



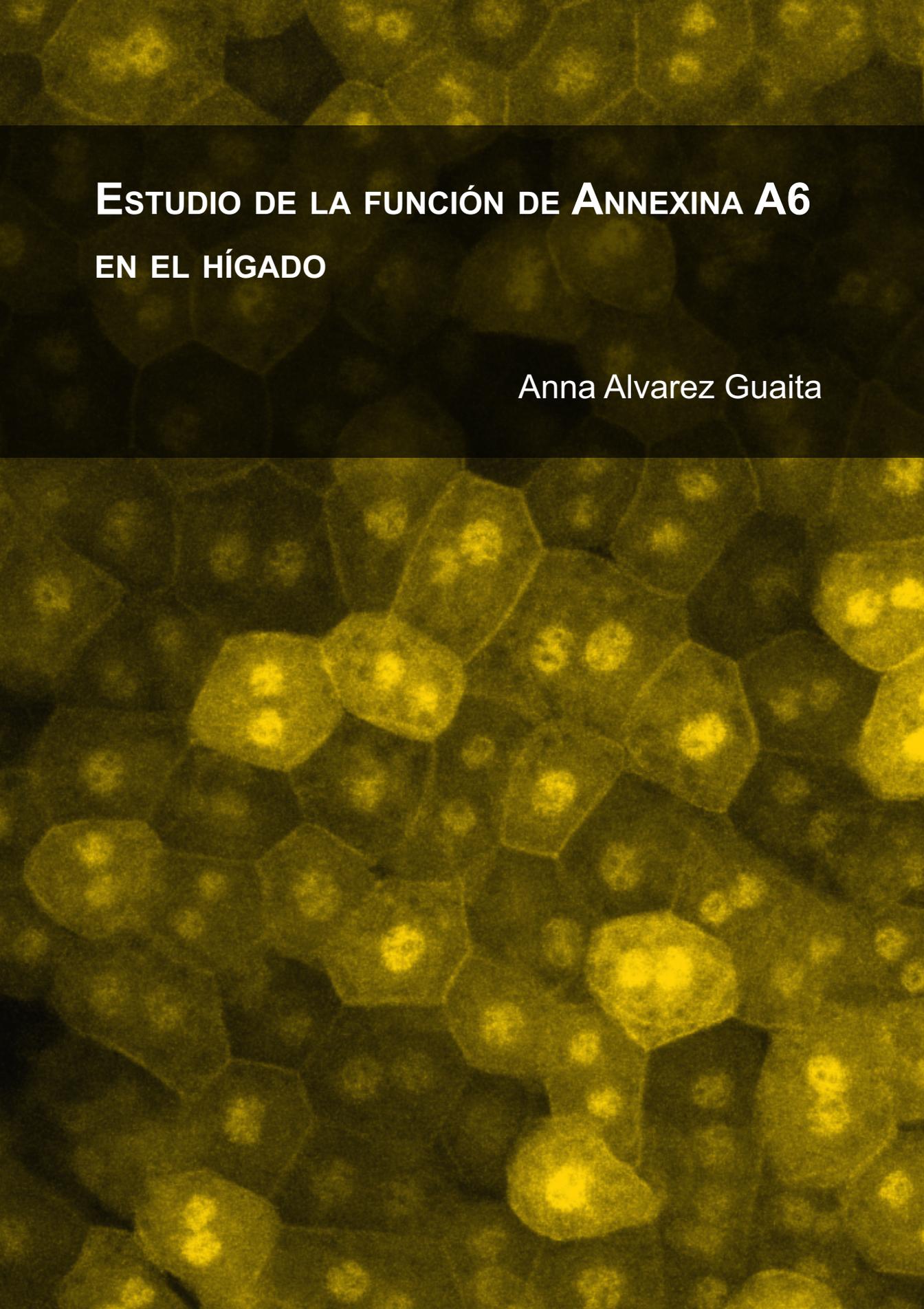
Estudio de la función de Annexina A6 en el hígado

Anna Alvarez Guaita

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

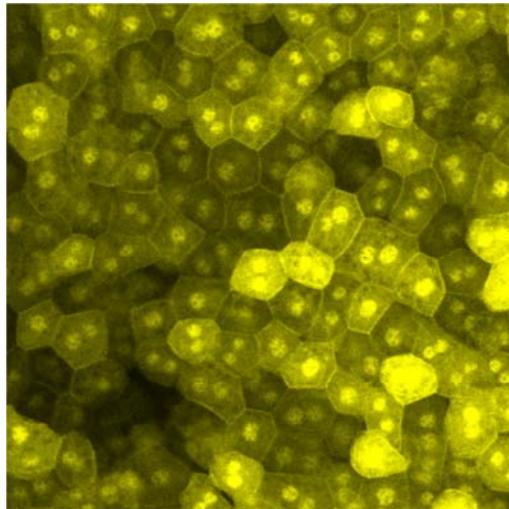
WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

The background of the entire page is a microscopic image of liver cells. The cells are arranged in a honeycomb-like pattern and exhibit a strong yellow-green fluorescence, likely from a fluorescent marker used in the study. The lighting is somewhat uneven, with brighter spots in the center of the cells and darker areas in the spaces between them.

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE ANNEXINA A6 EN EL HÍGADO

Anna Alvarez Guaita

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE ANNEXINA A6 EN EL HÍGADO



BARCELONA, JUNIO 2015

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE ANNEXINA A6 EN EL HÍGADO

MEMORIA PRESENTADA POR

ANNA ALVAREZ GUAITA

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN BIOMEDICINA

POR LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA



**ESTA TESIS HA SIDO REALIZADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL DR. CARLES ENRICH BASTÚS Y LA
CODIRECCIÓN DEL DR. CARLES RENTERO ALFONSO, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CELULAR, IMMUNOLOGIA I NEUROCIÈNCIES DE LA FACULTAT DE MEDICINA, UNIVERISTAT
DE BARCELONA.**

Als meus pares,

Las cosas no se dicen, se hacen, porque al hacerlas se dicen solas.

Woody Allen

Puede ser que la respuesta sea no preguntarse por qué...

Fito Cabrales

AGRAÏMENTS

Ha arribat el moment, estic escrivint els agraïments. Les primeres pàgines d'aquest llibre, com li diuen a casa meva, les últimes en ser escrites. Quantes vegades he pensat, i amb molts de vosaltres he parlat, de les ganes que tenia que arribés el moment de deixar per escrit tot el que tinc per agrair-vos. Ara estic nerviosa, i és que aquestes pàgines són les úniques que, no ens enganyem, llegireu...Allà va...

No puc començar aquests agraïments per ningú més que els meus directors de tesi, els Carles. Aquesta tesi l'hem feta entre tots i sense vosaltres, i les vostres correccions, no estaria on sóc ara. Us agraeixo que confiéssiu en mi i m'oferíssiu l'oportunitat de formar part del grup de les Annexines (aquí en majúscula perquè el grup s'ho mereix). Carles, he estat la teva primera doctoranda, junts hem après moltes coses, tècniques i temes completament diferents. Hem tingut moments difícils alhora que moments molt feliços, i és que som *gent normal*. Hem acabat aconseguint molt! Espero que després de tot et quedis amb els millors moments...Austràlia amb el PALM i Jervis Bay, els ratolins amb els matins d'hepatectomies i les nits de punts de 12 hores, el gran món del metabolisme i el model de l'ordre de membrana...Jo sens dubte ho faré.

Carles Enrich, gràcies per la teva manera de veure la ciència, crec que sempre he pensat que un científic seria com tu. Recordo la meva entrevista a les escales de la facultat. No oblidaré els tres requisits necessaris: Estar d'acord amb fer una estada a Austràlia, beure cervesa i la que vaig sentir de passada que deia alguna cosa sobre voler fer un doctorat. Qui pot no quedar meravellat! Gràcies per escoltar-me sempre, guiar-me científicament i en alguns moments personalment. I sobretot per ensenyar-me a escriure i fer-me somriure en moments de nervis amb les correccions.

Meri, tothom ha tingut una mama pato, i saps que la meva ets tu. M'encanta quan al lab comparem protocols entre nosaltres i els meus sempre coincideixen amb els teus i és que... a mi m'ho va ensenyar la Meri! La persona més metòdica i eficient que he conegut mai. Amb tu he après a treballar. Sempre has estat al meu costat i hem compartit mil experiències juntes que han fet que tu siguis una de les persones claus en la meva vida. I és que, *dejarse llevar suena demasiado bien*, i amb tu ens ha anat genial! La meva companya a Sydney, dels mesos més vitals de la meva JOVE vida...No ho hagués pogut fer sense tu. No puc estar més d'acord amb tu...Una de les millors coses que m'han passat durant aquest tesi ha estat coneixe't. Estic molt orgullosa de tu i et desitjo el millor en la teva nova vida, que de ben segur no em perdre. Gràcies també al Ramon que saps que l'aprecio moltíssim, Meri...no el deixis mai escapar!

Ana, mi niña, que puedo decirte, no puede haber nadie con más vitalidad que tú. No imaginas lo mucho que agradezco que entraras en el lab. Hace menos de 3 años que te conozco y parece que formes parte de mí desde siempre. Citando a

nuestra Meri, *no está quitao* que venga de antes, porque quién no conoce a Ana?! Compartir estos últimos años contigo ha sido una gran experiencia, me ha encantado discutir nuestros resultados y compartir nuestras penas y alegrías. Aquí tienes a una hermana, pequeña, que siempre estará a tu lado en todo. Sé que a partir de aquí nos queda mucho por descubrir y tú y yo sabemos que *I won't sit down and I won't shut up and most of all I will not grow up!*

Chicas! Cuantos momentos hemos pasado juntas. ¿Os acordáis que éramos los tres ángeles de Charlie? Trabajar con vosotras y ser vuestra amiga es ideal!

Cuando alguien llega nuevo la mejor suerte que puede tener es encontrarse con Maria. Muchas gracias por todo lo que has hecho por mí durante todo este tiempo. Sabes que siempre podrás contar conmigo. Sandra, ha estat un plaer compartir amb tu aquests anys i l'article! Moltes gràcies per tota la teva ajuda i tot el que m'has ensenyat. Et desitjo tot el millor a partir d'ara. I, la nova adquisició, Elsa...ben aquell que diu...hi havia una noia molt alegre que va donar aire fresc al lab? Doncs aquesta és l'Elsa. No seré en el final del teu doctorat, però he pogut veure els teus inicis...*que pasará, que misterio habrá...*Estic convençuda que triomfaràs i no t'equivoquis, hi seré per celebrar-ho.

Iona, ja et tinc aquí! No puc pensar en ningú que tingui un riure que em faci tan feliç (espera, m'ha vingut la Marta al cap just ara...). Ets algú amb qui crec que he compartit i compartiré molt a la meva vida. Has estat al meu costat en la majoria de moments que recordo. Moments difícils on m'has donat consells molt bons i d'altres que mai oblidaré perquè són molt nostres. I és que, no hagués pogut mai aconseguir entrades finalment tan cares com amb tu, i només tu et pots fixar en unes ulleres tortes. M'encanta conèixer de tu que ets molt forta, però alhora una de les persones més sensibles que conec. *Els llums s'han apagat...*però s'encenen milions d'espelmes que bufarem juntes.

Este grupo tiene un miembro muy especial. Hay personas que hacen que todo funcione y que el ambiente sea tan bueno que aunque las cosas vayan mal, todo va bien. Y es que Alba, eres buenísima! Juntas aprendimos a hepatectomizar... Siempre con una sonrisa dispuesta a ayudar. Y es que *I have to, I have to...I have to* decirte que eres una de las personas más importantes para mí y siempre me tendrás a tu lado. *Ojala te hubiera conocido antes!*

L'Albert, l'Albert del lab, algú que m'ha fet valorar i estimar el meu projecte i les ganes de tirar endavant. Gràcies per sempre confiar en mi i donar-me suport en tot. Crec que ets una persona brillant! Les discussions amb tu m'han convertit en *metabolic girl* i deixant de banda la resta, aquesta tesi no l'hagués pogut tirar endavant sense tu. Ets algú molt especial i confio molt en tu, sé que t'espera un llarg viatge un llarg *Highway to hell* i al final trobaràs tot el que busques.

David...què t'he de dir...trobaré a faltar les teves bromes diàries. També et diré que a partir d'ara tot millorarà, no em tindràs per riure-t'ho tot així que hauràs de anar

una mica més enllà. La meua meta és arribar a prendre'm la vida només $\frac{1}{4}$ de com te l'ha presa tu. Ha estat un plaer compartir el doctorat amb algú tan intel·ligent, alegre i positiu com tu. Està clar que *don't worry about a thing, cause every little thing is gonna be alright*. Gràcies per sempre ser-hi i saps que jo també hi seré.

Ara, la Marta, una altra de les ànimes del lab. Tot i que ara la tenim en un despatxet, tots podem gaudir dels seus millors moments! Junt amb la Iona, el teu riure sempre me n'ha fet treure un a mi. Aportes la vitalitat i l'organització que són tan necessàries. Crec que sempre t'he trobat un model a seguir i com ja saps, vull arribar a ser com tu. Amb tu he fet FACS i respirometries i tan sols amb això he pogut aprendre què és treballar amb ganes...Gràcies per tota la teua ajuda i els moments que hem discutit resultats o de la vida en general.

El Siscu i l'Albert Pol, els altres caps de grup. Moltes gràcies Siscu per la teua dedicació i la capacitat de deixar-ho tot per ajudar, ha estat un plaer treballar amb tu. Albert, evidentment no puc deixar d'agrair-te la teua ajuda en el projecte. Seguint els teus passos hem pogut tirar endavant en moments d'estancament. Però també vull donar-te les gràcies per molts altres moments en què hem rigut i em compartit celebracions i unes quantes cerveses, de nou, un plaer treballar amb tu.

Al llarg d'aquest anys també he dit adéu a gent meravellosa com l'Adam, a qui he d'agrair la seva ajuda amb els ratolins i la seva capacitat per animar el dia en qualsevol situació. La Maite, una gran sort haver-la conegut amb un gran sentit de l'humor i algú amb qui mai es pot perdre el contacte per molt lluny que estigui. També han passat pel lab molts màsters i alumnes en pràctiques. No he coincidit amb les noves joves promeses d'aquests últims mesos, l'Albert, la Maria, el Frederic i la Camilla però em consta que són genials i omplen d'alegria i ciència fresca el lab. Mencionar a la Barbara, la portuguesa amb més alegria, prazer em conhecer você. I no em puc deixar algú molt especial, Amigaaa! Celia, va ser molt bo tenir-te al lab, una llàstima que per poc temps, però suficient com per saber que ets una gran persona i que seguirem sempre en contacte. Gràcies per la teua felicitat i per tota l'ajuda que m'oferies en tot moment, els resultats de glicogen són teus... Molta sort en tot, t'ho mereixes i aquí estem per celebrar-ho amb tu. També agrair a la Teresita per l'ajuda que sempre m'ha donat a cultius primaris i els bons consells. I a la Loli, que sempre ha estat pendent de tots nosaltres, per les sorpreses que em deixava a la poyata i per ser tan agradable com és!

Està claríssim que no es pot haver treballat en un millor ambient. I tot i així tots sabem que el nou lab (ja no tan nou) és un d'aquests edificis malalts...No puc deixar d'agrair els molts moments que han fet que el meu doctorat sigui genial tan a dins com a fora del lab: birres, celebracions de papers, tesis, aniversaris, seminaris, calçotades, paellades, experiments, festivals, festivals sense ser festivals, llàgrimes, moments durs que se superen amb vosaltres, discussions científiques, algunes discussions productives no tan científiques, concerts, sopars, cafès,

musicals, monòlegs, teatre, viatges, excursions, tappers...Així doncs, només us puc dir una cosa: *Os quiero a morir!*

També vull agrair a la resta de gent de l'altre lab especialment a tot el grup de la Neus Agell amb la Montse, les Sònies, l'Edu i les seves noves incorporacions. Evidentement, a ti Amaia, porque eres una gran persona y me ha encantado conocerte. Está claro que aquí no acaba todo y nos queda mucho por ver, Urte berri on!! La Noe una persona clara, treballadora i encantadora. I el Carles Barceló, amb sempre un somriure i experiències a explicar que mai podré oblidar.

L'Alba Llopis, que encara que ara et tenim més lluny saps que ets algú a qui seguiria a Holanda o *a cualquier otra parte*. He passat molts bons moments amb tu i t'he explicat moltes més intimitats de les que altres coneixen i probablement coneixeran mai. També crec que ets brillant i el futur de la ciència està salvat amb gent com tu. Gràcies per tots aquest anys!

Junt amb l'Alba també vull agrair l'Alba Gómez, la Marta i l'Atilla. Amb ells vaig passar un cap d'any increïble a casa l'Amaia i molts altres moments en festes, Petit Pas i Aigües Tortes. He tingut molta sort de viure això amb vosaltres, amb gent així es pot, i penseu que queda molt més, això no pot quedar a mitges...Alba, moltes gràcies per la teva capacitat per escoltar i fer passar molts bons moments. Ha estat genial passar aquest temps amb tu. Marta, ha estat un gran plaer coneixe't, m'encanta el teu esperit crític i lo disposada que estàs sempre a escoltar, ajudar i passar-ho bé, gràcies de debò. I l'Atilla, me encantas! Con gente como tu todos podemos tirarnos donde sea sin pensar y gritar ¡"Shambalaaaa"!

En aquest sentit també vull donar gràcies pels clubs de lectura, hem llegit molts llibres...de bons i de pesats, una activitat que no deixaré perdre, gràcies a les organitzadores Alba i Marta! Aquí parlaré de l'Eulàlia, perquè crec que és aquí on ens hem conegut més. Gràcies per sempre mantenir-te en contacte amb nosaltres, per ser algú tan interessant i estar pendent de tot. És molt agradable compartir llibres amb tu.

Moltes gràcies també a les noies del confo, la Maria, l'Anna i l'Elisenda. Gràcies per no perdre la paciència cada cop que he necessitat ajuda després de fer mesos que no pujava. La meva portada no seria el que és sense vosaltres.

A la gent de l'estabulari, tots i cada un de vosaltres heu fet que pugues treballar. La Meri, perquè sempre ha pogut fer-ho tot possible, i per la part personal, en què sempre m'ha ajudat. El Pep, per solucionar sempre els meus dubtes amb un somriure i pels nostres intercanvis de femelles ben jovenetes! A l'Ignacio, porque eres un auténtico sol. El Gari, que sempre m'ha atès amb ganes d'ajudar. Els Ivans i el Robert que sempre han estat disposats a ajudar-me, i a tota la resta que feu possible que l'estabulari funcioni.

I com no, els ratolins! Sense ells no hi hauria res... Em sap greu tot plegat, però no caureu en el oblit...Ho prometo!

A banda de la gent del Clínic, molta altra gent ha estat al meu costat i ha fet possible aquesta tesi.

La Marina, la meva amiga de fora de l'àmbit científic, gràcies per ser com ets i fer que la vida sigui més senzilla. *Sometimes the strongest and most wonderful things are those we cannot see...* Perquè juntes hem viscut tot tipus de moments i no recordo ni un en què encara que no hi fossis, no t'hi tingués. Estic molt orgullosa de tu i del que has aconseguit. T'estimo!

Gràcies també a l'Ivan, porque hemos pasado muy buenos momentos juntos y porque tu humor muchas veces me ha ayudado a verlo todo mejor. I per últim al Jaume i la Miriam, que amb els vostres impostos heu aconseguit que arribi fins aquí, us estimo i sou genials!

Pol, sense tu no hagués començat aquest doctorat. Gràcies per fer-ho possible i recolzar-me durant molt de temps. Seguidament, em venen al cap tots els de Granollers, sou gent genial! Sobretot vosaltres, Gina, Laia, Azor, Annes, Berta, Cristina sóc molt feliç d'haver-vos conegut i gràcies per estar sempre al meu costat! També a la Clàudia, una gran casualitat i sort trobar-nos a Almirall.

