesis*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(52): p. 42731-7.
386. Collins, Q.F., et al., *p38 Mitogen-activated protein kinase mediates free fatty acid-induced gluconeogenesis in hepatocytes*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(34): p. 24336-44.
387. Qiao, L., O.A. MacDougald, and J. Shao, *CCAAT/enhancer-binding protein alpha mediates induction of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase by p38 mitogen-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(34): p. 24390-7.
388. Robidoux, J., et al., *Selective activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 and p38alpha MAP kinase is essential for cyclic AMP-dependent UCP1 expression in adipocytes*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(13): p. 5466-79.
389. Herzig, S., et al., *CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1*. *Nature*, 2001. **413**(6852): p. 179-83.
390. Kramer, D.K., et al., *Direct activation of glucose transport in primary human myotubes after activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta*. *Diabetes*, 2005. **54**(4): p. 1157-63.
391. Richter, E.A., et al., *Exercise signalling to glucose transport in skeletal muscle*. *Proc Nutr Soc*, 2004. **63**(2): p. 211-6.
392. Geiger, P.C., et al., *Activation of p38 MAP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. **288**(4): p. E782-8.
393. de Alvaro, C., et al., *Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(17): p. 17070-8.
394. Lim, J.H., et al., *Mitochondrial dysfunction induces aberrant insulin signalling and glucose utilisation in murine C2C12 myotube cells*. *Diabetologia*, 2006. **49**(8): p. 1924-36.
395. Masharani, U.B., et al., *Insulin resistance in non-obese subjects is associated with activation of the JNK pathway and impaired insulin signaling in skeletal muscle*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e19878.
396. Sweeney, G., et al., *An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(15): p. 10071-8.
397. Fujishiro, M., et al., *MKK6/3 and p38 MAPK pathway activation is not necessary for insulin-induced glucose uptake but regulates glucose transporter expression*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(23): p. 19800-6.
398. Kayali, A.G., D.A. Austin, and N.J. Webster, *Stimulation of MAPK cascades by insulin and osmotic shock: lack of an involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes*. *Diabetes*, 2000. **49**(11): p. 1783-93.
399. Bremer, A.A. and I. Jialal, *Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome*. *J Obes*, 2013. **2013**: p. 393192.

400. Birsoy, K., W.T. Festuccia, and M. Laplante, *A comparative perspective on lipid storage in animals*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 7): p. 1541-52.
401. Foretz, M., et al., *Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1331-9.
402. Mao, J., et al., *Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(22): p. 8552-7.
403. Nagai, Y., et al., *The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 beta in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance*. Cell Metab, 2009. **9**(3): p. 252-64.
404. Ling, C., et al., *Impact of the peroxisome proliferator activated receptor-gamma coactivator-1beta (PGC-1beta) Ala203Pro polymorphism on in vivo metabolism, PGC-1beta expression and fibre type composition in human skeletal muscle*. Diabetologia, 2007. **50**(8): p. 1615-20.
405. Patti, M.E., et al., *Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8466-71.
406. Sonoda, J., et al., *PGC-1beta controls mitochondrial metabolism to modulate circadian activity, adaptive thermogenesis, and hepatic steatosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(12): p. 5223-8.
407. Lelliott, C.J., et al., *Ablation of PGC-1 $\beta$  Results in Defective Mitochondrial Activity, Thermogenesis, Hepatic Function, and Cardiac Performance*. PLoS Biol, 2006. **4**(11): p. e369.
408. Xu, J., et al., *Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice*. Diabetes, 2009. **58**(1): p. 250-9.
409. Yu, X.J., et al., *Expression and localization of the activated mitogen-activated protein kinase in lesional psoriatic skin*. Exp Mol Pathol, 2007. **83**(3): p. 413-8.
410. Korb, A., et al., *Differential tissue expression and activation of p38 MAPK alpha, beta, gamma, and delta isoforms in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(9): p. 2745-56.
411. Zwerina, J., et al., *Activation of p38 MAPK is a key step in tumor necrosis factor-mediated inflammatory bone destruction*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(2): p. 463-72.
412. Ip, W.K., C.K. Wong, and C.W. Lam, *Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 signalling pathways*. Clin Exp Immunol, 2006. **145**(1): p. 162-72.
413. Bantel, H., et al., *Critical role of NF-kappaB and stress-activated protein kinases in steroid unresponsiveness*. FASEB J, 2002. **16**(13): p. 1832-4.
414. Campbell, J., et al., *A novel mechanism for TNF-alpha regulation by p38 MAPK: involvement of NF-kappa B with implications for therapy in rheumatoid arthritis*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6928-37.
415. Baldassare, J.J., Y. Bi, and C.J. Bellone, *The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5367-73.
416. Beyaert, R., et al., *The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor*. EMBO J, 1996. **15**(8): p. 1914-23.

