

IMPLICACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN E2F1 EN LA DESREGULACIÓN METABÓLICA HEPÁTICA Y EL DESARROLLO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

Daniela Mestre¹, Igor Aurrekoetxea¹, Larraitz Fernández-Ares¹, Xabier Buqué¹, Juan L García-Rodríguez¹, Ainhoa Iglesias², Ana Zubiaga² y Patricia Aspichueta¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Leioa, ES; ²Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco, Leioa, ES.



INTRODUCCIÓN

Un 80% de los pacientes obesos desarrollan la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA), factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma hepatocelular (CHC). La expresión génica del factor de transcripción E2F1, cuya activación es crítica en la activación del ciclo celular, está incrementada en CHC (oncomine.org). E2F1 modula el metabolismo oxidativo en tejido adiposo y músculo esquelético, y su ausencia genera resistencia a obesidad¹. Además, interviene en el desarrollo de fibrosis hepática². Sin embargo, se desconoce si E2F1 es un regulador metabólico hepático y si está implicado en el desarrollo de CHC y la desprogramación metabólica asociada.

Por ello, los **objetivos** de este trabajo fueron 1) identificar si el factor de transcripción E2F1 es necesario para el desarrollo de CHC y 2) definir su papel como modulador metabólico en las etapas iniciales de la enfermedad hepática.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES:

Se utilizaron ratones 129/Sv x C57BL/6 carentes del gen E2F1 (E2F1^{-/-}) y sus controles (WT). Para la inducción de CHC, se administró dietilnitrosamina (DEN) (única dosis a los 14 días de edad, 25mg/kg) y dieta rica en grasa (HFD)³. Los animales control se alimentaron con su dieta control (CD). Los ratones se sacrificaron a los 3 y 9 meses de edad.

CURVAS DE TOLERANCIA A GLUCOSA, INSULINA Y PIRUVATO:

Tras 4 horas de ayuno, se administró una solución intragástrica de glucosa (2g/kg) o intraperitoneal (IP) de insulina (0.75 U/kg). Tras 13 horas de ayuno, se administró IP una disolución de piruvato (2 g/kg ratón)⁴. Se tomaron medidas de glucosa sérica a los tiempos indicados.

MEDIDA DE LOS PARÁMETROS SÉRICOS:

Se extrajo sangre en estado de alimento y tras 13 horas de ayuno. Los ácidos grasos (AG), triglicéridos (TG), cuerpos cetónicos (CC) y glucosa se midieron en suero mediante kits comerciales.

CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS HEPÁTICOS:

Los lípidos se cuantificaron según Ruiz y Ochoa⁵ en extractos lipídicos⁶ de homogenado hepático.

SECRECIÓN HEPÁTICA DE TRIGLICÉRIDO:

Se inhibió el metabolismo de VLDL por administración de Poloxamer P-407 (IP, 1g/kg) tras dos horas de ayuno⁷. La secreción hepática de TG se calculó mediante la diferencia del TG sérico antes y 2 horas después de administrar el P-407.

EXPERIMENTOS CON RADIOISÓTOPOS:

Tras 2 horas de ayuno, se administró IP una disolución con 5 uCi de ³H-colina, 5 uCi de ¹⁴C-glicerol y 250 uM de glicerol frío⁸. Tras 2 horas, se recogió el hígado para extraer y separar los lípidos. La radioactividad incorporada en los distintos lípidos, indicativo de los flujos metabólicos que regulan la biodisponibilidad de los mismos, se midió mediante un contador de centelleo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los resultados se expresan como la media ± SEM de una n=5-9. El significado estadístico se analizó mediante la t de Student para datos no pareados o ANOVA bidireccional. La significancia estadística se indica como *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 para WT vs E2F1^{-/-}; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 para CD vs HFD y ^p<0.05, ^^p<0.01, ^^p<0.001 para estado de alimento vs estado de ayuno.