A la gent d'Almirall, on vaig estar uns 2 anys, per tot el que em van recolzar i ensenyar. L'Amadeu, per sempre tenir un moment per mi i deixar que fes el que em passés pel cap. La Clara, que va ser una tutora genial, que em va ensenyar, motivar i ajudar en tot moment. La Laia, l'Elena, la Mireia, el Fèlix, el Luís i tota la resta que em van ensenyar i ajudar sempre amb un somriure. Especialment vull anomenar a la Raquel, que també va ser tutora meva durant el meu primer any i va fer que confiés en mi. Algú que sempre m'ha empès cap a fer el doctorat i tirar-ho tot endavant. Mai oblidaré que sense el teu ànim i dedicació no m'hagués plantejat fer la tesi. Moltes gràcies! Juntes vam passar molts bons moments! I la Núria, perquè va passar a ser com una mama a la que estimes molt allà dins, ets una gran persona!

I ara si!!! Els Bioguapos, perquè sou els amics més macos que puc tenir. Perquè sou qui fa que pensi...pues...no estem tan malament, la majoria sabeu pel que estem passant, *nobody said it was easy*. I com em va dir un dia un savi Romani, *estem sortint d'aquest berenjena!* Duem junts des del 2004 i l'ambient científic del grup es perfecte per uns doctorands. Així, agrair primer de tot a l'Amado, gràcies! A la Olalla, la Dra. Bueno, per ser una amiga con quien siempre contar y porque haces que por mucho tiempo que pase todo esté al día como cuando vivías en la resa. Me has dado siempre las ganas y el ánimo para no decaer y aunque cueste, ya sabes que a veces hay que hacer un esfuerzo. Txell, en aquests últims temps m'he recolzat bastant en tu, m'ha agradat tenir-te a prop i espero que en el futur sigui així, ja sigui aquí o allà, gràcies. Joan, duem anys seguint-nos, màster,

Almirall i Clínic. I pensar que vas fer l'entrevista per formar part de les Annexines, haguessis conegut gent genial...Sóc molt feliç de tenir-te a prop i saber que puc comptar amb tu per tot, ets un gran amic. Al clínic, teníem un petit gueto amb el Marc, tot i que la idea era fer dinar setmanal va passar a dir-se mensual tot i que es feia per trimestres. M'ha agradat molt compartir els dinars amb vosaltres nois! Ens hem fet coaching i molt bons consells. Mònica! Algú que sempre té un somriure, gràcies per formar part de la meua vida i sempre estar atenta a tot, ets una persona increïble. Heleia, has sentit bé? Estem sortint d'aquest berenjena! Ets de les persones més vàlides i treballadores que conec, no deixis mai que ningú et digui el contrari. Moltes gràcies per estar sempre al meu costat. Laura, gràcies per ser algú tant clar i que m'ha donat consells molt bons, encara que no t'ho creguis he escrit les cartes que em vas dir un dia i tenies raó, aquí queda tot. Cebalot! Has vist on hem arribat? Qui ens ho diria a primer, dos desastres totals. Espero que triomfis i compta sempre amb mi. Jo també vull festa en el teu yate!! Laia, la nostra primera mare, gràcies per la teua alegria i moltes felicitats! Ernest, perdut pels madriles, gràcies per la teua vitalitat i per les teves ganes amb tot! Sou genials tots!

Moco! Amb un gràcies no n'hi ha prou. Gràcies per formar part de la meua vida...No imagines com et trobo a faltar. Tot i així aguanto, em guardo el skype per un moment especial (recordo que només me'n dones un). Sempre has fet que tiri endavant i es ben cert que m'has ajudat molt durant la tesi. Ets un gran amic i de les millors persones que tinc al meu costat. Espero que tot ens vagi molt bé i ens trobem aviat pel món. T'estimo!

I l'Estel, que ens hem convertit en veïnes de lab. Genial saber que ets al costat, tot i que hem fet milions de cafès *interruptus* es molt agradable sentir darrere la veu amiga que busca gel. Gràcies per escoltar-me i estar sempre pendent de mi, molta sort en tot! La Marta, amb qui ens hem explicat misèries, però també hem rigut molt. Gràcies per entrar el CEK, ha estat increïble trobar-te sempre sense esperar-ho!

També agrair a la gent que juntament amb la Meri vam conèixer a Sydney. El Victor, saps que has sido alguien muy importante para mi durante esta tesis. Muchas gracias por tu apoyo incondicional e intentar siempre encontrar la solución. Alvarito! Gracias por tu alegría, por tu preocupación siempre por mí, por estar dispuesto a echar una mano en todo momento. Definitely (/i' defɪnɪtli/), fue genial compartir contigo los meses que pasamos en Sydney y... ¡Recuerda! Cuando nos retiremos nos vamos a Jervis Bay!

Sempre es comencen els agraïments amb els directors, perquè sense ells la tesi no hauria estat possible, i és cert. Però hi ha persones encara més importants sense les quals no hi ha res a fer, els pares...

Gracias por, primeramente, haberme dado vida. Y después por haber hecho posible que llegue hasta aquí. Espero que os sintáis muy orgullosos, al menos

tanto como yo me siento de los padres que tengo. Os agradezco toda la dedicación y las ganas de hacer que estudie, siempre vuestra máxima, pero sin dejar de vista que hay que divertirse, que solo se vive una vez. Padres no hay más que unos, y aunque siempre diga que menos mal, doy gracias que seáis vosotros. Vuestro apoyo incondicional, el sufrimiento cuando sufro y la alegría cuando me alegro han hecho que, después de todo aquí estemos. Al final este es mi libro, el que os dedico. ¡Os quiero!

También a toda mi familia, mis tíos y mis abuelos, los que ya no están que sé que estarían más que felices, y los que tengo siempre a mi lado y con los que celebraremos esto y tanto más. Gracias por apoyarme siempre en todo y darme ánimos siempre con un: *tú estudia mucho*. También quiero volver a recordar que, no...no podré hacer recetas, lo siento. A mi primo por siempre preocuparse por mí y darme ánimos y a Desi siempre pendiente de como estoy. Esto también os lo debo a vosotros y a los peques que me alegran cualquier momento. Así, que deciros que *lo más lejos a vuestro lado*. A mi prima, que aunque parezca mentira y a pesar de que la he avisado, ha decidido estudiar biología. Estoy muy orgullosa de ti y puedes con esto y más! Gracias a todos.

Ja per acabar, vull fer un agraïment especial a l'Albert. Com l'hem liat! Durant tot aquest recorregut has estat al meu costat com a gran amic, tant que no hi ha hagut prou. Has estat el meu *wonderwall* durant tota la tesi, sobretot en aquest final. Agraïxo poder tenir amb tu bones discussions, tu i jo ja discutíem d'abans...Gràcies per tot i per ser tu sempre. Aquest llibre, finalment, també és teu i dir-te que, què hi farem! Ha anat així...

Finalment he escrit més de 6 pàgines, no arribo a tantes pàgines en la tesi com molts dels meus predecessors. Però estava clar que aquí m'esplaiaria i es que, qui pot xerrar tan com jo? Així us deixo rere aquestes paraules amb ànims d'haver commogut i provocat alguna llagrimeta...

Gracies a tots i fins sempre,

Anna

Todos los días sale el sol.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	25
PRÓLOGO	27
INTRODUCCIÓN	29
1. Las annexinas	31
1.1 Estructura molecular de las annexinas	32
1.2 Localización de las annexinas	33
1.3 Funciones de las annexinas	33
1.4 Patologías asociadas a annexinas (annexinopatías)	35
2. Annexina A6	37
2.1 Estructura de Annexina A6	37
2.2 Localización y expresión de Annexina A6	38
2.3 Funciones de Annexina A6	39
2.2.1 Annexina A6 y la homeostasis de colesterol:	39
2.2.3 Annexina A6 y el citoesqueleto de actina:	42
2.2.4 Annexina A6 y el transporte endosomal:	42
2.2.5 Annexina A6 y la señalización celular:	43
2.4 Annexina A6 y las patologías asociadas	44
2.5 Ratones genoanulados de Annexina A6	45
3. El hígado	47
3.1 La estructura del hígado	47
3.2 Las células hepáticas	50
3.3 La fisiología hepática	53
3.3.1 Metabolismo lipídico hepático:	53
3.3.2 Metabolismo de carbohidratos:	59
3.3.3 Metabolismo de los aminoácidos:	67
3.4 El hígado en el estado postprandial y el ayuno	71
3.4.1 Estado postprandial:	72
3.4.2 Ayuno:	74
4. La regeneración hepática	77
4.1 Hepatectomía parcial	78
4.2 Fases de la regeneración hepática	80
4.2.1 Fase de activación:	81

4.2.1 Terminación:.....	86
4.3 Respuesta metabólica durante la regeneración hepática.....	87
4.3.1 Metabolismo lipídico:.....	88
4.3.2 Metabolismo de la glucosa:.....	89
4.2.1 Metabolismo de los aminoácidos:.....	90
OBJETIVOS	93
RESULTADOS	97
1. Caracterización de la estructura y función hepática de los ratones AnxA6 ^{-/-} ..	99
2. Análisis de la regeneración hepática en ratones AnxA6 ^{-/-}	105
3. Estudio de las fases de regeneración hepática.	108
3.1 Fase de activación.....	108
3.2 Proliferación celular.	112
3.3 Respuesta metabólica.	115
3.3.1 Esteatosis hepática post-HP:.....	115
3.3.2 Metabolismo de la glucosa post-HP:	120
4. Efecto del aporte adicional de glucosa en la regeneración hepática de los ratones AnxA6 ^{-/-}	123
5. Análisis de la homeostasis de glucosa en ausencia de AnxA6.	127
6. Respuesta metabólica de los ratones AnxA6 ^{-/-} en situación de ayuno.	134
6.1 Homeostasis de glucosa durante el ayuno.....	134
6.2 Homeostasis lipídica durante el ayuno.	136
6.3 Homeostasis de aminoácidos durante el ayuno.	139
7. Estudio de la gluconeogénesis hepática en ausencia de AnxA6.....	141
7.1 Expresión relativa de las enzimas gluconeogénicas.	141
7.2 Gluconeogénesis a partir de diferentes sustratos.....	142
7.3 Expresión relativa de las enzimas alanina aminotransferasa y lactato dehidrogenasa.....	146
8. Estudio de la implicación de la AnxA6 en la gluconeogénesis hepática a partir de alanina.....	148
8.1 Captación de L-alanina en los hepatocitos.....	148
8.2 Efecto de la AnxA6 en los transportadores de alanina.....	148

DISCUSIÓN	153
1. Caracterización del ratón AnxA6 ^{-/-}	157
2. Composición lipídica del hígado de los ratones AnxA6 ^{-/-}	159
3. Los ratones AnxA6 ^{-/-} en el proceso de regeneración hepática.....	163
4. Alteraciones del metabolismo hepático durante la regeneración.....	167
5. Los ratones AnxA6 ^{-/-} tienen un defecto en la homeostasis hepática de glucosa. 171	
6. Papel de Annexina A6 en la gluconeogénesis hepática.....	175
7. Implicación de Annexina A6 en el transporte de alanina.....	181
CONCLUSIONES	187
MATERIALES Y MÉTODOS	191
1. Modelo animal para el estudio in vivo.....	193
1.1 Genotipaje de los ratones AnxA6 ^{-/-}	193
1.1.1 Extracción de DNA genómico:.....	193
1.1.2 PCR para el genotipaje de los ratones AnxA6 ^{-/-} :.....	193
2. Hepatectomía parcial de 2/3 (HP).....	196
3. Estudio de la conducta alimentaria.....	197
4. Obtención y preparación de muestras de ratón para el análisis hepático.	197
4.1 Extracción de hígado de ratón.....	197
4.2 Preparación del homogenado de hígado.....	197
4.3 Fijación del hígado e inclusión en parafina.....	198
4.5 Extracción de sangre.....	199
5. Aislamiento de hepatocitos de ratón.....	199
5.1 Cultivo primario de hepatocitos.....	201
5.2 Tratamiento de hepatocitos en cultivo primario con HGF y EGF:.....	202
6. Análisis de expresión.....	203
6.1 Análisis de expresión génica.....	203
6.1.1 Obtención de RNA de hígado de ratón:.....	203
6.1.2 Retrotranscripción para obtener DNA complementario:.....	203
6.1.3 PCR cuantitativa:.....	203
6.2 Análisis de expresión de proteica.....	204
6.2.1 Cuantificación proteica mediante la técnica de Bradford:.....	204
6.2.2 Preparación de la muestra para electroforesis:.....	205

6.2.3 Gel de acrilamida (SDS-PAGE) y Electroforesis:	205
6.2.4 Transferencia a membrana:.....	207
6.2.5 Western blot (WB):	207
6.3 Análisis de los marcadores en sangre y orina.	209
7. Estudio de la proliferación celular.....	210
7.1 Inmunohistoquímica de PCNA:.....	210
7.2 [³ H]-timidina en ratones tras la HP:.....	211
8. Citometría de flujo para la determinación de CL en hepatocitos aislados. ...	212
9. Pull down de AnxA6 en hígado de ratón.	213
10. Estudio lipidómico del hígado de ratón.....	214
10.1 Extracción de lípidos del hígado.....	214
10.2 HPLC.....	215
10.3 Espectrometría de masas.....	216
11. Técnicas de microscopía.	216
11.1 Microscopía óptica. Hematoxilina/Eosina (H/E) y técnica de PAS.....	216
11.2 Microscopía electrónica de hígado de ratón.....	217
11.3 Detección de Nile red por microscopía de fluorescencia.....	218
12. Técnicas para el estudio del metabolismo de la glucosa.....	218
12.1 Cuantificación de la concentración de glucosa en sangre de ratón.....	218
12.2 Cuantificación de la concentración de insulina en plasma de ratón.	218
12.3 Cuantificación de la concentración de glucagón en plasma de ratón.	219
12.4 Extracción y cuantificación de la concentración de glucógeno en hígado de ratón.	219
12.5 Test de tolerancia a la glucosa.....	220
12.6 Test de tolerancia a la insulina.	220
12.7 Producción de glucosa en sangre ante sustratos gluconeogénicos in vivo.	220
12.8 Producción de glucosa en hepatocitos aislados ante sustratos gluconeogénicos.....	221
12.9 Captación de NBDG.....	222
13. Aislamiento de membrana sinusoidal de hígado de ratón.	223
14. Aminogramas de sangre e hígado de ratón.....	225

14.1 Plasma.....	225
14.2 Hígado.....	225
14.3 Tratamiento común de todas las muestras.....	226
15. Transporte de [¹⁴ C]-L-alanina en hepatocitos aislados.....	227
16. Análisis estadístico.....	228
BIBLIOGRAFÍA.....	229
ANEXO.....	255

ABREVIATURAS

Ácido araquidónico	AA
Ácidos grasos	AG
Ácidos grasos no esterificados	NEFA
Alanina aminotransferasa	ALAT
Annexina A6	AnxA6
Antígeno nuclear de proliferación celular	PCNA
AnxA6 KO	AnxA6 ^{-/-}
Aspartato aminotransferasa	AST
Células de ovario de hámster chino	CHO
Cuerpos lipídicos	CL
Endosoma Tardío	LE
Endosoma Temprano	EE
Ésteres de colesterol	EC
Factor de crecimiento hepático	HGF
Factor de crecimiento epidérmico	EGF
Factor de necrosis tumoral	TNF α
Fosfoenolpiruvato	PEP
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	PEPCK
Fosfolipasa A2 citoplasmática	cPLA ₂
Fructosa-1,6-bifosfatasa	F1,6Pasa
Fructosa-1,6-fosfato	F1,6P
Fructosa-6-fosfato	F6P
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	G3PDH
Glicerol-3-fosfato	G3P
Glucógeno fosforilasa	GP
Glucógeno sintasa	GS
Gluconeogénesis	GNG
Glucoquinasa	GCK
Glucosa-6-fosfatasa	G6Pasa
Glucosa-6-fosfato	G6P
Hematoxilia/Eosina	H/E
Hepatectomía parcial	HP
Interleuquina-6	IL-6
Intraperitoneal	i.p
Lactato dehidrogenasa	LDH
Lipoproteína de alta densidad	HDL

Lipoproteína de baja densidad	LDL
Lipoproteína de muy baja densidad	VLDL
Niemann Pick tipo C1	NPC1
Piruvato deshidrogenasa	PDH
Piruvato deshidrogenasa quinasa	PDK
Piruvato quinasa del hígado	PK-L
Proteína activadora GTPasa p120	p120GAP
Proteína asociada a retrovirus	Ras
Proteína asociada a Ras	Raf-1
Proteína quinasa activadora mitogénica	MAPK
Proteína quinasa $C\alpha$	PKC α
Receptor del factor de crecimiento epidérmico	EGFR
Receptor del factor de crecimiento epidérmico	EGFR
<i>Solute Carrier</i>	SLC
Tinción de Schiff con ácido periódico	PAS
Transportador de glucosa	GLUT
Triacilglicéridos	TAG
<i>Wild type</i> (ratón salvaje)	WT

PRÓLOGO

Annexina A6 forma parte de una familia de proteínas altamente conservadas de unión a fosfolípidos de membrana de manera dependiente de Ca^{2+} . Esta proteína pleiotrópica está implicada en la regulación de procesos de endocitosis y exocitosis intracelular, así como de la homeostasis intracelular de colesterol y la señalización celular. El estudio del papel de AnxA6 en nuestro laboratorio, y en la mayoría de grupos, se ha llevado a cabo mediante la sobreexpresión de la proteína.

Annexina A6 es una de las proteínas más abundantes en el hígado. En esta tesis se describe la función de Annexina A6 en el metabolismo hepático con una implicación en la homeostasis de glucosa, utilizando un ratón genoanulado para Annexina A6 en dos modelos fisiológicos: la regeneración hepática y el ayuno.

Hemos analizado la participación de Annexina A6 en la movilización de lípidos para la acumulación en el hígado y la activación de vías de producción de glucosa a partir de diferentes sustratos como los aminoácidos, durante el proceso de regeneración hepática y el ayuno. Este es el primer estudio que relaciona Annexina A6 con un proceso metabólico y la asociación con transportadores celulares de solutos. El papel fisiológico de Annexina A6 constituye un nuevo campo que proporciona a esta proteína gran interés como diana en diferentes procesos metabólicos y alteraciones en la homeostasis de la glucosa.



INTRODUCCIÓN

1. Las annexinas

Las annexinas son una familia de proteínas altamente conservadas de unión a fosfolípidos negativos de membrana de forma dependiente de calcio [1]. Su nombre deriva del griego *Annex*, que significa unir y mantener unido, describiendo una de las principales propiedades de casi la totalidad de estas proteínas. Si bien es verdad que a finales de los años 70 y principios de los 80, momento en que las annexinas fueron descubiertas, la denominación hacía referencia a las propiedades bioquímicas (Tabla 1) [2], no fue hasta el 1990 que la nomenclatura de las annexinas se formalizó al identificarse la homología de secuencia entre estas proteínas [3].

Tabla 1. Nomenclatura que recibían las actuales annexinas haciendo referencia a las propiedades bioquímicas.

Nombre	Origen	Referencia
Sinexinas	Agregación de gránulos	Creutz, et al., 1978 [1]
Cromobondinas	Proteínas de unión a gránulos de cromafines	Creutz, et al., 1987 [4]
Calcimedinas	Proteínas mediadoras de la señalización de calcio	Moore et al., 1984 [5]
Lipocortinas	Proteínas inhibidoras de lipasa inducible por esteroides	Flower et al., 1986 [6]
Calpactinas	Proteínas de unión a calcio, fosfolípidos y actina	Glenney et al., 1987 [7]

Por definición las annexinas cumplen 2 criterios: I. Ser capaces de unir fosfolípidos negativos de forma dependiente de Ca^{2+} , y II. Contener 4 repeticiones del elemento estructural conservado llamado “repetición annexina”, de unos 70 residuos de aminoácidos que forman una tétrada [2]. Se han descrito 160 annexinas que se clasifican filogenéticamente en 5 grupos: vertebrados (A), invertebrados (B), hongos (C), plantas (D) y procariotas (E). En humanos se han identificado 12 genes annexina diferentes, con nomenclatura de A1-13 o AnxA1-13, quedando AnxA12 por asignar, y que codifican para múltiples variantes de *splicing* [8].