417. Hwang, D., et al., *Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways in macrophages*. *Biochem Pharmacol*, 1997. **54**(1): p. 87-96.
418. Paul, A., et al., *Involvement of mitogen-activated protein kinase homologues in the regulation of lipopolysaccharide-mediated induction of cyclo-oxygenase-2 but not nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages*. *Cell Signal*, 1999. **11**(7): p. 491-7.
419. Xing, B., A.D. Bachstetter, and L.J. Van Eldik, *Deficiency in p38beta MAPK fails to inhibit cytokine production or protect neurons against inflammatory insult in in vitro and in vivo mouse models*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56852.
420. O'Keefe, S.J., et al., *Chemical genetics define the roles of p38alpha and p38beta in acute and chronic inflammation*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(48): p. 34663-71.
421. Das, S.K. and V. Balakrishnan, *Role of cytokines in the pathogenesis of non-alcoholic Fatty liver disease*. *Indian J Clin Biochem*, 2011. **26**(2): p. 202-9.
422. Jarrar, M.H., et al., *Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008. **27**(5): p. 412-21.
423. Braunersreuther, V., et al., *Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease*. *World J Gastroenterol*, 2012. **18**(8): p. 727-35.
424. Diehl, A.M., *Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. **282**(1): p. G1-5.
425. Maina, V., et al., *Bias in macrophage activation pattern influences non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice*. *Clin Sci (Lond)*, 2012. **122**(11): p. 545-53.
426. Wan, J., et al., *M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: A protective mechanism against alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 2013.
427. Laskin, D.L., B. Weinberger, and J.D. Laskin, *Functional heterogeneity in liver and lung macrophages*. *J Leukoc Biol*, 2001. **70**(2): p. 163-70.
428. Enomoto, N., et al., *Kupffer cell sensitization by alcohol involves increased permeability to gut-derived endotoxin*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2001. **25**(6 Suppl): p. 51S-4S.
429. Seki, S., et al., *The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses*. *Immunol Rev*, 2000. **174**: p. 35-46.
430. Watanabe, N., et al., *Hepatocellular oxidative DNA injury induced by macrophage-derived nitric oxide*. *Free Radic Biol Med*, 2001. **30**(9): p. 1019-28.
431. Ibusuki, R., et al., *Transgenic expression of human neutrophil peptide-1 enhances hepatic fibrosis in mice fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet*. *Liver Int*, 2013.
432. Rensen, S.S., et al., *Neutrophil-derived myeloperoxidase aggravates non-alcoholic steatohepatitis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e52411.
433. Rodriguez-Hernandez, H., et al., *Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation*. *Int J Endocrinol*, 2013. **2013**: p. 678159.
434. Alaaeddine, N., et al., *TNF-alpha messenger ribonucleic acid (mRNA) in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. *Eur Cytokine Netw*, 2012. **23**(3): p. 107-11.
435. Vieira, S.M., et al., *A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5*. *Br J Pharmacol*, 2009. **158**(3): p. 779-89.
436. Oshima, T., et al., *TNF-alpha induced endothelial MAdCAM-1 expression is regulated by exogenous, not endogenous nitric oxide*. *BMC Gastroenterol*, 2001. **1**: p. 5.

437. Feng, Y. and D.H. Teitelbaum, *TNF- $\alpha$ -Induced Loss of Intestinal Barrier Function Requires TNFR1 and TNFR2 Signaling in a Mouse Model of Total Parenteral Nutrition*. *The Journal of Physiology*, 2013.
438. Wang, J., et al., *Endogenous and exogenous IL-6 inhibit aeroallergen-induced Th2 inflammation*. *J Immunol*, 2000. **165**(7): p. 4051-61.
439. Jacob, N. and W. Stohl, *Cytokine disturbances in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Res Ther*, 2011. **13**(4): p. 228.
440. Health, N.I.o. *Clinical trials*. 2013 [cited 2013 10/05/2013]; p38 clinical trials]. Available from: [http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=p38&no\\_unk=Y&pg=1](http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=p38&no_unk=Y&pg=1).
441. M., W., et al., *A DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED TRIAL OF VX-745, AN ORAL P38 MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE (MAPK) INHIBITOR, IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS (RA)*. 2002: EULAR, Stockholm, Sweden.
442. Westra, J., et al., *Effects of RWJ 67657, a p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) inhibitor, on the production of inflammatory mediators by rheumatoid synovial fibroblasts*. *Ann Rheum Dis*, 2004. **63**(11): p. 1453-9.
443. Dominguez, C., D.A. Powers, and N. Tamayo, *p38 MAP kinase inhibitors: many are made, but few are chosen*. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2005. **8**(4): p. 421-30.
444. Clark, J.E., N. Sarafraz, and M.S. Marber, *Potential of p38-MAPK inhibitors in the treatment of ischaemic heart disease*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2007. **116**(2): p. 192-206.
445. Badger, A.M., et al., *Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996. **279**(3): p. 1453-61.
446. Schreiber, S., et al., *Oral p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibition With BIRB 796 for Active Crohn's Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial*. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2006. **4**(3): p. 325-334.
447. Branger, J., et al., *Anti-Inflammatory Effects of a p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor During Human Endotoxemia*. *The Journal of Immunology*, 2002. **168**(8): p. 4070-4077.
448. Moran, N., *p38 kinase inhibitor approved for idiopathic pulmonary fibrosis*. *Nat Biotechnol*, 2011. **29**(4): p. 301.