RESULTADOS

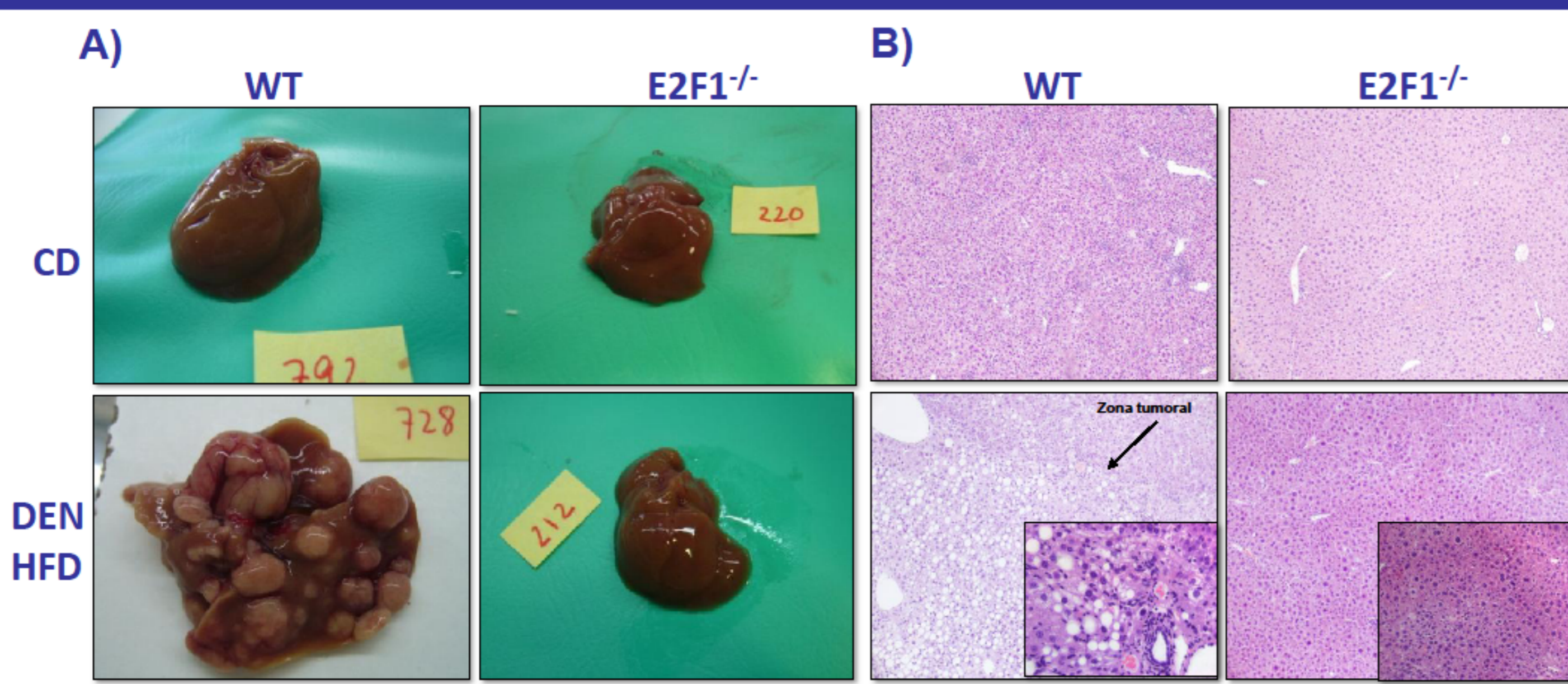


Figura 1. La ausencia de E2F1 confiere resistencia para el desarrollo de CHC. El tratamiento con DEN y HFD indujo CHC en el 100% de los ratones WT 9 meses tras el inicio del tratamiento (n=9) (A). Sin embargo, solo el 33% de los ratones E2F1^{-/-} desarrollaron CHC (n=9). Las imágenes de las tinciones de hematoxilina-eosina de los hígados están tomadas a 10x y las ampliaciones a 20x (B).