A continuación se detallará la estructura molecular de esta familia de proteínas, su localización subcelular y algunas de las funciones principales que se han descrito

para cada una de ellas. También se describirán las patologías (annexinopatías) asociadas tanto a un incremento como a una disminución en la expresión de algunas de estas annexinas.

1.1 Estructura molecular de las annexinas.

Todas las annexinas están compuestas por dos dominios principales: I. El extremo C-terminal muy conservado (núcleo de la proteína) y II. El extremo N-terminal que confiere la variabilidad a estas proteínas regulando la interacción con otros ligandos y con las membranas.

El núcleo de todas las annexinas está formado por cuatro repeticiones en tándem conocidas como tétrada, a excepción de la AnxA6 que contiene 2 tétradas separadas por una región de unión. Es en estas repeticiones donde se encuentran los sitios de unión a Ca^{2+} y fosfolípidos negativos de membrana. El estudio estructural por cristalografía de AnxA5 muestra un elevado plegamiento de cada uno de los segmentos formados por 5 hélices α (Figura 1).

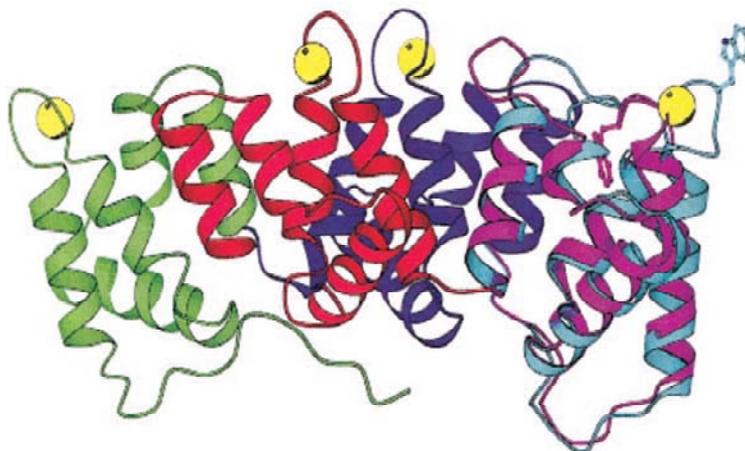


Figura 1. Estructura cristalográfica de AnxA5. Se puede observar el elevado plegamiento de la hélice α del núcleo de la proteína. Las 4 repeticiones formadas por 5 hélices α se muestran en diferentes colores, verde (I), azul (II), rojo (III) y violeta (IV). El dominio N-terminal se extiende desde la repetición I (verde). El Ca^{2+} representado en forma de esfera amarilla se muestra en los sitios de unión descritos. Imagen modificada de Liemann y Lewit-Bentley, 1995 [9].

1.2 Localización de las annexinas.

Las annexinas se encuentran mayoritariamente en el citoplasma celular de forma soluble y libre o en las membranas de orgánulos intracelulares. Al aumentar los niveles de Ca^{2+} , las annexinas pueden translocar a la membrana plasmática asociadas establemente con proteínas del citoesqueleto o proteínas que median las interacciones entre membranas de diferentes compartimentos [8, 10]. De hecho, se ha descrito que las annexinas pueden encontrarse en diferentes localizaciones subcelulares y asociadas a la membrana plasmática, alternando entre ellas en respuesta a Ca^{2+} [2]. Algunas annexinas, como AnxA2 y AnxA11, han sido descritas en el núcleo [11, 12]. Los niveles de expresión de AnxA1, A2, A4, A5, A6, A7, A11 son abundantes y su distribución en diferentes tejidos ubicua. Por otro lado, AnxA3 se expresa selectivamente en neutrófilos, AnxA8 en la placenta y la piel, AnxA9 en la lengua, AnxA10 en el estómago y AnxA13 en el intestino delgado [8].

Las annexinas también se encuentran en el espacio extracelular como posibles productos de la lisis celular o bien, por la existencia de un transporte específico que media la secreción al exterior de las células [2].

1.3 Funciones de las annexinas.

La identificación de los procesos biológicos en los que las annexinas están involucradas ha ido progresando con el uso cultivos celulares y animales genoanulados para cada una de estas proteínas [8].

La capacidad específica de cada annexina para unirse a fosfolípidos negativos de la región citoplasmática de la membrana, de forma dependiente de Ca^{2+} , confiere especificidad para la realización de múltiples funciones. Las annexinas tienen la habilidad de actuar como nexos de unión entre membranas y entre éstas y el citoesqueleto. La concentración de Ca^{2+} libre necesario para la translocación de las annexinas a la membrana plasmática es muy amplio [13]. De esta manera, las annexinas están implicadas en la regulación de la exocitosis dependiente de Ca^{2+} , algunos procesos endocíticos y en la estabilización de dominios específicos de

agregación de vesículas de las membranas de orgánulos, como los endosomas, con la membrana plasmática [14], así como la regulación del citoesqueleto de actina [15] y la modificación de canales iónicos [16]. Además se ha descrito muchas otras posibles implicaciones de las annexinas en procesos diversos como la unión a RNA, la adhesión celular y procesos del desarrollo [8].

Las AnxA1, AnxA2, AnxA5 y AnxA6 son proteínas que interactúan con el citoesqueleto de actina [2]. Se ha visto que AnxA2 se une a zonas de membrana ricas en colesterol denominadas balsas lipídicas (en inglés *Lipid rafts*) [2, 10] y se ha demostrado que participa en la estabilización de F-actina a través de su interacción con fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato [17] [18]

Por otro lado, AnxA7 fue la primera que se vio implicada en procesos de exocitosis mediada por Ca^{2+} , promoviendo la fusión de gránulos cromafines [1, 4]. Posteriormente, annexinas como AnxA2, AnxA6, AnxA13 han sido implicadas en la regulación de la exocitosis [19, 20]. Además, AnxA1, AnxA2, AnxA6 y la AnxA8 han sido localizadas en endosomas con una implicación directa en procesos de endocitosis [2].

La Tabla 2 contiene un resumen de las principales funciones de las annexinas anteriormente comentadas.

Tabla 2. Resumen de las principales funciones de las annexinas.

Annexina	Funciones
AnxA1	<ul style="list-style-type: none"> - Interacción con F-actina y regulación de la polimerización de actina [2] - Anti-inflamatorio [21-23] - Agregación de vesículas - Internalización EGFR [24], Inhibición de EGFR en MVB [25] - Respuestas pro-apoptóticas en linfocitos T [26]
AnxA2	<ul style="list-style-type: none"> - Interacción con F-actina y anclaje a la membrana plasmática [17] - Fibrinólisis [27] - Agregación de vesículas, tráfico celular (endocitosis/exocitosis) [28] - Interacción con mRNA [28] - Modulador de canales iónicos de Cl^- en la membrana plasmática [10] - Ordenación de dominios lipídicos de membrana [29]
AnxA3	<ul style="list-style-type: none"> - Desarrollo de tumores, metástasis y resistencia a antitumorales [30] - Regeneración hepática [31]
AnxA4	<ul style="list-style-type: none"> - Modulador de canales iónicos de Cl^- en la membrana plasmática [10]
AnxA5	<ul style="list-style-type: none"> - Anticoagulante [32] - Estabilización y curvatura de la membrana plasmática por la formación de

	trímeros promoviendo la formación de vesículas endocíticas durante procesos apoptóticos [33]
AnxA6	- Modulador de canales iónicos de Cl ⁻ en la membrana plasmática [10] - Homeostasis del colesterol - Interacción con el citoesqueleto de actina - Inhibición de la vía EGFR/Ras - Regulación del tráfico vesicular [34]
AnxA7	- Agregación de gránulos cromafines - Exocitosis - Agregación liposomal - Canales de Ca ²⁺ - Supresor de tumores [35]
AnxA8	- Interacción con F-actina [36] - Regulación de endosomas tardíos [25, 37]
AnxA9	- Unión a liposomas [38]
AnxA10	- División celular - Apoptosis - Control del crecimiento celular - Tráfico celular [39]
AnxA11	- Citoquinesis [40]
AnxA13	- Transporte apical de dominios ricos en colesterol y esfingolípidos de la red <i>trans</i> Golgi y exocitosis [19]

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico; MVB; Cuerpos multivesiculares.

1.4 Patologías asociadas a annexinas (annexinopatías).

A medida que la investigación en el campo de las annexinas se ha ampliado, y teniendo en cuenta las múltiples funciones celulares que llevan a cabo, el papel de estas proteínas en diversas patologías, con un particular énfasis en la oncogénesis, la autoinmunidad y los procesos inflamatorios, es más evidente [41].

Las annexinas se utilizan como marcadores de diagnóstico en la progresión tumoral, posiblemente debido a la relación de éstas con procesos celulares que se asocian con tumorigénesis, adhesiones célula-célula, motilidad celular, endocitosis, etc. En este sentido, se ha detectado una menor expresión de AnxA1 [42], AnxA2, AnxA4, AnxA6, AnxA7 y AnxA11 [43, 44] en cáncer de próstata. Además, AnxA7 ha sido descrita como supresora tumoral en cáncer de próstata [45].

Las annexinas también se han visto relacionadas en tumores mamarios, como AnxA1 presentando una menor expresión. AnxA1 está implicada en la internalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [24]. Así, la menor expresión de AnxA1 en tumores mamarios provoca una sobreactivación de EGFR conllevando una mayor activación de EGF, necesaria para la progresión de dicho tumor [46]. AnxA3 ha sido asociada al desarrollo de tumores (ovario, adenocarcinoma, hígado, pulmón, próstata), metástasis y resistencia a fármacos antitumorales [30]. Por otra parte, la sobreexpresión de AnxA2, AnxA4 y AnxA11 se ha correlacionado con la progresión en cáncer colorectal [47]. Además muchas de estas annexinas pueden estar implicadas en diversos cánceres como el de mama o pancreático actuando sinérgicamente [48].

La principal importancia del estudio de las annexinas en los procesos tumorales viene determinada por la posibilidad de establecer nuevas dianas terapéuticas. Por ejemplo, AnxA1 como diana de los polifenoles del té verde (antitumorales) [49] o AnxA2 del fármaco *Withaferin A*, que afecta a la estabilidad del citoesqueleto de actina y así a la estructura celular de las células tumorales [50]. Se ha visto también que muchas annexinas pueden ser dianas terapéuticas ya que algunas de ellas provocan resistencia a fármacos antitumorales. En relación a ello, se ha descrito que la sobreexpresión de AnxA4 en cáncer de ovario promueve resistencia al antitumoral Platinum promoviendo la secreción celular del fármaco [51].

Las propiedades antiinflamatorias de la AnxA1 son determinantes en la respuesta a glucocorticoides con un papel pivotal en el sistema inmune innato y adaptativo [23]. Otras annexinas han sido relacionadas con procesos inflamatorios, como es el caso de la AnxA2 y AnxA5, que han sido vinculadas al síndrome autoinmune antifosfolipídico (APS), que se manifiesta con tromboembolismos vasculares y abortos recurrentes [52-55]. La AnxA2 participa en el proceso de fibrinólisis promoviendo la producción de plasmina como receptor de superficie en células endoteliales para el plasminógeno y el activador de plasminógeno [56]. Por ello, la sobreexpresión de AnxA2 se ha visto implicada en la forma hemorrágica de la leucemia promielocítica aguda [27].

2. Annexina A6

Annexina A6 (AnxA6) fue identificada por primera vez asociada con membranas insolubles a detergentes en linfocitos B de forma dependiente de Ca^{2+} [57]. Esta annexina recibió el nombre de lipocortina, p68, calcimedina y calcinectina hasta la unificación de nomenclatura de estas proteínas [58].

2.1 Estructura de Annexina A6.

AnxA6 es el único miembro de la familia de las annexinas que difiere en su estructura por tener un doble núcleo con dos tétradas de 4 repeticiones en tándem con una región de unión entre la repetición 4 y 5 [58]. Se postula que AnxA6 se debe a la duplicación y fusión de los genes que codifican para AnxA5 y AnxA10 [8]. Estudios cristalográficos han permitido el análisis de su estructura por difracción de rayos X observándose la capacidad para modular las dos tétradas de forma flexible y permitir la orientación entre ambas perpendicularmente (Figura 2A). Esta conformación flexible confiere la capacidad para unirse a 2 membranas diferentes al mismo tiempo [34, 59-61]. El gen de AnxA6 está formado por unas 60000 pb y contiene 26 exones. Existen dos isoformas por *splicing* alternativo del exón 21 (AnxA6-1 y AnxA6-2) que varían en 6 aminoácidos en las posiciones 524-429 (VAAEIL). La AnxA6 tiene 6 potenciales sitios de unión a Ca^{2+} en las repeticiones 1, 2, 4, 5, 6 y 8 [62, 63] y 3 sitios de fosforilación S13, Y30, T356 [64] (Figura 2B).

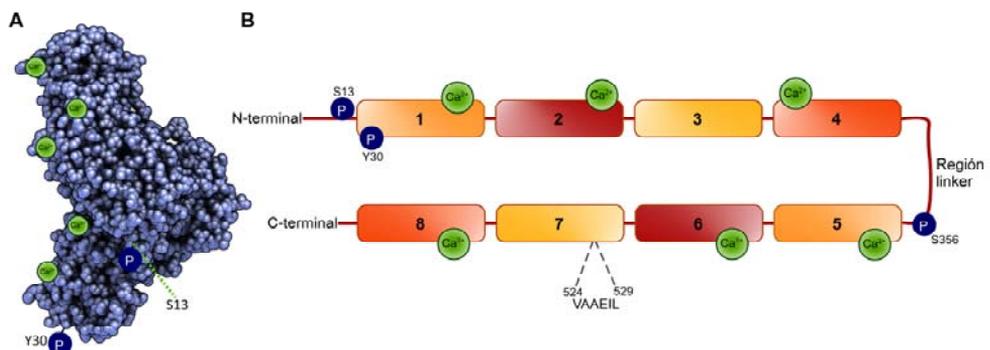


Figura 2. Estructura de AnxA6. (A) Modelo de espacio lleno donde se muestra la estructura tridimensional atómica de AnxA6 con sitios de unión a Ca^{2+} y los residuos fosforilables. Modificado de Enrich C. *et al.*, 2011 [34] (B) Esquema de las 8 repeticiones de AnxA6 donde se marcan los dominios

de unión a Ca^{2+} y los residuos fosforilables. Además se muestra el hexapéptido VAAEIL presente en la isoforma AnxA6-1.

AnxA6 se une principalmente a fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico [10], aunque también tiene afinidad por fosfatidiletanolamina y ácido araquidónico (AA) [65]. Éste último se encuentra enriquecido en las balsas lipídicas de membrana y es generado por la fosfolipasa A2 citoplasmática (cPLA₂). La interacción con estos fosfolípidos se lleva a cabo de forma dependiente de Ca^{2+} permitiendo que AnxA6 participe en diferentes eventos como la modulación de la dinámica de membranas, la señalización celular para la proliferación, la diferenciación y la migración celular [34]. Además, el pH ácido y el colesterol también son importantes para mediar el tráfico y la localización de esta proteína [58, 66].

2.2 Localización y expresión de Annexina A6.

AnxA6 presenta una expresión prácticamente ubicua en mamífero siendo especialmente abundante en músculo esquelético, corazón, bazo, nódulos linfáticos e hígado. Cabe destacar, que en el hígado representa el 0.25% del total de proteína [67]. A menudo se observan elevados niveles de AnxA6 en células de naturaleza endotelial y endocrina, así como del epitelio secretor y en macrófagos [25, 68]. En cambio, es indetectable en células epiteliales del intestino delgado, en las glándulas paratiroides y en el colón [58]. La inhibición de la expresión de AnxA6 se ha identificado en algunas células tumorales, como las A431 (células de carcinoma epitelial) que no expresa la proteína [69]. También algunas líneas celulares derivadas de cáncer de mama tienen niveles casi indetectables de AnxA6 [70].

La localización subcelular de AnxA6 es básicamente citosólica, translocándose a la membrana plasmática en presencia de Ca^{2+} , con mayor sensibilidad en presencia de colesterol [71, 72]. AnxA6 es uno de los componentes mayoritarios de los endosomas tempranos, los endosomas tardíos y los de reciclaje [25, 29, 73-75]. Según su distribución concreta, la AnxA6 realiza diferentes funciones que se detallan a continuación.

2.3 Funciones de Annexina A6.

2.2.1 Annexina A6 y la homeostasis de colesterol:

El colesterol es un componente estructural básico de las membranas de las células eucariotas, que puede ser sintetizado en la propia célula o captado del exterior mediante la endocitosis de lipoproteínas (LDL y HDL). Existen diferentes vías de transporte de colesterol entre la membrana y los compartimentos celulares. En la membrana, el colesterol se encuentra enriquecido en zonas específicas (balsas lipídicas) [76, 77] influyendo en el funcionamiento de la membrana plasmática.

Se han identificado dos reservorios de AnxA6 en células de ovario de hámster chino (CHO, *Chinese Hamster Ovary*). En presencia de Ca^{2+} un 70-80% de la AnxA6 se encuentra asociada a la membrana plasmática mientras que el resto se encuentra asociada a membranas endosomales, cuando éstos contienen altos niveles de colesterol. Así, la depleción de colesterol con metil- β -ciclodextrina reduce la presencia de AnxA6 en endosomas tempranos (EE, *early endosomes*) y tardíos (LE, *late endosomes*). En el mismo sentido, la acumulación de colesterol mediante LDL y/o la droga U18666A en los LE aumenta la presencia de AnxA6 en la superficie de estas estructuras [66, 78]. Además, estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que células que sobreexpresan AnxA6 presentan una desregulación en la homeostasis intracelular de colesterol, con una acumulación en los LE [75]. Esto supone una reducción del colesterol en otros compartimentos, como el aparato de Golgi y la membrana plasmática, provocando la translocación de AnxA6 a los LE. Esta situación mimetiza el fenotipo de las células mutadas para la proteína *Niemann-Pick* tipo C (NPC) [34]. También se ha descrito la interacción de AnxA6 con NPC1 por coimmunoprecipitación [75], aunque esta interacción es independiente de la localización de AnxA6 en los LE, ya que se ha visto su presencia en este compartimento en células mutantes de NPC1 [79].

La disminución de colesterol en Golgi, debida a la sobreexpresión de AnxA6, provoca la retención de caveolina-1 en este orgánulo, y reduce el número de caveolas en la membrana plasmática [75] (Figura 3). Es interesante remarcar que además, mutantes dominantes negativos de caveolina-3 provocan el mismo

fenotipo que la sobreexpresión de AnxA6 dando lugar a una acumulación de colesterol intracelular en los LE. Asimismo, también se ha descrito una reducción en la síntesis de colesterol y una reducción de los niveles en la membrana plasmática [80].