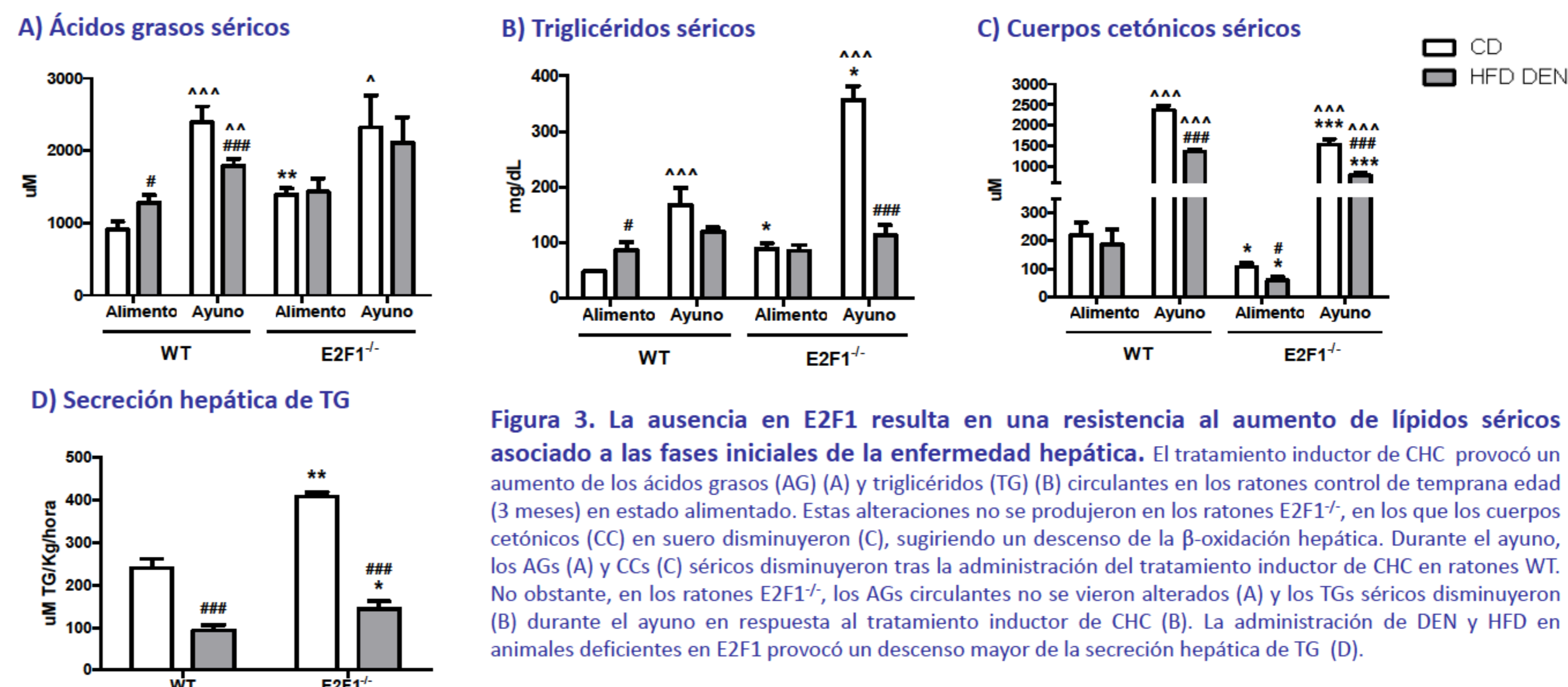


Figura 3. La ausencia en E2F1 resulta en una resistencia al aumento de lípidos séricos asociado a las fases iniciales de la enfermedad hepática. El tratamiento inductor de CHC provocó un aumento de los ácidos grasos (AG) (A) y triglicéridos (TG) (B) circulantes en los ratones control de temprana edad (3 meses) en estado alimentado. Estas alteraciones no se produjeron en los ratones E2F1^{-/-}, en los que los cuerpos cetónicos (CC) en suero disminuyeron (C), sugiriendo un descenso de la β-oxidación hepática. Durante el ayuno, los AGs (A) y CCs (C) séricos disminuyeron tras la administración del tratamiento inductor de CHC en ratones WT. No obstante, en los ratones E2F1^{-/-}, los AGs circulantes no se vieron alterados (A) y los TGs séricos disminuyeron (B) durante el ayuno en respuesta al tratamiento inductor de CHC (B). La administración de DEN y HFD en animales deficientes en E2F1 provocó un descenso mayor de la secreción hepática de TG (D).

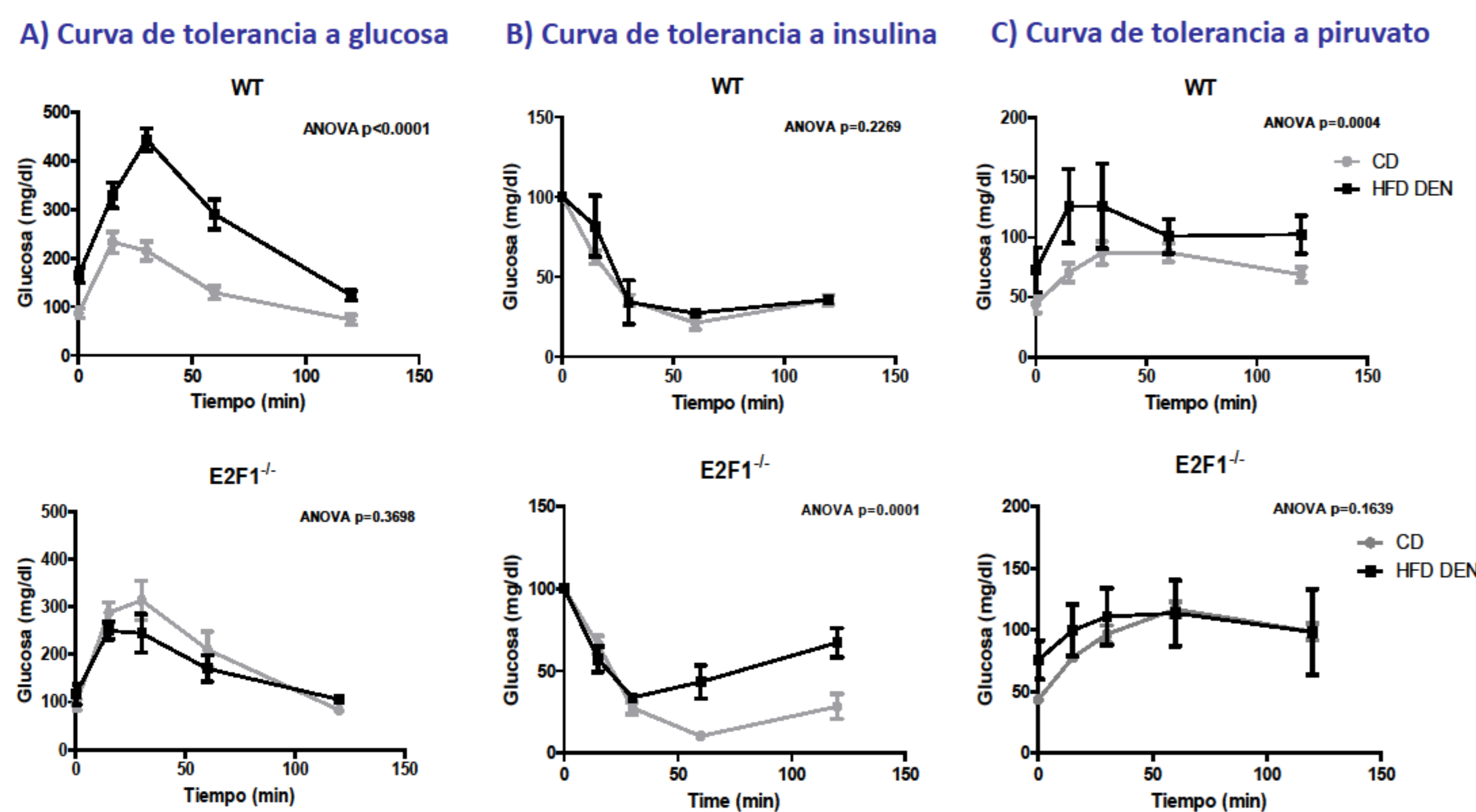


Figura 2. La carencia en E2F1 resulta en la reducción de la resistencia a insulina en las primeras etapas de la enfermedad hepática tras el tratamiento inductor de CHC. En los animales WT de 3 meses, la administración de DEN y HFD disminuyó la tolerancia a glucosa (A) sin modificar la tolerancia a insulina (B). Sin embargo, provocó el incremento en los niveles de glucosa sérica tras la administración de piruvato (C), lo que sugiere un incremento de la gluconeogénesis propio de la resistencia hepática a insulina. En ausencia de E2F1, el tratamiento inductor de CHC no modificó la tolerancia a glucosa (A), pero provocó cierta insensibilidad a insulina (B). Tampoco repercutió en la síntesis de glucosa a partir de piruvato (C).