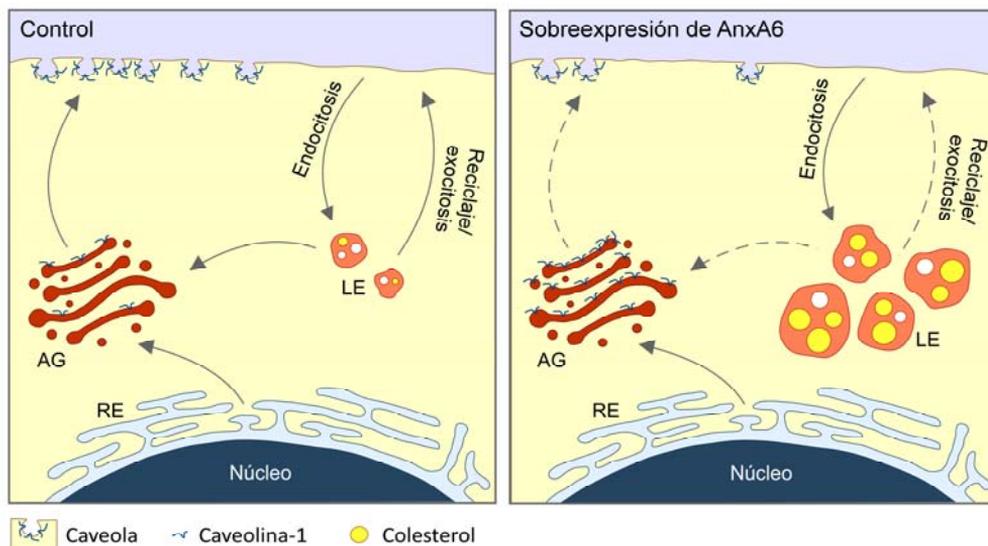


Figura 3. Papel de la AnxA6 en la homeostasis de colesterol a través de la regulación de su transporte y la formación de caveolas. Los esquemas muestran células con niveles normales de AnxA6 (panel izquierdo, control) y células que sobreexpresan AnxA6 (panel derecho, sobreexpresión de AnxA6). Ruta de transporte de caveolina-1 desde el aparato de Golgi (AG) hasta la membrana plasmática y tráfico de colesterol. Las líneas discontinuas muestran el transporte inhibido debido a la sobreexpresión de AnxA6.

El fenotipo celular provocado por la sobreexpresión de AnxA6 y la mutación de caveolina-3 mimetizan la alteración en la homeostasis de colesterol observada en los mutantes de NPC1. NPC1 es una proteína que determina los niveles de colesterol en los LE y está involucrada en la regulación y localización de la caveolina. En nuestro grupo se ha demostrado que el acumulo de caveolina-1 en Golgi puede ser revertido con colesterol exógeno o con la sobreexpresión de NPC1 [75].

En concordancia con lo comentado anteriormente, la menor concentración de colesterol en Golgi, en células CHO que sobreexpresan AnxA6, provoca una menor translocación de la cPLA₂ a este orgánulo. Esto podría explicar la pérdida de

actividad de esta proteína, la menor concentración de AA en el complejo de Golgi [74] y la reducción de la vesiculación y la tubulación que afectaría el transporte vesicular desde y hasta este compartimento [81].

Además, el colesterol y el AA modulan la localización de las proteínas SNARE (*Soluble NSF attachment protein receptor*) en la membrana plasmática para mediar el anclaje y la fusión de las membranas de las vesículas de secreción en la exocitosis [82, 83]. De esta manera la reducción de AA, que se observa con la sobreexpresión de AnxA6, estaría interfiriendo en la formación de los complejos SNARE a través de la modulación de la actividad y localización de las proteínas Syntaxina 4 y Syntaxina 6, y SNAP23 [84, 85]. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que, en células que sobreexpresan AnxA6, las proteínas Syntaxina-4 y SNAP23 se encuentran retenidas en Golgi conllevando una inhibición de algunas vías exocíticas y observándose una menor secreción de fibronectina y el factor de necrosis tumoral α (TNF α , *Tumor necrotic factor*). El fenotipo provocado por AnxA6 se ve mimetizado con el uso de reactivos que provocan la acumulación de colesterol en los LE, como U18666A, o la inhibición de cPLA₂. A su vez, el fenotipo puede ser revertido con la expresión de NPC1 y el tratamiento exógeno de colesterol en estas células [86].

También se ha demostrado que el acumulo de colesterol en los LE y la disminución en Golgi en los modelos celulares mutados para NPC, tratados con U18666A o sobreexpresados con AnxA6 provocan una disminución de la migración. Esto se da por un secuestro de Syntaxina-6 en los endosomas de reciclaje interfiriendo en el reciclaje de las integrinas α V β 3 and α 5 β 1 y consecuentemente en dicha migración [87].

2.2.2 Annexina A6 y la estructura de membrana:

AnxA6 se encuentra en membranas resistentes a detergente (DRM, *Detergent resistant membranes*) de diferentes tipos celulares como en el plasmalema de las células musculares o en CHO [86]. En condiciones normales AnxA6 se encuentra tanto en balsas lipídicas como en otros dominios, como las vesículas recubiertas de clatrina involucradas en la endocitosis [88].

La formación de regiones de membrana altamente condesadas con elevada concentración de colesterol requiere tanto del transporte intracelular a la superficie celular como de la difusión lateral de lípidos y proteínas a estas zonas enriquecidas en colesterol. De esta manera se crean diferentes dominios de membrana, ordenados (elevado colesterol) o desordenados (bajo colesterol), en función de su composición lipídica [89]. Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que la sobreexpresión y la depleción de AnxA6 provocan cambios en el orden de membrana con una disminución y aumento, respectivamente, de estos dominios [90].

2.2.3 Annexina A6 y el citoesqueleto de actina:

Se ha descrito la capacidad de AnxA6 para unirse al citoesqueleto de actina, probablemente de forma dependiente de Ca^{2+} en los extremos de F-actina [91]. Algunos estudios han demostrado que el aumento de AnxA6 en la membrana plasmática correlaciona con una reorganización de los filamentos de actina provocando una estabilización del citoesqueleto cortical [92].

Junto con el desequilibrio en la homeostasis de colesterol provocado por AnxA6, la interacción con el citoesqueleto de actina es clave para la regulación del transporte endo- y exocítico, la formación de caveolas y balsas lipídicas en la membrana plasmática así como la regulación de la señalización de EGFR/Ras y la actividad de los canales de Ca^{2+} [58].

2.2.4 Annexina A6 y el transporte endosomal:

En células con elevados niveles de AnxA6, como en el caso de los hepatocitos, esta proteína se encuentra localizada a lo largo de todo el compartimento endocítico [93], interaccionando con diferentes proteínas de la maquinaria de endocitosis como dinamina y los complejos AP-clatrina [88]. AnxA6 también se encuentra asociada a espectrina facilitando el reclutamiento de calpaina-1 y rompiendo la unión espectrina-actina que facilita la endocitosis de vesículas. De esta manera, AnxA6 sería necesaria para promover la gemación de la membrana

plasmática [94] tal como se ha observado durante la endocitosis de LDL vía espectrina [73].

2.2.5 Annexina A6 y la señalización celular:

En numerosos estudios se ha descrito AnxA6 como proteína de andamiaje, siendo capaz de interactuar con diferentes proteínas de señalización celular favoreciendo la estabilización de plataformas de transducción de señales [95].

En nuestro laboratorio se ha demostrado que AnxA6 regula varios efectores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como la vía de Ras/MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). AnxA6 citosólica se une y direcciona p120GAP (*p120 GTPase activating protein*) a la membrana plasmática de forma dependiente de Ca^{2+} , donde interactúa con H-Ras (*Retrovirus associated protein*) activo para inhibir su señalización [70, 95, 96]. Además, AnxA6 también inhibe otro efector de la vía Ras/MAPK, Raf-1 (*Ras associated protein 1*), impidiendo su translocación a la membrana plasmática donde se une a Ras [97].

En respuesta al aumento de Ca^{2+} intracelular, AnxA6 también se une a la proteína quinasa $C\alpha$ (PKC α), reclutándola a la membrana plasmática donde fosforilará a EGFR en la Thr654 provocando su inactivación [98].

También se ha descrito en líneas celulares estables (CHO y HEK293), que sobreexpresan AnxA6, que la inhibición de la ruta Ras/MAPK reduce la expresión y la actividad del receptor de HDL (SR-BI) de manera que se reduce el eflujo de colesterol [99]. Por otra parte, en células que sobreexpresan AnxA6 se ha demostrado la activación de la vía de HRas/MAPK inducida por HDL y su receptor SR-BI es dependiente de PKC α , indicando la existencia de una vía alternativa a la inhibición provocada por AnxA6 [100].

Finalmente, se ha descrito en condrocitos la interacción de AnxA6 con p65, una de las proteínas que forman parte del heterodímero de NF- κ B. En este estudio, la ausencia de AnxA6 provoca una menor activación y translocación de NF- κ B al núcleo y consecuentemente una disminución de la expresión de Interleuquina-1 (IL-1) y TNF α [101].

Como conclusión, AnxA6 es una proteína de andamiaje dinámica que, a través de la remodelación del citoesqueleto de actina y la homeostasis del colesterol, facilita la formación de diferentes plataformas que modulan la localización y actividad de otras proteínas con las que interacciona.

2.4 Annexina A6 y las patologías asociadas.

Hasta hace poco no se habían identificado mutaciones específicas de AnxA6 como causa de enfermedades concretas, pero si se habían identificado cambios en su expresión que correlacionan con alguno de los fenotipos de diferentes patologías [58]. Recientemente, se ha identificado una nueva variante de *splicing* de AnxA6, que produce un producto truncado de esta proteína, la AnxA6N32. Esta variante de *splicing* ha sido relacionada con distrofia muscular [102].

Estudios llevados a cabo en cardiomiocitos que sobreexpresan AnxA6 han mostrado una disminución en los niveles intracelulares de Ca^{2+} provocando una menor amplitud eléctrica que conlleva una pérdida de la función contráctil en estas células [103]. Además, se ha observado una disminución de los niveles de mRNA de AnxA6 en los estadios finales de pacientes con paro cardíaco [104]. En concordancia, la contractilidad de cardiomiocitos de ratones genoanulados para AnxA6 se encuentra aumentada con una rápida eliminación de Ca^{2+} citoplasmático durante la diástole [105]. Aun así, estos animales no presentan defectos por lo que respecta al ritmo cardíaco y a la presión sanguínea [106]. Por último, se ha descrito la interacción de AnxA6 con α -actinina, regulando la contractilidad muscular en cardiomiocitos [107].

Por otra parte, en tumores relacionados con EGFR/Ras, los niveles elevados de AnxA6 actúan como supresores tumorales llevando a la inactivación de EGFR y Ras, reduciendo así la proliferación celular y la oncogénesis [25, 70]. Además, la depleción de AnxA6 en células de cáncer de mama aumenta la progresión tumoral mediante la pérdida de los contactos célula-célula y célula-matriz extracelular, y promoviendo la proliferación celular [108].

2.5 Ratones genoanulados de Annexina A6.

Para tener una mejor aproximación de las funciones de AnxA6, específicamente *in vivo*, se utilizó un modelo de ratón genoanulado constitutivo para AnxA6 (AnxA6^{-/-}) mediante la disrupción de este gen. Para la generación del ratón mutado se procedió a la inserción de un gen de resistencia a Neomicina en el exón 3 de la proteína mediante la técnica de PCR [106].

Los ratones AnxA6^{-/-} no presentan un fenotipo característico. La morfología de la musculatura y los principales órganos como corazón, pulmón, cerebro, riñón, hígado, timo, bazo, testículos y ovarios es la esperada y su histología no muestra cambios evidentes respecto al ratón salvaje (WT). AnxA6 no es necesaria para el desarrollo en ratón. La caracterización de los ratones AnxA6^{-/-} muestra que estos ratones no pierden viabilidad, al menos hasta 1 año de edad, y tampoco presentan diferencias de fertilidad con el mismo número de ratones por camada. Esto demuestra que en ausencia de AnxA6 los ratones son capaces de cruzarse y llevar a cabo el embarazo, dar a luz y amamantar a las crías [106].

Por otra parte en los ratones AnxA6^{-/-} no se observa compensación por parte de otras Annexinas como AnxA1, AnxA2 o AnxA5. El sistema inmune tampoco se encuentra alterado, hallándose proporciones normales de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ tanto en el timo como en el bazo. Además, el sistema inmune inmaduro tampoco muestra diferencias significativas respecto los ratones WT [106].

3. El hígado

El hígado es la víscera más grande del cuerpo humano y otros vertebrados, representando entre el 2-5%, del peso corporal en la mayoría de las especies en edad adulta. En humanos, el hígado se encuentra ubicado en la región abdominal del hipocondrio derecho y en menor parte del izquierdo. Este órgano se encuentra recubierto por la cápsula de Glisson, una capa serosa de tejido conectivo por la que el hígado se adhiere al diafragma y a otros tejidos colindantes [109].

El hígado es responsable de un amplio espectro de funciones que van desde la captación, el almacenamiento y el metabolismo de diferentes sustratos energéticos en el organismo, a la conjugación y la excreción de diversas sustancias endógenas o exógenas como el colesterol, fármacos y sustancias tóxicas. Así, el hígado se encarga del mantenimiento de la homeostasis de carbohidratos, lípidos y aminoácidos. Por otra parte, al ser un órgano exocrino participa en la producción de la bilis, los fosfolípidos y el colesterol así como muchas proteínas plasmáticas circulantes que son producidas y secretadas por el hígado [110]. Por otra parte, tiene un papel inmunológico muy importante llevando a cabo la fagocitosis y la limpieza de microorganismos y endotoxinas de la sangre portal [110].

3.1 La estructura del hígado.

El hígado en humanos está dividido anatómicamente por surcos profundos en dos lóbulos grandes (el derecho y el izquierdo) y dos más pequeños (cuadrado y caudado o de Spiegel). En rata se encuentran cuatro lóbulos (el caudal, el derecho, el medial y el lateral izquierdo) [111] y en ratón existen 7 lóbulos (el inferior derecho, el medial superior, el medial inferior, el lateral derecho, el lateral izquierdo, el omental superior y el omental inferior) [112].

A parte de esta división anatómica, existe una división en segmentos funcionales que corresponden a la irrigación sanguínea y al drenaje biliar. Para comprender las múltiples funciones del hígado y como se llevan a cabo, es necesario atender a la irrigación venosa en la anatomía hepática. Existe un componente venoso dado por la vena porta, con una irrigación del 75%, y uno arterial dado por la arteria

hepática. Ambos vasos entran en el hígado por el hilio hepático, que también es la salida de los conductos biliares y los vasos linfáticos.

Existen tres formas de describir y entender la estructura del hígado como unidad funcional en diferentes lobulillos, I. Lobulillo clásico, II. Lobulillo portal, III. Acino hepático (Figura 4) [109].

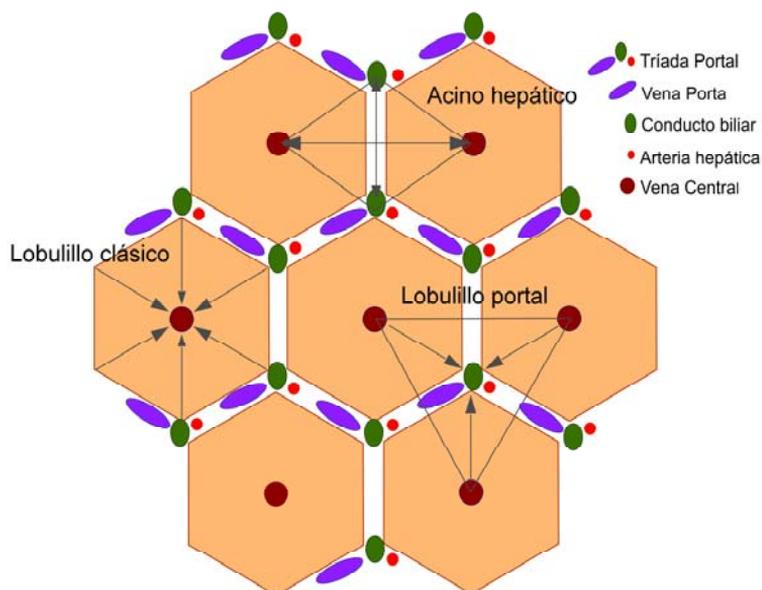


Figura 4. Esquema representativo del lobulillo clásico, el lobulillo portal y el acino hepático, y la disposición de la triada portal en los lobulillos.

El lobulillo clásico (Figura 5A) se caracteriza por las trabéculas de hepatocitos anastomosados que consisten en una célula de espesor, separadas por sinusoides que irrigan las células con una mezcla de sangre venosa y arterial. En el centro se encuentra la vena central donde desembocan los sinusoides. Estas trabéculas, igual que los sinusoides, presentan una disposición radial desde el centro hasta la periferia del lobulillo formando un hexágono. En los ángulos de éste se encuentran los espacios periportales caracterizados por la presencia de las triadas portales.

El lobulillo portal tiene un eje morfológico compuesto por el conducto biliar intralobulillar de la triada portal del lobulillo clásico. Sus bordes trazan un triángulo

imaginario con las tres venas centrales más cercanas a la tríada en cada uno de los vértices.

Por último, el acino hepático, con forma romboidal, es la menor unidad funcional del parénquima hepático. Contiene un eje menor definido por las ramas terminales de la tríada portal de los límites entre dos lobulillos clásicos y un eje mayor que representa una línea perpendicular entre las dos venas centrales más cercanas al eje menor. Los hepatocitos de cada acino hepático se disponen en tres zonas elípticas concéntricas rodeando el eje menor [109].

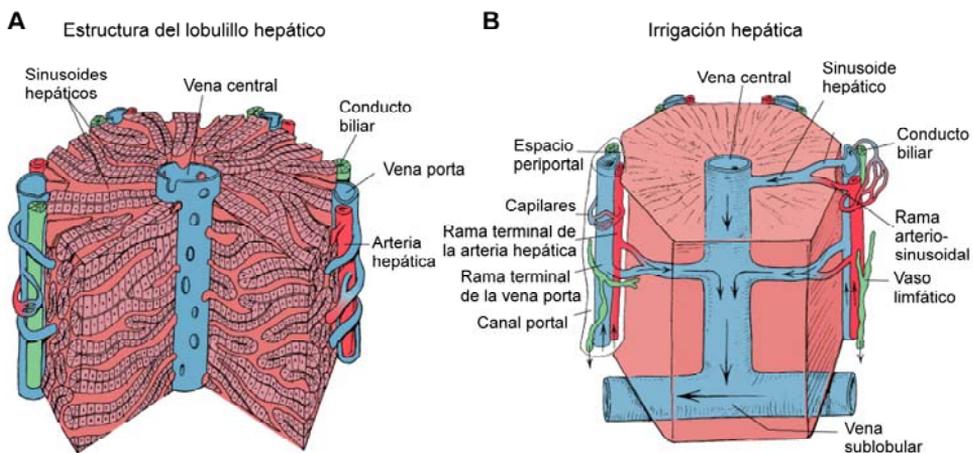


Figura 5. (A) Estructura del lobulillo hepático representado como un prisma hexagonal con la tríada portal (arteria hepática, vena porta y conducto biliar). Se muestran las pilas de trabéculas anastomosadas de hepatocitos que se disponen radialmente desde la vena central hasta la periferia. (B) Irrigación hepática donde se representa de nuevo la tríada portal y el drenaje de la sangre de las ramas terminales de la arteria hepática y la vena porta a los sinusoides. Las flechas muestran la direccionalidad del flujo sanguíneo. Esquemas modificados de Ross, *et al.*, Atlas de Histología [109].

La doble irrigación del hígado viene dada por una componente venosa, con la vena porta, y una arterial, con la arteria hepática. Ambas se introducen en el hígado por el hilio hepático, por donde también salen las vías biliares y los vasos linfáticos (Figura 5B) [109]. Así, la vena hepática conduce sangre venosa con baja concentración de oxígeno derivada del tubo digestivo, el páncreas y el bazo, transportando sustancias nutritivas y tóxicas, eritrocitos y productos de degradación de estos y otras secreciones endocrinas mayoritariamente del páncreas. Dentro del

hígado existen ramas de distribución de la vena porta y la arteria hepática, denominados capilares sinusoidales o sinusoides, que irrigan los hepatocitos, y ramas de drenaje biliares formando la tríada portal. Los sinusoides sirven para el intercambio de sustancias entre la sangre y las células hepáticas desembocando en la vena central que drena a la vena supralobulillar para salir del hígado a través de las venas suprahepáticas que desembocan en la vena cava inferior.

El hígado ha sido siempre considerado un órgano bastante homogéneo formado básicamente por 4 tipos celulares, pero en realidad se trata de un tejido muy heterogéneo en el que se encuentran zonas con hepatocitos que llevan a cabo procesos metabólicos claramente diferenciados. Aun así, la zonación de procesos como el metabolismo de lípidos y carbohidratos es flexible y se adapta a los cambios de cada situación fisiológica [113].

Las células próximas a las zonas periportales reciben sangre rica en nutrientes de la vena porta y oxígeno de la arteria hepática. En cambio, las zonas pericentrales, donde se encuentra la vena central, reciben una concentración menor de oxígeno y nutrientes. De esta forma, el flujo sanguíneo forma un gradiente de oxígeno, hormonas y nutrientes que hace que los hepatocitos estén expuestos a diferentes situaciones metabólicas según su localización [114].

3.2 Las células hepáticas.

Los hepatocitos son las células más abundantes del parénquima hepático, representando el 80% del volumen del órgano en un individuo adulto [115]. Se trata de grandes células poligonales de 25-30 μm de diámetro (Figura 6) [116]. Los hepatocitos son poliédricos con un 72% de membrana sinusoidal. El Espacio de Disse queda entre la membrana sinusoidal de los hepatocitos y las membranas basales de las células endoteliales y de Kupffer que recubren los sinusoides. La membrana sinusoidal de los hepatocitos contiene un mayor número de microvellosidades para promover el intercambio de sustancias entre el plasma y la célula. Un 15% de la membrana de la superficie celular se mantiene en contacto con hepatocitos adyacentes (membrana lateral) y el 13% restante corresponde a la

superficie que forma el canalículo biliar (membrana canalicular), que se encuentra entre hepatocitos colindantes.

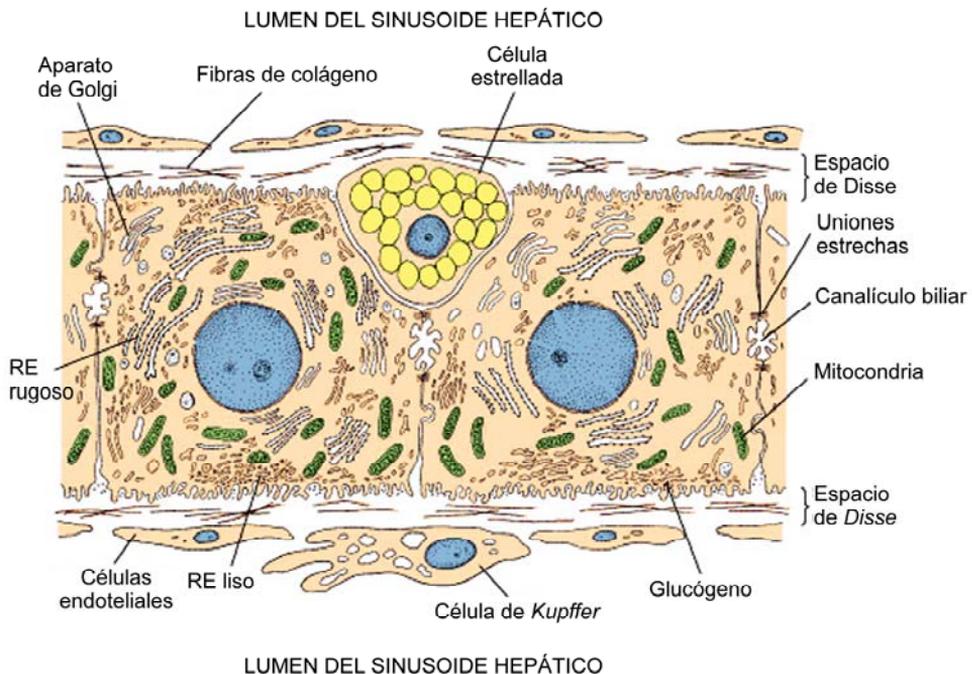


Figura 6. Diagrama esquemático de una trabécula de hepatocitos interpuesta entre 2 sinusoides hepáticos. También se muestran las uniones entre hepatocitos y una célula estrellada que contiene inclusiones citoplasmáticas de ácido retinoico y las fibras de colágeno que se secretan al Espacio de Disse. La célula de Kupffer forman parte del revestimiento integral del sinusoides. Esquema adaptado de Ross, *et al.*, Atlas de Histología [109].

La membrana lateral de los hepatocitos contiene diferentes complejos de adhesión y unión (uniones estrechas, uniones intermedias y desmosomas) que comunican los hepatocitos entre sí. También se encuentran uniones *gap* que permiten la transferencia de pequeñas moléculas entre hepatocitos. Así la membrana plasmática de estas células se encuentra altamente polarizada y su composición molecular demuestra una distribución específica de receptores, canales, transportadores, bombas iónicas y otras proteínas. Mientras que la membrana canalicular está modificada para la excreción de bilis, la membrana sinusoidal está

adaptada para la captación de diferentes moléculas de la sangre y la excreción de otras moléculas modificadas o sintetizadas en el hepatocito [116].

Las células endoteliales de los sinusoides constituyen el 3% de la masa hepática. El fino citoplasma de estas células presenta una fenestración característica [117]. Aunque estas células carecen de membrana basal están rodeadas de diferentes proteínas de la matriz extracelular como colágeno, laminina, proteoglicanos y fibronectina [118]. Las células endoteliales tapizan los sinusoides y permiten el paso de los diferentes componentes que provienen de la sangre [119].

Los macrófagos hepáticos o células de Kupffer, forman el 2% del hígado [120] y se encuentran localizadas entre el lumen de los sinusoides con mayor concentración en las regiones periportales. Estas células son principalmente fagocíticas y se encargan de limpiar la sangre de sustancias relativamente grandes como bacterias y células muertas [119]. Además, las células de Kupffer activadas producen una gran cantidad de citoquinas y quimioquinas que tienen un papel principal en el inicio de la fase de activación de la respuesta a daño hepático [121].

Las células estrelladas que se encuentran en el Espacio de Disse, parcialmente cubriendo los sinusoides, consisten en el 1.5% de las células hepáticas [115]. Estas células son multifuncionales y junto con los hepatocitos participan en el metabolismo de la vitamina A y la almacenan en forma de ésteres de retinol en cuerpos lipídicos [122]. Además, sintetizan, secretan y degradan diferentes componentes de la matriz extracelular de los sinusoides [122].

Otro tipo celular en el hígado son los colangiocitos, células epiteliales que forman los conductos biliares y consisten en menos del 1% del total de células que forman este órgano. Tienen una elevada capacidad para proliferar, estando involucrados en la reparación de los conductos biliares tras un daño hepático [123]. La superficie luminal de los colangiocitos contiene microcilios y estereocilios que facilitan la secreción y la absorción biliar contribuyendo a su composición final [124]. Los conductos biliares forman una red tridimensional intrahepática de ductos interconectados formados por colangiocitos.

Además, el hígado tiene un componente inmune muy importante compuesto por células dendríticas y linfocitos T, NK y NKT (y algunos B) [125, 126].

3.3 La fisiología hepática.

Las múltiples funciones llevadas a cabo por el hígado implican una combinación de mecanismos exocrinos, endocrinos, paracrinos y yuxtacrinos en los que se encuentran implicados diversos tipos celulares hepáticos, así como células nerviosas y las células de los vasos sanguíneos. Las principales funciones pueden clasificarse en, I. Síntesis de proteínas plasmáticas y factores de coagulación, II. Almacenaje y conversión de vitaminas y hierro, III. Degradación de fármacos y toxinas (detoxificación), IV. Producción de sales biliares y V. Participación en múltiples vías metabólicas, como de carbohidratos, lípidos y aminoácidos [110]. De esta manera el hígado es un órgano central para el funcionamiento de todo el organismo.

En esta tesis nos hemos centrado en la función y la implicación metabólica del hígado a nivel lipídico y glucídico. En las últimas décadas se ha mostrado un especial interés en la importancia del metabolismo hepático en relación con el desarrollo de algunas patologías hepáticas. En la sociedad occidental actual, el incremento en la prevalencia de enfermedades como la obesidad y el síndrome metabólico conllevan cambios patofisiológicos en el metabolismo de lípidos y carbohidratos que provocan diversas enfermedades como la del hígado graso no alcohólico (NAFLD, *non-alcoholic fatty liver disease*) entre muchas otras [127].

3.3.1 Metabolismo lipídico hepático:

El hígado interviene en el metabolismo de los lípidos a nivel de todo el organismo (Figura 7). En los hepatocitos, los ácidos grasos (AG) pueden obtenerse mediante la lipogénesis endógena, la degradación de triacilglicéridos (TAG) endógenos, la endocitosis de lipoproteínas o la captación de los ácidos grasos no esterificados (NEFA, *Non-esterified fatty acids*) directamente de la circulación sanguínea. Su catabolismo mediante la β -oxidación es la principal fuente de energía en el hígado así como esencial para la síntesis de cuerpos cetónicos [128]. Por otra parte, el

hígado también participa en el metabolismo del colesterol siendo necesario para la formación de sales biliares y lipoproteínas [129].

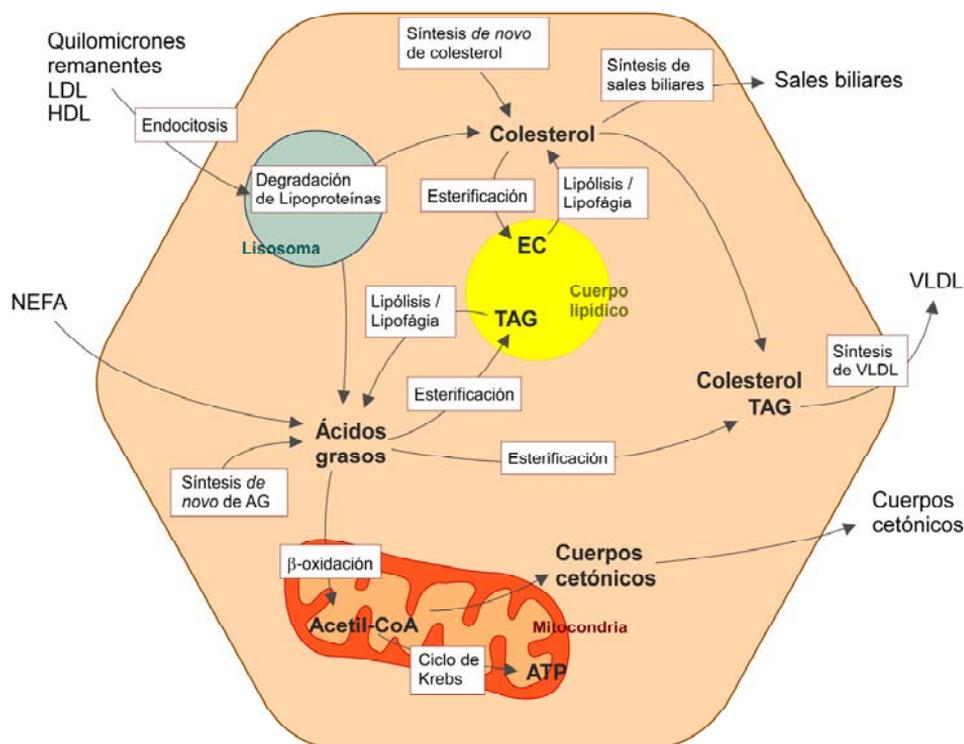


Figura 7. Esquema representativo del metabolismo lipídico en una célula hepática. Se indican las vías de captación de lípidos (NEFA: Ácidos grasos no esterificados y Lipoproteínas). Las vías de degradación de lipoproteínas en lisosomas para la obtención de AG y colesterol. Los AG son destinados a la β -oxidación o esterificados para almacenar TAG en CL en forma de TAG. El colesterol puede ser esterificado en ésteres de colesterol (EC) y almacenados en los CL, destinado a la producción de sales biliares o ser excretado en lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) junto con los TAG. Con la lipólisis y la lipofagia se degradan los TAG y EC de los CL para la obtención de AG y colesterol.

A. Captación lipídica.

El metabolismo lipídico en el organismo empieza con la absorción intestinal de las grasas de la dieta. Para poder ser captadas desde el lumen intestinal, las grasas tienen que ser emulsionadas e hidrolizadas [130]. Para ello, los hepatocitos producen y secretan al conducto biliar los ácido biliares, imprescindibles para la emulsión de los lípidos, haciendo que las grasas sean más accesibles a las lipasas.

Una vez absorbidos en el intestino, los lípidos son empaquetados en quilomicrones (lipoproteínas). Estos quilomicrones compuestos por colesterol, fosfolípidos y TAG son secretados al sistema linfático y alcanzan el sistema circulatorio tras las 2 horas de ingesta, en un individuo sano [131]. Los quilomicrones maduraran reemplazando las apoproteínas apoA-I y apoA-IV por apoE y apoC-II, cruciales para el posterior procesamiento. Una vez llegan al tejido adiposo, apoC-II activa la lipoproteína lipasa de los adipocitos, facilitando la metabolización de los TAG contenidos en los quilomicrones a ácidos grasos (AG) y glicerol [132]. Los AG son almacenados en los adipocitos y los quilomicrones remanentes vuelven a la circulación. La ApoE de estos quilomicrones es entonces reconocida por el receptor LRP y el receptor *scavenger* B1 (SR-B1) en la membrana de los hepatocitos. De esta forma, en el hígado, los quilomicrones remanentes enriquecidos en ésteres de colesterol, se endocitan y son posteriormente procesados en lisosomas [133].

Los NEFA circulantes en sangre son la principal fuente de AG en el hígado durante el ayuno. Éstos derivan de la lipólisis en los adipocitos, mecanismo inducido por catecolaminas, péptido natriurético y glucagón. A su vez, dicha lipólisis es inhibida por insulina durante el estado postprandial [134]. Los NEFA entran en el hepatocito por difusión pasiva facilitada mediante diferentes transportadores [135]. Existen diferentes proteínas transportadoras de AG (FATP) y en el hígado se han descrito FATP2 y FATP5 como las encargados de la mayor parte de la captación, aunque también participarían en este transporte otras proteínas como las de unión a AG, la glutamato-oxalacetato-transaminasa 2 y caveolina-1 [136-138].

A parte de la captación lipídica, el hígado es capaz de obtener AG a partir de la lipogénesis. Este proceso es clave para la homeostasis energética de lípidos y está estrictamente controlado por la situación hormonal y nutricional del organismo [139]. La producción de AG es un proceso que se encuentra restringido en el hígado y el tejido adiposo. Los AG que se sintetizan en el hígado son exportados al resto del organismo a través de lipoproteínas.

La lipogénesis tiene lugar en el citosol de los hepatocitos a partir de acetil-CoA por una reacción sucesiva de adición de moléculas de malonil-CoA. Esta síntesis está

catalizada y regulada por la acetil-CoA carboxilasa (ACC) que convierte acetil-CoA en malonil-CoA, y la ácido graso sintasa (AGS) que cataliza la biosíntesis de los AG [140].

B. Almacenamiento de lípidos

Los AG en el hígado obtenidos mediante la lipogénesis *de novo* a partir de Acetil-CoA, captación de lipoproteínas o NEFA, pueden ser almacenados en forma de TAG o rápidamente metabolizados. Los AG también se incorporan en fosfolípidos, compuestos esenciales de las membranas celulares, lipoproteínas y partículas biliares [128].

Los AG y sus metabolitos son la principal causa de lipotoxicidad debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). La esterificación de los AG con glicerol-3-fosfato para producir TAG o con colesterol para producir ésteres de colesterol (EC) permite su almacenamiento, protegiendo a las células frente a la lipotoxicidad [128]. Los TAG son relativamente inertes y están formados por 3 AG esterificados en un esqueleto de glicerol. La síntesis de TAG se puede iniciar a partir de glicerol-3-fosfato, en una reacción catalizada por la glicerol-3-fosfato-aciltransferasa (GPAT) o a partir de monoacilglicerol por la monoacilglicerol aciltransferasa (MGAT). Ambas vías finalizan con la síntesis de TAG a partir de diacilglicerol por parte de la diacilglicerol-aciltransferasa (DGAT) [141, 142]. Los TAG son posteriormente almacenados en cuerpos lipídicos o procesados para formar VLDL [143].

Los cuerpos lipídicos (CL) son orgánulos dinámicos expresados de forma ubicua, que captan, almacenan y aportan lípidos en función de los requerimientos energéticos [144, 145]. Estos orgánulos tienen un papel central en el intercambio de lípidos y son la fuente de sustrato energético, de síntesis de membranas y de producción de moléculas derivadas de lípidos como las lipoproteínas, sales biliares y hormonas [146]. La formación de CL requiere de la activación de los AG mediante su unión a coenzima A, la síntesis de lípidos neutros, la remodelación y síntesis de fosfolípidos y la función de algunas proteínas accesorias [146]. La cantidad de lípidos almacenados es variable y refleja el equilibrio entre la llegada de lípidos y su consumo.

Algunas enfermedades metabólicas, como la obesidad o la aterosclerosis, cursan con una elevada acumulación de CL [147]. Además, esta acumulación en el hígado está relacionada con esteatohepatitis, fibrosis y cirrosis, condiciones comunes de las enfermedades del hígado graso no alcohólico [148]. También existe acumulación de CL en el hígado en diferentes situaciones fisiológicas no relacionadas con ninguna patología, como el ayuno o la regeneración hepática [127, 149, 150]. Aunque el balance entre aporte y consumo determina la cantidad de CL, se ha descrito cierta heterogeneidad en la acumulación de lípidos entre células hepáticas. Este mecanismo se ha propuesto como sistema de protección del tejido hepático frente a la lipotoxicidad [151].

C. Lipólisis y lipofagia.

La lipólisis es la vía bioquímica responsable del catabolismo de los TAG de los CL para obtener AG y glicerol mediante la hidrólisis de los enlaces éster [152]. Este proceso depende de hidrolasas específicas comúnmente denominadas lipasas [153, 154]. Aunque en el hígado existen gran cantidad de lipasas, las mejor caracterizadas son: la lipasa de triglicéridos del tejido adiposo ATGL (*ATGL, Adipose triglyceride lipase*), la lipasa sensible a hormonas (HSL, *Hormone-sensitive lipase*) y la lipasa de monoglicéridos (MGL, *Monoglyceride lipase*) [155]. ATGL realiza el primer paso limitante en el proceso de hidrólisis de TAG generando diacilglicerol y NEFA. HSL es una enzima multifuncional capaz de hidrolizar TAG, DAG y monoacilglicerol, siendo limitante para el catabolismo de DAG. Por último MGL es capaz de degradar monoacilglicerol a glicerol y NEFA [152]. Además de estas enzimas otra lipasa muy importante en el hígado es la TGH, implicada principalmente en la producción de lipoproteínas [155, 156].

Recientemente, se ha descrito la autofagia (lipofagia) como mecanismo implicado en la homeostasis lipídica del hígado [157], revelando que este proceso es básico para la lipólisis hepática y la degradación de CL en el hígado [158, 159]. Durante el ayuno, esta vía es imprescindible para el reciclaje de productos necesarios para la célula [160]. Cuando se induce la autofagia, los CL son secuestrados en vesículas de doble membrana, denominados autofagosomas. Posteriormente, los TAG son degradados en los lisosomas por la lipasa ácida lisosomal [150].

D. β -oxidación y producción de cuerpos cetónicos.

En una situación metabólica que requiere aporte energético, los AG obtenidos tras la lipólisis y la lipofagia son oxidados para la obtención de energía o la síntesis de cuerpos cetónicos [128, 139].