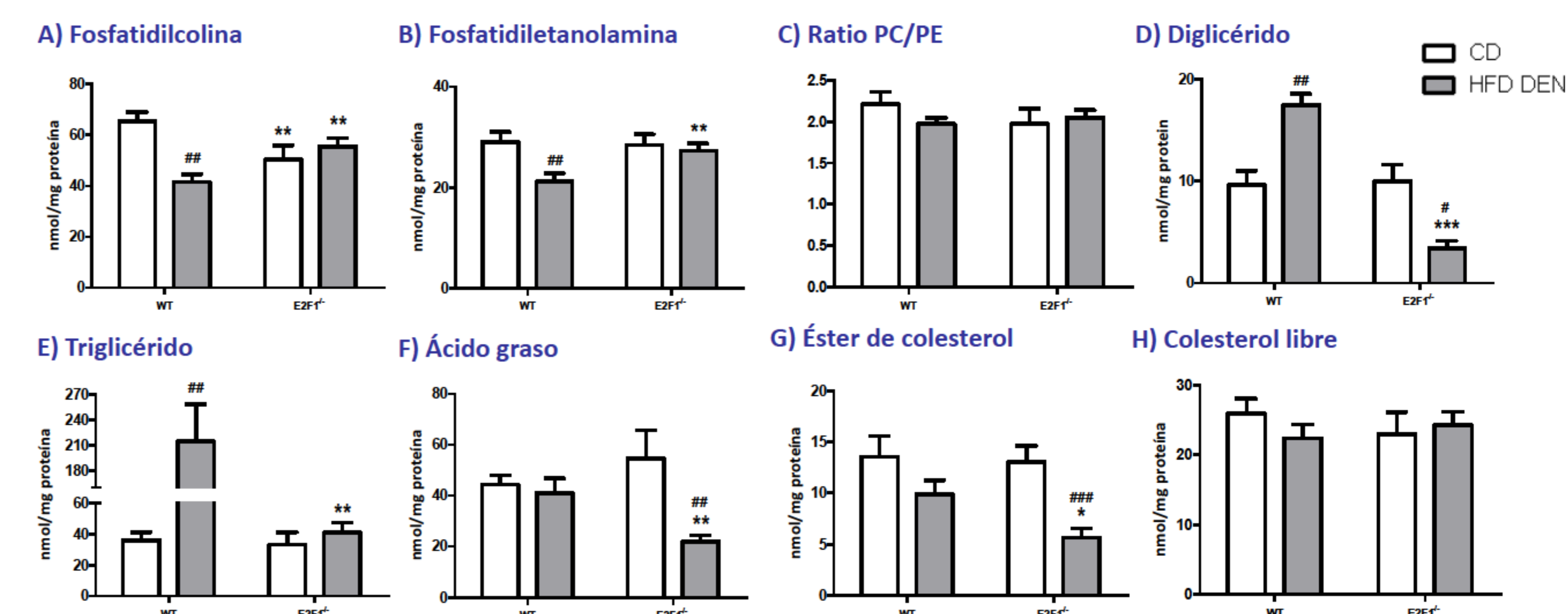


Figura 4. La ausencia en E2F1 evita el descenso en lípidos de membrana y el incremento en acilglicérols asociados a la inducción de CHC. El tratamiento inductor de CHC provocó la disminución de la concentración hepática en fosfatidilcolina (PC) (A) y fosfatidiletanolamina (PE) (B) en animales WT de 3 meses de edad, manteniéndose invariable el ratio PC/PE (C). A su vez, provocó un incremento de la concentración hepática en diglicérido (D) y triglicérido (E). Tras la administración de DEN y HFD, la carencia en E2F1 resultó en un descenso del ácido graso (AG) hepático (F). Este descenso fue acompañado de una disminución en la cantidad de DG (D) y de éster de colesterol (G), sugiriendo la reducción en la esterificación de AGs. Los niveles de colesterol libre hepáticos no se vieron alterados (H).

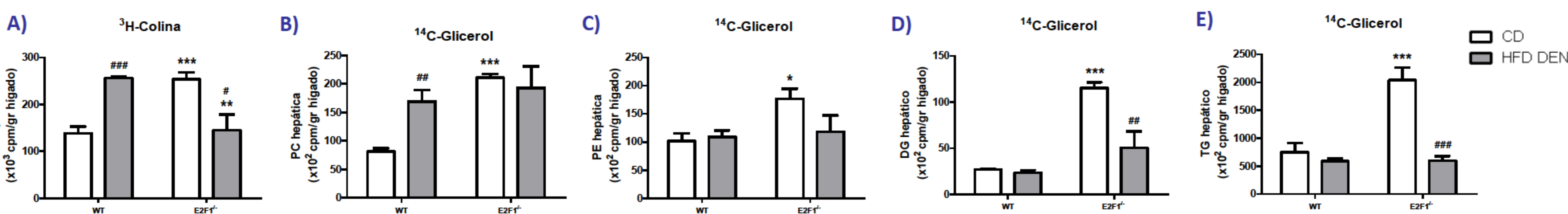


Figura 5. La deficiencia en E2F1 evita el incremento en los flujos metabólicos que regulan la biodisponibilidad hepática de fosfatidilcolina. La administración de DEN y HFD provocó el incremento de la incorporación de colina (A) y de glicerol (B) en fosfatidilcolina (PC) en animales WT de 3 meses, sugiriendo el incremento en su síntesis de novo. El tratamiento inductor de CHC, en ausencia de E2F1, resultó en un descenso de la incorporación de colina en PC (A), así como de la incorporación de glicerol en DG (D) y TG (E).

CONCLUSIONES

1. El factor de transcripción E2F1 está implicado en el desarrollo de CHC.
2. El factor de transcripción E2F1 participa en la regulación del metabolismo hepático y en los cambios asociados a la progresión de la enfermedad hepática.

REFERENCIAS

1. Blanchet E et al, 2011; 2. Zhang X et al, 2014; 3. Park EJ et al, 2010; 4. Song P et al, 2013; 5. Ruiz JI and Ochoa B, 1997; 6. Bligh EG and Dyer WJ, 1959; 7. Millar JS et al, 2005; 8. Lorissa J et al, 2011.