La oxidación de AG se puede dar en la mitocondria, y en cierta medida en los peroxisomas. Consiste en la degradación de los AG a acetil-CoA que puede ser usado para la obtención de energía. La activación de AG a acil-CoA en el citosol permite la entrada a la mitocondria a través de la carnitina aminotransferasa. Una vez en la matriz mitocondrial se lleva a cabo la β -oxidación obteniéndose acetil-CoA, sustrato del ciclo de Krebs para la posterior obtención de energía en forma de ATP mediante la cadena respiratoria [161].

Tras la ingesta, la oxidación de AG se inhibe, al tiempo que se activa la lipogénesis, promoviendo la distribución y almacenaje de lípidos en el hígado [162]. Por otro lado, en situación de ayuno, la β -oxidación se activa para la producción de acetil-CoA que será utilizado para la cetogénesis o síntesis de cuerpos cetónicos (β -hidroxibutirato, acetoacetato y acetona), sustratos hidrosolubles que serán la fuente energética del cerebro en condiciones de ayuno prolongado [139].

E. El colesterol y lipoproteínas.

El hígado es un órgano central en la regulación de los niveles de colesterol en el organismo. No solo sintetiza el colesterol necesario para otros tipos celulares, sino que se encarga de la eliminación del exceso de colesterol en el organismo. El colesterol libre puede ser esterificado con AG y almacenado en forma de ésteres de colesterol en los CL, participar en la síntesis de hormonas esteroideas o convertirse en sales biliares que serán secretadas a la bilis para la posterior eliminación por las heces.

La síntesis de colesterol *de novo* en los hepatocitos se da en el retículo endoplásmico a partir de acetil-CoA por la enzima HMG-CoA reductasa que se regula negativamente por elevados niveles de colesterol intracelular. La familia de proteínas SREBP, que se sintetizan en el retículo, son factores de transcripción que activan diversos genes implicados en la síntesis de colesterol, así como de

AG. SREBP-1 es la isoforma que se expresa en hígado y su activación por proteólisis viene determinada por el control hormonal [163].

Por otra parte, el hígado sintetiza lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *Very Low Density Lipoproteins*) involucradas en el transporte de colesterol y otros lípidos. Las VLDL contienen colesterol libre y esterificado, además de TAG y fosfolípidos [128, 139]. El mecanismo de síntesis y secreción de las VLDL en el hígado es ampliamente conocido [164]. La apoproteína B100 (apoB100) es un componente clave cuya tasa de producción en el retículo endoplásmico controla la producción general de VLDL. Los componentes lipídicos sintetizados en el retículo endoplásmico liso son añadidos mediante la triacilglicerol transferasa microsomal a apoB. Tras ser transportadas en vesículas hasta el Golgi, se forman las vesículas secretoras que se dirigen a la membrana sinusoidal de los hepatocitos, se fusionan con la membrana y son secretadas al torrente sanguíneo [129].

Además de la síntesis *de novo*, las células pueden obtener colesterol de la circulación a partir de lipoproteínas de muy baja densidad (LDL, *Low Density Lipoproteins*) y lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High Density Lipoprotein*), principalmente en el hígado [165]. Las LDL se unen al receptor de LDL (LDLR) y son endocitadas. Las HDL son lipoproteínas compuestas por apolipoproteína1 (apo1) que es reconocida por el receptor SR-BI, LCAT (*lecithin-cholesterol acyltransferase*) y el transportador ABCA1 (*ATP binding cassette*). Las HDL son responsables del transporte reverso de colesterol de los tejidos periféricos al hígado [166], previniendo así las enfermedades coronarias puesto que permiten eliminar el exceso de colesterol en los tejidos. El colesterol que llega al hígado en forma de HDL entra en la vía de síntesis de ácidos biliares, donde es conjugado con las sales biliares para la posterior eliminación [129, 167].

3.3.2 Metabolismo de carbohidratos:

El hígado es un órgano muy importante para el metabolismo de los carbohidratos, manteniendo los niveles de sustratos energéticos requeridos por el organismo y haciendo frente a las necesidades metabólicas de cada situación concreta. Una de las funciones esenciales del hígado es mantener la homeostasis de glucosa en

sangre. Durante el estado postprandial, el hígado capta rápidamente la glucosa que llega al tejido hepático a través de la vena porta. Por otro lado, en el estado postabsortivo, durante el ayuno, controla la producción de glucosa y aporta la concentración necesaria para los tejidos extrahepáticos [168]. El metabolismo hepático de la glucosa viene determinado por la concentración de glucosa en la vena porta y los niveles en sangre de insulina y glucagón. En el hígado la glucosa se fosforila a glucosa-6-fosfato para la síntesis de glucógeno o se derivara a vías glucolíticas para la producción de piruvato, sustrato del ciclo de Krebs. Durante el ayuno, el hígado se encarga de la producción de glucosa mediante la degradación de glucógeno (glucogenólisis) y la gluconeogénesis (GNG) [128] (Figura 8).

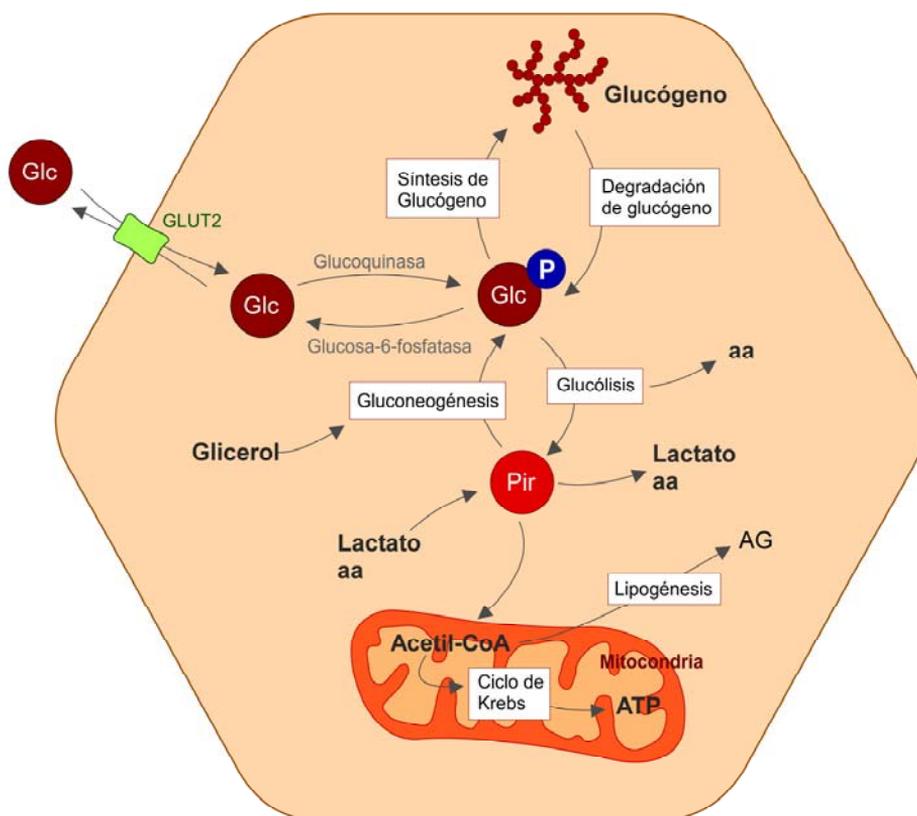


Figura 8. Esquema de las principales vías del metabolismo de la glucosa (Glc) en el hepatocito. La entrada y salida de glucosa se da mediante el transportador GLUT2 y se fosforila/defosforila por la glucoquinasa y la glucosa-6-fosfatasa, respectivamente. Se representan las vías de síntesis y degradación de glucógeno, así como la glucólisis y la gluconeogénesis y sus principales sustratos. La

lipogénesis se lleva a cabo a partir de Acetil-CoA para la producción de AG. A partir de piruvato (pir) también se puede sintetizar lactato y aminoácidos (aa).

A. Transporte de glucosa.

En el estado postprandial, la glucosa es captada por los hepatocitos mediante el transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2), transportador con gran capacidad y baja afinidad por glucosa [169]. Se ha visto que la depleción específica de GLUT2 en los hepatocitos bloquea la entrada de glucosa. Este transportador también tiene capacidad para secretar glucosa al tratarse de un transportador bidireccional, aun así en su ausencia y ante una situación de ayuno, la producción hepática de glucosa no se ve afectada, sugiriendo la implicación de otros transportadores como GLUT1 en la secreción de glucosa por parte de los hepatocitos [170]. Al contrario de lo que ocurre en el resto de tejidos del organismo, como el músculo esquelético o los adipocitos, en que la glucosa utiliza el transportador GLUT4, GLUT2 es independiente de insulina. Además, GLUT2 también se encuentra en los islotes pancreáticos y generalmente la literatura se refiere a él como “sensor de glucosa” [171].

Una vez la glucosa entra en el hepatocito se fosforila a glucosa-6-fosfato (G6P) por la enzima glucoquinasa (GCK) de forma dependiente de ATP. La G6P es incapaz de abandonar la célula por los transportadores de glucosa, de manera que es retenida en los hepatocitos. Su formación permite que la concentración neta de glucosa disminuya en el interior de los hepatocitos para incrementar de esta forma su captación [128]. Este sustrato es procesado por glucólisis o utilizado para sintetizar glucógeno, en función de la situación metabólica.

La expresión de GCK se encuentra estimulada por insulina y el receptor nuclear LRH-1, que a su vez es activado por fosfatidilcolina [172]. La depleción del receptor nuclear inhibe la actividad de GCK y consecuentemente la síntesis de glucógeno y la glucólisis [173]. La GCK, a diferencia de las otras hexoquinasas, no se inhibe por sustrato, de manera que permite el almacén de glucógeno en los hepatocitos durante el período postprandial. En condiciones de baja concentración

de glucosa, la proteína reguladora de GCK (GKRP), específica de hígado, se une a GCK e inhibe su actividad reteniéndola en el núcleo [168, 174].

B. Metabolismo de glucógeno.

La glucosa captada por los hepatocitos, así como ocurre en otros tejidos como el músculo esquelético, es almacenada en forma de glucógeno. Para la síntesis de glucógeno, la G6P es convertida a glucosa-1-fosfato por la fosfoglucomutasa y luego a UDP-glucosa por la UDP-glucosa pirofosforilasa. Posteriormente, la enzima glucógeno sintasa (GS) cataliza la transferencia de UDP-glucosa para la formación de glucógeno por enlaces α 1-4 liberando el nucleótido UDP y creando cadenas de 12 a 18 unidades. La enzima ramificadora de glucógeno se encarga de ramificar la cadena con enlaces glucídicos α 1-6 [175].

Por otra parte, cuando los niveles de glucosa en sangre decrecen y el hígado debe aportar glucosa a los tejidos extrahepáticos, la enzima glucógeno fosforilasa (GP) cataliza la degradación del glucógeno mediante la ruptura de los enlaces α 1-4 para formar glucosa-1-fosfato. La forma fosforilada de la GP es la forma activa responsable de esta degradación [176].

El control de este flujo de síntesis y degradación de glucógeno no se encuentra confinado a la regulación de una única enzima sino al equilibrio entre muchas de ellas. Dos de las enzimas con un alto grado de regulación e imprescindibles para el metabolismo del glucógeno son la GCK que aporta el primer sustrato de la síntesis y la GP que permite la degradación del glucógeno [168].

C. Glucólisis.

La glucólisis consiste en la metabolización de glucosa para generar piruvato, obteniendo por cada molécula de glucosa, 2 moléculas de ATP y 2 de NADH [127]. El piruvato puede ser direccionado a la mitocondria donde se metabolizará a acetil-CoA, intermediario esencial para la generación del ATP y NADH mediante el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. A partir de acetil-CoA también se puede dar la síntesis de AG, como se ha comentado anteriormente. Además, productos intermediarios de la glucólisis son utilizados para la síntesis de aminoácidos y otras moléculas [128].

El flujo glucolítico está controlado por 4 quinasas: la GCK, la 6-fosfofructosa-1-quinasa (PFK), la piruvato quinasa del hígado (PK-L) y la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK). Estas enzimas están positivamente reguladas durante el período postprandial cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados y por lo tanto la captación de glucosa por parte de hígado es mayor [177].

El piruvato, producto de la PK-L, puede ser descarboxilado a acetil-CoA en la mitocondria por la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) y procesado en el ciclo de Krebs o utilizado para la lipogénesis. La PDH es fosforilada e inactivada por la PDK, y defosforilada y consecuentemente activada por la enzima piruvato deshidrogenasa fosfatasa. Durante el ayuno, PDK se encuentra sobreactivada y su depleción incrementa la actividad del PDH aumentando la entrada de piruvato al ciclo de Krebs [178].

D. Gluconeogénesis.

Durante un ayuno prolongado, cuando los depósitos de glucógeno se han agotado, los hepatocitos sintetizan glucosa a partir de diferentes sustratos gluconeogénicos como el piruvato, el lactato, el glicerol y los aminoácidos. Estos sustratos pueden ser generados por el hígado o provenir de otros tejidos extrahepáticos. La tasa de GNG viene determinada por la disponibilidad de estos sustratos, así como también por la expresión y activación de enzimas gluconeogénicas como la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la fructosa-1,6-bisfosfatasa (F1,6Pasa) que controlan puntos esenciales de esta vía [128].

Durante el ayuno o en situación de ejercicio, el musculo esquelético produce piruvato a partir de la glucogenólisis y posterior glucólisis. El piruvato obtenido en este momento puede seguir 2 vías, I. Ser catabolizado, por la piruvato deshidrogenasa (PDH) en la mitocondria para producir acetil-CoA que será completamente oxidado en el ciclo de Krebs o bien, II. Ser convertido a lactato y secretado al torrente sanguíneo para ser utilizado por los hepatocitos en la producción de glucosa. En el hígado, el lactato es oxidado por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) a piruvato que es el primer intermediario de la GNG (Figura 9). Así, el lactato fruto del metabolismo energético muscular es convertido en glucosa por el hígado, completando el denominado ciclo de Cori [175, 179].

La GNG a partir de aminoácidos tiene un papel muy importante durante el ayuno, proporcionando glucosa a los tejidos dependientes, especialmente el cerebro. Estos aminoácidos son convertidos en el hígado a α -cetoácidos, por reacciones de desaminación catalizadas por diversas enzimas para convertirse en diferentes intermediarios del ciclo de Krebs y servir como precursores de la GNG [128, 179]. Los aminoácidos glucogénicos provienen principalmente de la degradación proteica en el músculo esquelético, aunque, a corto plazo también el hígado puede proteolizar sus proteínas para obtenerlos. En el músculo esquelético se degradan los aminoácidos y los grupos amino se recogen en forma de glutamato. El glutamato puede convertirse a glutamina a través de la glutamina sintasa para su transporte al hígado o puede transferir su grupo amino al piruvato para la producción de alanina mediante la alanina aminotransferasa (ALAT) del músculo. Posteriormente, la alanina pasa a la sangre y es también transportada hasta el hígado. Más del 50% de los aminoácidos secretados por el músculo son alanina y glutamina [180]. La alanina, es el principal aminoácido gluconeogénico en el hígado [181], y aparte del lactato, la mayor fuente de piruvato en este órgano [182]. La glutamina, en cambio, se ha descrito principalmente como sustrato para la GNG renal e intestinal, aparte de la hepática [183]. La GNG en el intestino y el riñón, aunque en menor medida que en el hígado, es muy importante en períodos largos de ayuno suponiendo un 20% de la producción de glucosa [184-186].

Una vez en el hígado, la ALAT transfiere el grupo amino de la alanina a un α -cetoglutarato, intermediario del ciclo de Krebs, formando glutamato y piruvato [175]. Existen dos isoformas de esta enzima, ALAT1 y ALAT2. ALAT1 tiene una localización citosólica mientras que ALAT2 se encuentra en la fracción mitocondrial [187]. En cuanto a su expresión en los diferentes tejidos, cabe destacar que la isoforma 1 se encuentra predominantemente en el hígado, mientras que la 2 es apenas indetectable [188]. Así, la alanina que proviene del músculo esquelético es convertida a glucosa en el hígado mediante el ciclo de glucosa-alanina [175, 179] (Figura 9).

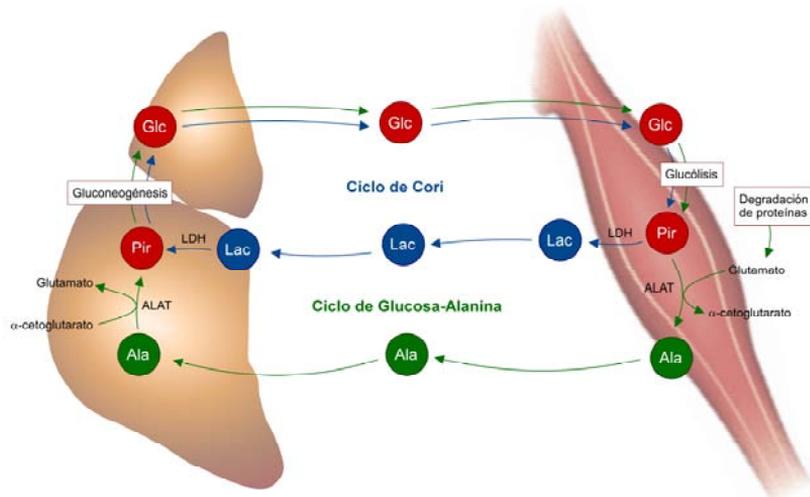


Figura 9. Esquema del ciclo de Cori (azul) y el ciclo de la Glucosa-Alanina (verde). La glucólisis en el músculo esquelético produce piruvato (Pir) (rojo, panel derecho). En el hígado se lleva a cabo la gluconeogénesis a partir del piruvato obtenido de lactato (Lac) o alanina (Ala) para la síntesis de glucosa (Glc) (rojo, panel izquierdo).

Para iniciar la GNG, el piruvato obtenido de lactato o aminoácidos vía transaminación, es transportado a la mitocondria y convertido a oxalacetato por la piruvato carboxilasa. El oxalacetato se reduce, posteriormente a malato por la enzima malato deshidrogenasa mitocondrial y es exportado al citoplasma donde se oxida de nuevo a oxalacetato por medio de la enzima malato deshidrogenasa citoplasmática. El oxalacetato citoplasmático pasa a fosfoenolpiruvato (PEP) por la PEPCK citoplasmática. Tras múltiples reacciones bioquímicas, el PEP se convierte a fructosa-1,6-bisfosfato (F1,6P) que se defosforila por la fructosa-1,6-bisfosfatasa (F1,6Pasa) para generar fructosa-6-fosfato (F6P). La G6P, generada a partir de la F6P, es defosforilada por la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) a glucosa permitiendo la secreción por los transportadores GLUT2 a la sangre [128] (Figura 10).

Como se ha comentado previamente, otro de los principales substratos de la GNG es el glicerol. Éste es secretado al torrente sanguíneo desde el tejido adiposo procedente de la lipólisis, entra en los hepatocitos por la aquaporina-9 y es fosforilado a glicerol-3-fosfato por la glicerol quinasa, siendo otro precursor de la

síntesis de glucosa [179, 189-191]. La β -oxidación de AG no produce sustratos gluconeogénicos, pero genera el ATP necesario para este proceso [127].

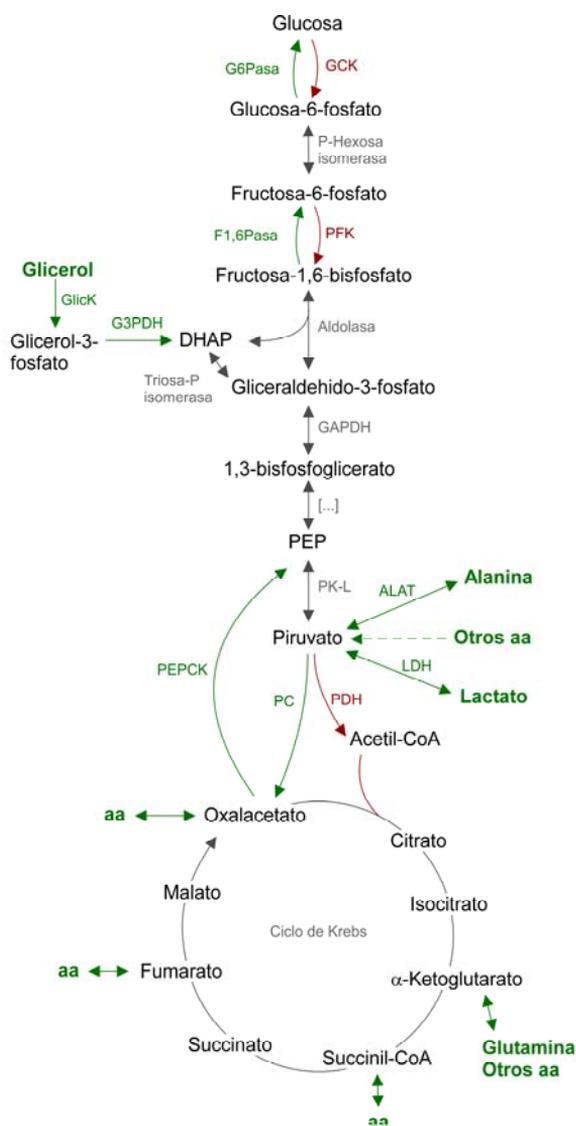


Figura 10. Esquema del proceso de gluconeogénesis (verde). También se muestra la vía glucolítica (rojo). Se muestra el punto de entrada de los sustratos gluconeogénicos alanina, otros aminoácidos (aa), lactato y glicerol a la vía gluconeogénica, así como las enzimas encargadas de su metabolismo. G6Pasa: glucosa-6-fosfatasa; F1,6Pasa: Fructosa-1,6-fosfatasa; GlicK: Glicerol quinasa; G3PDH: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; GAPDH: glicerolaldehido-fosfato deshidrogenasa DHAP: dihidroxiacetona fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; PK-L: piruvato quinasa del hígado PC: piruvato carboxilasa; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; ALAT: alanina aminotransferasa; LDH: lactato deshidrogenasa; GCK: glucoquinasa; PFK: 6-fosfofructosa-1-quinasa; PDH: piruvato deshidrogenasa.

La defosforilación de la G6P por la G6Pasa es un paso limitante común para la glucogenólisis y la GNG. La depleción hepática de la G6Pasa en ratones provoca hiperlipidemia, acidosis láctica, uricemia y hepatomegalia con acumulación hepática de glucógeno y esteatosis [192]. Además, la depleción sistémica de la G6Pasa provoca muerte posnatal a los 3 días de vida [193]. Por otra parte, los ratones genoanulados para PEPCK, específicamente en hepatocitos, son viables,

pero son incapaces de producir glucosa a partir de la GNG de lactato o aminoácidos, llevando a una acumulación de intermediarios del ciclo de Krebs que provoca una acumulación de TAG y esteatosis hepática durante el ayuno [194]. Estos ratones deficientes en PEPCK son capaces de producir glucosa a partir de glicerol y mantener niveles normales de glucemia a las 24 horas de ayuno [195].

La gran mayoría de las enzimas implicadas en la GNG están reguladas alostérica y postranscripcionalmente. Muchas se encuentran acetiladas dependiendo de la disponibilidad de nutrientes. Por ejemplo, la concentración de glucosa estimula la acetilación de la PEPCK citoplasmática promoviendo su ubiquitinización y degradación, mientras que en ausencia de glucosa, esta enzima es deacetilada por SIRT2 estabilizándola para contribuir al aumento de la GNG [196].

Por otro lado, la GNG hepática está también controlada por numerosos factores de transcripción como CREB, FOXO1 (*forkhead box protein*), y C/EBP α/β , que estimulan la expresión de PEPCK y G6Pasa. La inhibición de CREB en el hígado provoca la disminución de la expresión de estas enzimas y conlleva la reducción de la producción de glucosa hepática [197]. En ratones a los que se les depleciona FOXO1, específicamente en el hígado, se observa una reducción tanto de la glucogenólisis como de la GNG durante el ayuno, provocando hipoglucemia [198]. También ocurre lo mismo con C/EBP α , cuya ausencia provoca la muerte por hipoglucemia a las 8 horas de vida de los ratones, debido a que éstos son incapaces de almacenar glucógeno. Además, este factor de transcripción promueve el catabolismo de los aminoácidos por el ciclo de la urea aumentando los sustratos gluconeogénicos. Aun así, su depleción específica en el hígado no afecta a la expresión de PEPCK y G6Pasa y los ratones presentan niveles de glucosa en sangre normales [199], sugiriendo una acción compensatoria por otras C/EBP, como la β , cuya depleción también provoca una disminución de la producción hepática de glucosa [200]

3.3.3 Metabolismo de los aminoácidos:

El hígado es el mayor órgano responsable del metabolismo y homeostasis de los aminoácidos. Los aminoácidos obtenidos a partir de la dieta son oxidados en el

intestino, y aproximadamente un 20% son metabolizados en el músculo esquelético. Tras la ingesta, los aminoácidos que se encuentran en exceso son captados por el hígado. Este órgano también es capaz de sintetizar algunos aminoácidos y producir glucosa y cuerpos cetónicos a partir de los secretados por el músculo en situaciones de ayuno. Algunos aminoácidos son usados en el hígado para la producción de moléculas como la creatina y para la conjugación de xenobióticos para su posterior eliminación [183].

Existen diferentes transportadores responsables de la entrada de aminoácidos clasificados en función de grupos estructuralmente muy parecidos. Estos pueden dividirse en dos grupos según las necesidades energéticas, I. Transportadores dependientes de Na^+ , que utilizan un gradiente electroquímico de Na^+ para llevar a cabo la translocación de aminoácidos en contra del gradiente de concentración y II. Transportadores independientes de Na^+ que facilitan el transporte de aminoácidos en cualquier dirección dependiendo de la concentración del gradiente. Los sistemas de transportadores de aminoácidos más importantes son A, N, ASC, L entre otros para aminoácidos neutros, y^+ , y^+L , b^+ , etc. para catiónicos y X_{AG}^- X_{C}^- para los aniónicos [201, 202].

Los 3 principales sistemas de transporte de aminoácidos neutros en mamíferos son el sistema ASC, A, N y L [202, 203]. El Sistema ASC específicamente transporta alanina, serina y cisteína, aunque también otros aminoácidos alifáticos. Aunque es dependiente de Na^+ , este sistema parece mediar el intercambio de aminoácidos más que la captación neta de estos. El Sistema L, reconoce aminoácidos aromáticos de cadena ramificada y neutros [204] y a diferencia del sistema ASC, es independiente de Na^+ [205]. El Sistema A cataliza la captación de aminoácidos neutros de forma dependiente de Na^+ , particularmente alanina, serina y glutamina, y presenta una gran sensibilidad por el bajo pH extracelular que inhibe su actividad. Por último el sistema N media la captación específicamente de glutamina, histidina y asparagina de forma dependiente de Na^+ con gran sensibilidad también por el bajo pH extracelular. Además, este sistema media el intercambio de aminoácidos con el cotransporte de Na^+ e intercambio de protones [206].

Los sistemas de transportadores de aminoácidos están englobados dentro de la familia de transportadores de solutos (SLC, *Solute Carrier*) formada por transportadores acoplados a iones, intercambiadores y transportadores pasivos. Contiene 52 familias con casi 400 genes diferentes. Los solutos transportados por estos transportadores no solo se remiten a los aminoácidos sino también a bicarbonato como la familia SLC4 [207], glucosa y otros glúcidos por las familias SLC2 (los denominados GLUT) [208] y SLC5 [209]. También intercambiadores Na^+ y Ca^{2+} como las familias SLC8 [210] y SLC9 [211], respectivamente o sales biliares con los SLC10 [212], entre muchas otras. El 25% de los SLC transportan aminoácidos como sustratos principales [213]. A continuación, en la Tabla 3 se muestra un resumen de las familias de SLC que transportan aminoácidos.

Tabla 3. Resumen de los transportadores de la familia SLC que transportan aminoácidos.

Familia SLC	Especificaciones
SLC1	Alta afinidad por glutamato y aminoácidos neutros [214].
SLC3 y SLC7	Aminoácidos catiónicos, entre otros. Sistemas ASC, L, y ⁺ [215].
SCL17	Glutamato vesicular [216].
SLC32	Inhibidor vesicular de aminoácidos. Glicina SNC [217].
SLC36	Aminoácidos cotransportados con protones [217].
SLC38	Sistema A y N cotransportadores de Na^+ [217].
SLC43	Sistema L independientes de Na^+ [218].

SNC: Sistema nervioso central.

Uno de los mayores *clusters* filogenéticos de transportadores de aminoácidos de las familias de SLC es la familia β , que forma parte del grupo aminoácido-poliamina-organocation (APC) [219] y que contiene las familias SCL32, que solo se expresan en el sistema nervioso central, SCL36 y SCL38 con 1, 4 y 11 miembros en humanos, respectivamente [217]. En la Tabla 4 se puede ver un resumen de los transportadores de aminoácidos que se expresan, entre otros, en el órgano hepático [204, 214-217, 220].

Tabla 4. Resumen de los transportadores de aminoácidos que se encuentran expresados en hígado.

Sistema	Nombre gen humano	Nombre de la proteína/ Alias	Transporte	Sustrato	Distribución tisular
X ^{-AG}	SLC1A1	EAAC1, EAAT3	Co/Na ⁺ Co/H ⁺ Co/K ⁺	E, D	Cerebro, intestino, riñón, hígado corazón, páncreas
X ^{-AG}	SLC1A2	GLT-1, EAAT2	Co/Na ⁺ Co/H ⁺ Co/K ⁺	E, D	Cerebro, hígado, páncreas
ASC	SLC1A4	ASCT1, SATT	Co/Na ⁺ E / amino-ácidos	A, S, C	Ubicua
y ⁺	SLC7A2	CAT-2 (A o B) / ATRC2	F	catiónicos	Hígado, músculo esquelético, páncreas
L	SLC7A8	LAT2 / 4F2hc	E	L-amino-ácidos neutros	Intestino delgado, riñón, pulmón, corazón, hígado, cerebro, ovario, testículo, músculo esquelético, Páncreas
X ^c	SLC7A11	xCT / 4F2hc	E	C (forma aniónica), E	Macrófagos, cerebro, retina, células pigmentarias, hígado, riñón
	SLC17A8	VGLUT3	Cl ⁻	E	Cerebro, riñón, hígado
TC	SLC36A1	PAT1 / LYAAT1	Co/H ⁺	GABA, P, G, β-A	Cerebro, intestino (en particular colón), riñón, pulmón, hígado y bazo
TC	SLC36A4	PAT4 / LYAAT2	Co/H ⁺	P, W	Ubicua
A	SLC38A2	SNAT2 / ATA2, SAT2	Co/Na ⁺	A, N, C, Q, G, H, M, P, S	Ubicua
N	SLC38A3	SNAT3 / SN1	Co/Na ⁺ , I/H ⁺	Q, H, A, N	Hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas
A	SLC38A4	SNAT4 / ATA3, NAT3, PAAT	Co/Na ⁺	A, N, C, G, S, T	Cerebro, retina, hígado, riñón, tejido adiposo
N	SLC38A5	SNAT5 / SN2	Co/Na ⁺ , I/H ⁺	Q, N, H, S	Estómago, cerebro, hígado, pulmón, intestino delgado, bazo, colón, riñón

-	SLC38A6	SNAT6	N/A	N/A	Cerebro, ojo, corazón, hígado, riñón
N	SLC38A7	SNAT7	?/Na ⁺	Q, H, S, A, N	Cerebro, hígado, músculo esquelético, útero, glándula pituitaria
-	SLC38A9	N/A	N/A	N/A	Ubicua
-	SLC38A10	N/A	N/A	N/A	Cerebro, glándula pituitaria, pulmón, riñón, hígado

Co: cotransporte, I: intercambiador, F: transporte facilitado. A: Alanina, C: Cisteína, D: Aspartato, E: Glutamato, G: Glicina, H: Histidina, M: Metionina; N: Asparagina, P: Prolina, Q: Glutamina, S: Serina, T: Treonina, W: Triptófano. (Información extraída de la página web: bioparadigms.org creada en 2004 por el Prof. Matthias A. Hediger).

Estos transportadores son regulados por su expresión y tipo celular en el que se expresan. Por ejemplo, el Sistema A de transportadores es rápidamente estimulado por glucagón en el hígado, en cambio es inducido por insulina en músculo esquelético y adipocitos [220]. La característica única de este sistema es la habilidad para reconocer el sustrato ácido N-(metilamino)isobutil (MeAIB), sustrato competidor inhibitorio de este sistema [221].

El catabolismo de cada aminoácido, en particular de los esenciales, está estrictamente controlado por diferentes vías. Una de las vías de regulación más importantes es a través del glucagón, que se da tras una ingesta proteica muy elevada. Además, esta hormona conjuntamente con glucocorticoides induce la síntesis de muchas enzimas metabolizadoras de aminoácidos [180, 222].

3.4 El hígado en el estado postprandial y el ayuno.

Como se ha visto anteriormente, el hígado es un órgano crucial para la regulación del metabolismo energético. Tanto es así, que conecta varios órganos como el músculo esquelético y el tejido adiposo y provee de sustratos energéticos a todos los tejidos, adaptándose a las diferentes situaciones metabólicas a las que se enfrenta el organismo.

En el hígado, el metabolismo de lípidos, glucosa y aminoácidos está estrechamente relacionado. Las vías catabólicas y anabólicas comparten

metabolitos intermediarios y cascadas de señalización. Los hepatocitos son muy flexibles a la hora de seleccionar las fuentes metabólicas de energía (AG, glucosa y/o aminoácidos) de forma regulada por señales hormonales, neuronales y por la disponibilidad de nutrientes [128].

Bajo el control hormonal de insulina (Figura 11) y glucagón (Figura 12) los hepatocitos son capaces de responder a las situaciones de ingesta y ayuno, almacenando o produciendo glucosa. Todo ello, permite a los hepatocitos mantener una concentración de glucosa sanguínea a niveles normales (euglucemia) [128].

3.4.1 Estado postprandial:

Durante la ingesta, la glucosa, AG y aminoácidos son absorbidos y pasan al torrente sanguíneo mediante el cual son transportados al hígado a través de la vena porta. En el hígado, la glucosa se almacena en forma de glucógeno o se metaboliza por glucólisis, que se encuentra sobreactivada. Los intermediarios y sustratos de la glucólisis se usan para la síntesis de AG y aminoácidos, o bien son completamente oxidados para la producción de ATP. En los hepatocitos, los AG y el colesterol son esterificados para generar TAG y EC. Los lípidos esterificados son almacenados en CL o secretados a la circulación en VLDL. Los aminoácidos son metabolizados para obtener energía o usados para la síntesis de proteínas, glucosa y/u otras moléculas.

Durante este período postprandial los niveles altos de insulina previenen la hiperglucemia, en parte suprimiendo la GNG y glucogenólisis hepática, facilitando la síntesis de glucógeno y glucólisis [128] e induciendo la captación de glucosa en los tejidos extrahepáticos.

Cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados, como se da después de la ingesta, las células β del páncreas, en los islotes de Langerhans, secretan insulina. En el hígado, la insulina se une al receptor de insulina que interacciona a su vez con los sustratos del receptor de insulina 1 y 2 (IRS1 y IRS2, *Insulin receptor substrate*) fosforilándolos en residuos tirosina [223]. El receptor cMet, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, *Hepatocyte growth factor*), es capaz de

formar un complejo híbrido con el receptor de insulina para promover la señalización de esta hormona [224]. Una vez las proteínas IRS están fosforiladas, se activa la vía de PI3K/Akt [223]. El producto de la PI3K, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato provoca la translocación de Akt a la membrana plasmática donde es activada. La activación de Akt inhibe la actividad de la glucógeno sintasa quinasa (GSK) mediante fosforilación, de manera que se suprime la fosforilación de la GS y así esta enzima es activa para la producción de glucógeno [225].

Por otro lado, la insulina está implicada en la supresión de la GNG por mecanismos directos en el hígado e indirectos en los tejidos extrahepáticos. En el hígado, Akt activada por insulina fosforila el factor de transcripción FOXO1 y PGC-1 α de manera que estos no interaccionan, impidiendo la translocación al núcleo e inhibiendo así, la transcripción de genes gluconeogénicos [198, 226-228]. Además de FOXO1, la insulina también fosforila e inhibe vía Akt otros factores de transcripción como FOXO2, FOXO4 y FOXO6 [226]. Aun así, la insulina sigue suprimiendo la producción de glucosa hepática en ratones triplemente genoanulados específicamente en el hígado para Akt1, Akt2 y FoxO1, indicando que esta hormona podría estar inhibiendo la GNG por otros mecanismos independientes [229]. En los demás tejidos, la insulina activa la captación de glucosa mediante los transportadores GLUT dependientes de insulina.

La insulina también promueve la glucólisis mediante la fosforilación de la F6P, uno de los intermediarios de esta vía [230]. El aumento en la glucólisis permite un incremento de la disponibilidad de precursores lipogénicos [128]. Al mismo tiempo, la activación de la vía PI3K/Akt dependiente de insulina estimula la lipogénesis, aunque por una vía independiente de la inhibición de la GNG [231]. De esta manera, se activa mTOR, que es requerida para la estimulación de la proteína reguladora de unión a esteroides (SREBP-1, *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*), a través de la fosforilación de lipin-1 que inhibe SREBP-1 [232]. Por otra parte, la represión de la autofagia mediada por insulina viene determinada por la fosforilación, dependiente de Akt, del factor de transcripción FOXO1 que también activa transcripcionalmente genes relacionados con la autofagia [231]. Además, FOXO1 inhibe simultáneamente la activación de SREBP, necesaria para la

biosíntesis del colesterol y AG. Así, la insulina, induce la lipogénesis y reprime la autofagia [127].

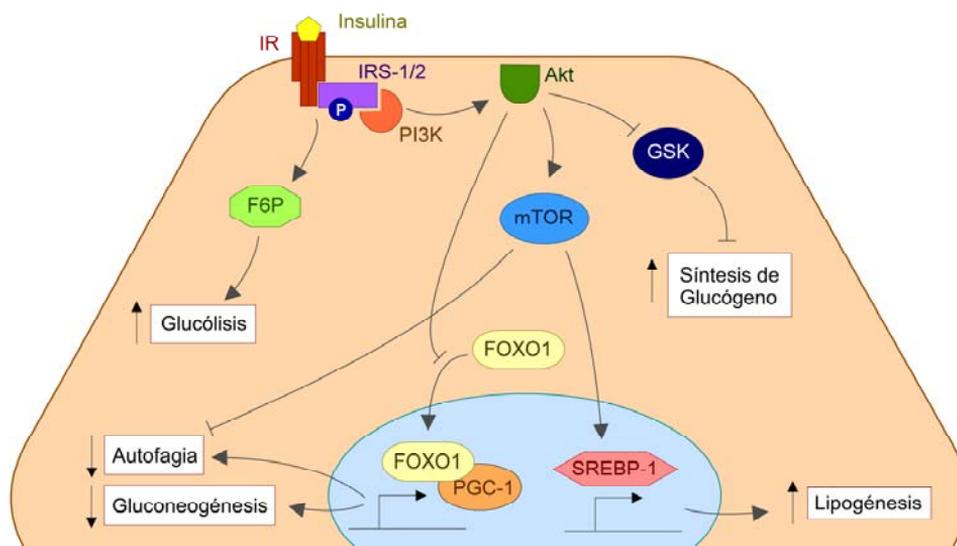


Figura 11. Esquema resumen del metabolismo en los hepatocitos durante el estado postprandial. Activación de la señalización por insulina que promueve la síntesis de glucógeno, la glucólisis y la lipogénesis e inhibe la gluconeogénesis y la autofagia.

3.4.2 Ayuno:

En un estado de ayuno o durante el ejercicio, el hígado secreta sustratos como glucosa o TAG en forma de VLDL, que serán metabolizados por el músculo esquelético y el tejido adiposo, así como por otros tejidos extrahepáticos. El tejido adiposo produce y secreta NEFA y glicerol mediante la lipólisis. La lipólisis, por otro lado también se activa en el hígado. El músculo degrada glucógeno y proteínas para secretar lactato y alanina. La alanina, el lactato y el glicerol son captados por el hígado y usados como precursores de la síntesis de glucosa mediante GNG. Los NEFA son β -oxidados en la mitocondria de los hepatocitos para generar ATP o cuerpos cetónicos. De esta forma, el hígado provee de sustratos energéticos a todos los tejidos extrahepáticos en situaciones de ayuno [127, 128].

El glucagón evita la hipoglucemia activando la GNG y la glucogenólisis, y la posterior secreción de glucosa a la circulación [128]. Cuando los niveles de glucosa

en sangre decrecen, la secreción de glucagón por las células α -pancreáticas de los islotes de Langerhans lleva a un aumento de la concentración plasmática de glucosa. Los receptores de glucagón son miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G, que activan la vía de la proteína quinasa A (PKA) [228, 233]. La unión de glucagón a su receptor, por tanto conlleva, la activación de la serina/treonina quinasa PKA provocando la fosforilación y activación de la glucógeno fosforilasa quinasa que fosforila a la enzima glucógeno fosforilasa, activándola y promoviendo la degradación de glucógeno. Las reservas de glucógeno son consumidas en un período relativamente corto. Es entonces cuando la GNG en los hepatocitos y en los otros órganos gluconeogénicos, como el intestino y el riñón, empieza a tener un papel importante [225].

La activación de PKA también provoca la fosforilación de la proteína de unión en respuesta a cAMP (CREB, *cAMP response element binding protein*). CREB es un factor de transcripción que promueve la expresión de diferentes genes como PGC-1, que interacciona con FOXO1 para mediar la expresión de genes gluconeogénicos [228]. La translocación de FOXO1 al núcleo, por su parte, viene mediada también por glucagón. Esta hormona provoca la salida de Ca^{2+} del retículo endoplásmico vía PKA que es capaz de fosforilar y activar el receptor de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3R) [234]. El Ca^{2+} activa CaMKII que a su vez media la translocación de FOXO1 vía p38 MAPK, que también estimula la GNG [235]. Además, para una completa activación transcripcional de genes gluconeogénicos, es necesaria la coactivación con glucocorticoides y el factor de transcripción HNF-4 α [236].

Por otra parte, durante el ayuno, la principal fuente de AG en el hígado proviene de los NEFA derivados de la lipólisis en los adipocitos, todo ello promovido por catecolaminas, péptido natriurético y glucagón [134]. A su vez la lipólisis y lipofagia de CL, en el hígado, se encuentra sobreactivada [127]. La β -oxidación a partir de estos lípidos, es la fuente de energía predominante en el hígado durante los periodos de ayuno [127], además de generar cuerpos cetónicos que son exportados a la circulación para proveer de energía a los tejidos extrahepáticos [128].

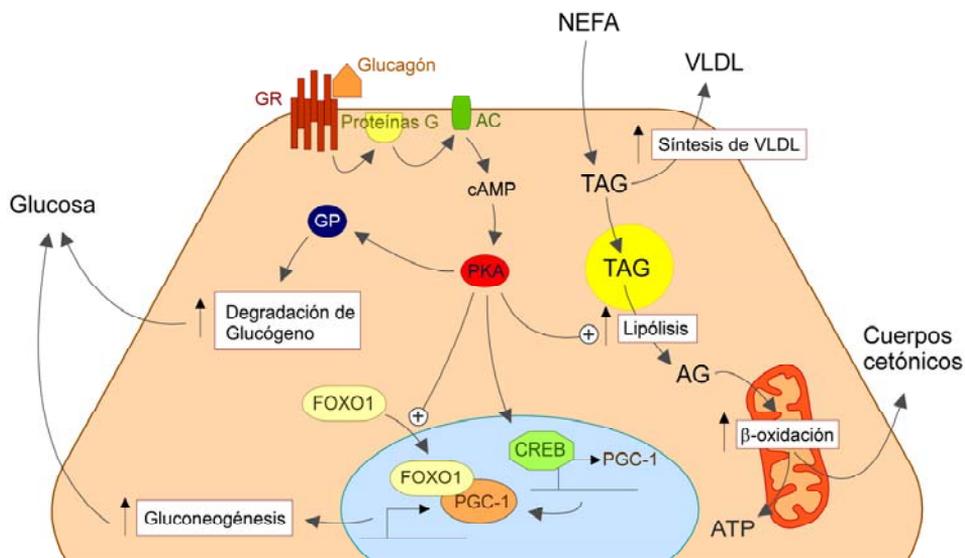


Figura 12. Esquema resumen del metabolismo en los hepatocitos durante el ayuno. Activación de la señalización por glucagón a través del receptor acoplado a proteína G activándose PKA. PKA promueve la degradación de glucógeno con la activación de la glucógeno fosforilasa (GP). Al mismo tiempo PKA activa CREB que se transloca al núcleo para transcribir PGC-1. FOXO1 y PGC-1 interaccionan para activar genes implicados en la gluconeogénesis. La degradación de glucógeno y la gluconeogénesis permiten la secreción de glucosa. Los NEFA que llegan al hígado se almacenan en forma de TAG en los CL. Los AG derivados de la lipólisis de CL son destinados a la β -oxidación para la producción de ATP o cuerpos cetónicos. Por último, los hepatocitos secretan TAG mediante la formación de VLDL.

4. La regeneración hepática

La regeneración hepática es un proceso ampliamente estudiado en el que el hígado crece controladamente para recuperar la masa inicial tras un daño tisular o pérdida de tejido hepático [237]. Ya en la antigua Grecia, el mito de Prometheus se basaba en la creencia de la capacidad de este órgano para regenerar. En esta historia mitológica, Zeus castiga a Prometheus por intentar engañar a los dioses, siendo desterrado a las montañas del Caucaso donde un águila se alimenta de su hígado cada día, gracias a la habilidad del órgano para regenerar durante la noche [238].

La regeneración hepática se da como respuesta a diferentes factores que dañan el hígado como virus, agentes tóxicos (tetracloruro de carbono (CCl_4), tioacetamida, acetaminofen y D-galactosamina) [239], o resecciones quirúrgicas. Los estudios experimentales de regeneración hepática más utilizados se han llevado a cabo en roedores mediante la administración de CCl_4 o con una resección quirúrgica. Estos procedimientos desencadenan una respuesta sistémica y local en el hígado, especialmente en los hepatocitos, para que se dé el proceso de regeneración [240].

La resección del hígado produce una rápida inducción de la secreción de diferentes citoquinas así como la expresión de más de 100 genes que no se expresan habitualmente en el hígado [241], provocando la salida de los hepatocitos de su estado de quiescencia (G_0) para la entrada al ciclo celular (G_1). El proceso de regeneración hepática es altamente sincrónico y se puede dividir en tres fases principales. Inicialmente, la respuesta aguda con 3 redes de señalización implicadas: citoquinas, factores de crecimiento y factores de transcripción, encargadas de activar los hepatocitos y prepararlos para la entrada a ciclo celular. Posteriormente la fase de replicación del DNA y mitosis que conlleva la proliferación de las células hepáticas. Por último, la fase de terminación del proceso regenerativo, que culmina al recuperar la masa hepática inicial [241-243].

En otros modelos animales de regeneración hepática donde los hepatocitos son directamente dañados mediante un agente químico, provocando la necrosis del parénquima hepático, también se activan las mismas vías de activación que tras una resección [244]. En este caso, la proliferación de los hepatocitos sigue siendo

esencial, pero se da de forma asincrónica [245]. Además, en respuesta a diferentes agentes como retrorsina o D-galactosamina, los hepatocitos son incapaces de proliferar con lo que la población de células ovals proliferan para dar lugar al parénquima hepático [246]. El origen de la células ovals es controvertido, aunque se ha descrito que provienen de las células epiteliales biliares también se ha visto que pueden originarse de hepatocitos que han escapado al daño hepático [247].

Más relevante aún que la capacidad de los hepatocitos para proliferar, es el hecho de que estos lo hacen al mismo tiempo que se encargan de mantener todas las funciones esenciales para la correcta homeostasis del organismo. Estas funciones incluyen la regulación de la concentración de carbohidratos y lípidos en sangre, la síntesis de diferentes proteínas sanguíneas, la secreción de la bilis, la detoxificación, entre muchas otras [248].

4.1 Hepatectomía parcial.

Las resecciones hepáticas en roedores han sido ampliamente utilizadas como modelo para el estudio de la regeneración hepática, el fallo hepático agudo, la respuesta a estrés, entre otros [111]. La regeneración hepática tras una hepatectomía parcial (HP) es uno de los modelos mejor estudiados de regeneración celular y tisular [249].

Debido a la anatomía hepática de los roedores, con lóbulos bien separados, la resección de uno o más lóbulos es posible y altamente reproducible. Además, este proceso no conlleva una necrosis del parénquima con infiltración de macrófagos y otras células extrahepáticas que pueden alterar proceso regenerativo. Por último, al realizar una resección, el inicio de la respuesta regenerativa queda bien establecido en el tiempo provocando una respuesta altamente sincrónica [240]. El modelo clásico de HP, y el modelo más usado en los estudios de regeneración hepática, fue descrito en rata por Higgins y Anderson en 1931 [250]. Este método consiste en una HP de 2/3 en la que se realiza una resección de los lóbulos medial y lateral izquierdo, de manera que se elimina aproximadamente el 66% de la masa hepática. Otros modelos de resección del 90, 95 e incluso 97% del hígado se utilizan para el estudio de daño hepático agudo [251, 252]. En ratón la hepatectomía parcial de 2/3

en que se realiza la resección de los lóbulos mediales y lateral izquierdo representa el 60% del total de masa hepática [253, 254] (Figura 13).

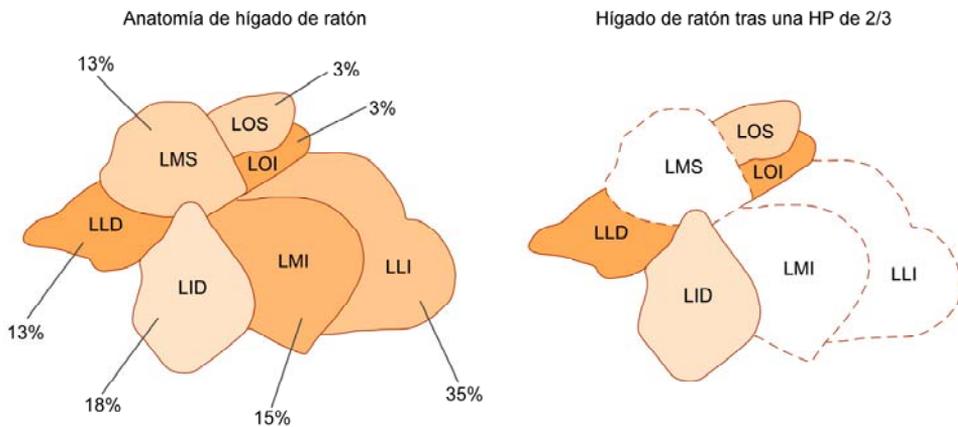


Figura 13. Esquema de la anatomía de los diferentes lóbulos del hígado de ratón y su contribución relativa al total de la masa hepática (panel izquierdo). LID: lóbulo inferior derecho, LMI: lóbulo medial inferior; LMS: lóbulo medial superior; LLD: lóbulo lateral derecho; LLI: lóbulo lateral izquierdo; LOS: lóbulo omental superior; LOI: lóbulo omental inferior. La hepatectomía parcial de 2/3 (panel derecho) implica la resección de los lóbulos LMS, LMI y LLI. En la figura se muestran con línea discontinua los lóbulos extirpados, representando el 60% aproximadamente de la masa hepática.

Tras la cirugía, el hígado inicia una respuesta regenerativa y el 95% de los hepatocitos de los lóbulos residuales participan en una o dos rondas de proliferación [237]. En este proceso también las demás células hepáticas, como las células endoteliales, las células de Kupffer y las células estrelladas, proliferan para restaurar el tejido hepático con una estructura funcional completa [255]. De esta manera el hígado remanente consigue recuperar la masa inicial por un proceso de hiperplasia compensatoria en unos 7 días en el caso de roedores [243]. También en humanos se da una rápida regeneración hepática, tanto en donantes a los que se les realiza una resección como en el receptor, doblando la masa hepática entre los 7 y 14 días respectivamente, y recuperándose totalmente a los 60 días [256].

4.2 Fases de la regeneración hepática.

La regeneración hepática consta esencialmente de 3 fases (Figura 14). La fase de activación (pre-replicativa) donde se inicia la cascada de señalización por parte de diversas citoquinas, que activan diversos factores de transcripción esenciales para la regeneración. En esta fase también se da la activación mitogénica por parte de los factores de crecimiento necesarios para la proliferación celular. Tras la activación, el proceso de regeneración sigue con una fase de proliferación en que se lleva a cabo la síntesis de DNA y la mitosis. Paralelamente, el hígado experimenta una serie de adaptaciones metabólicas que se caracterizan por un proceso esteatótico con la acumulación de CL. Por último, la fase de terminación que, como su nombre indica, implica el final del proceso regenerativo con la recuperación de la masa inicial por hiperplasia.

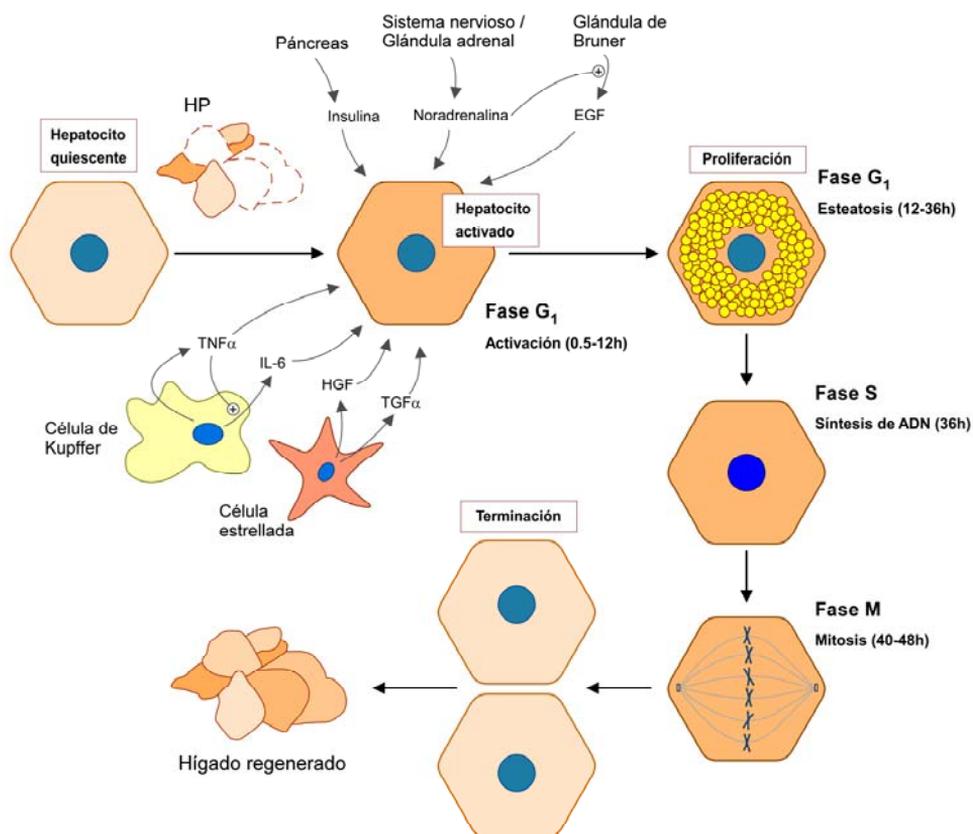


Figura 14. Esquema de las diferentes fases del proceso de regeneración hepática tras una HP:

activación, proliferación y terminación. Se detallan las diferentes citoquinas y factores de crecimiento, entre otros de la fase de activación. El proceso esteatótico también está representado, así como el ciclo celular del hepatocito hasta que prolifera y recupera la masa hepática inicial.

4.2.1 Fase de activación:

Existen diversas citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y otros factores que actúan conjuntamente llevando a la activación de los hepatocitos y la salida de su estado de quiescencia (G_0) para entrar en ciclo celular (G_1). Inmediatamente después de la HP se induce la expresión de diferentes genes denominados genes tempranos [243, 255]. Los estudios de HP en cepas de ratón genoanulados para genes específicos han demostrado el papel y la importancia de diferentes moléculas señalizadoras, algunas de las cuales no son mitogénicas *per se*, pero contribuyen a la optimización del proceso regenerativo [249]. Aunque existen numerosos estudios en la literatura que muestran como la deficiencia de alguno de estos genes inhibe la regeneración hepática, sugiriendo la existencia de diferentes moléculas y vías que se encuentran activadas en la respuesta regenerativa, cada vez hay más evidencias que demuestran una gran redundancia entre las diferentes vías de señalización que contribuyen a este proceso [243]. A continuación se detallan los diferentes componentes de las vías de señalización que regulan la fase de activación.

A. Citoquinas.

El aumento de las citoquinas tras una HP, tanto en el hígado como a nivel sistémico en la circulación, evidencia la importancia de éstas para la activación del proceso regenerativo. La respuesta aguda mediada por citoquinas depende principalmente de los factores de transcripción NF- κ B (*Nuclear factor κ B*) y STAT3 que se encuentran inmediatamente activados tras una HP [243].

Una de las principales citoquinas reguladoras de la fase inicial aguda de la respuesta regenerativa es el factor de necrosis tumoral α (TNF α , *Tumor necrosis factor- α*). El incremento de expresión de TNF α se da inmediatamente después de la HP (30-120 minutos), particularmente en las células de Kupffer, a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B (*Nuclear factor κ B*) [257]. Aunque la ausencia de TNF α no produce alteraciones en la respuesta regenerativa, se ha demostrado que la

señalización de TNF α es necesaria para el proceso regenerativo mediante el uso de ratones deficientes para su receptor [258].

La secreción de TNF α por parte de las células de Kupffer activa la producción de Interleuquina-6 (IL-6) en este mismo tipo celular [259]. Se ha identificado que el tratamiento con IL-6 antes de la HP recupera la falta de síntesis de DNA que se da en los ratones deficientes para TNF α [260]. Aunque la secreción de IL-6 se ha descrito en células de Kupffer también se ha observado en líneas de hepatoma, demostrándose la capacidad de los hepatocitos para la producción de dicha citoquina [261]. IL-6 se une al receptor de IL-6 (IL-6R), receptor que comparte con otras citoquinas, activando complejos tirosina quinasas JAK que a su vez fosforilarán proteínas STAT, como STAT3, que se homo- o heterodimerizan [262] para translocar al núcleo y activar la expresión génica del 36% de los genes tempranos [248]. Los ratones genoanulados para IL-6 presentan una regeneración impedida que se caracteriza por un proceso necrótico y fallo hepático, reducción en la activación de STAT3 y síntesis de DNA [263]. Por otra parte, el ratón genoanulado de STAT3 es letal embrionario y en su variante de STAT3 suprimido específicamente en hígado se observa una incapacidad para la progresión en la fase S del ciclo celular [264]. Además, IL-6 activa Ras a través de JAK1 llevando a la activación de la vía de señalización de las MAPK Raf-MEK-ERK, que es crucial para la proliferación celular [265].

B. Factores de crecimiento.

A parte de la señalización mediada por citoquinas tras la HP, diversos factores de crecimiento actúan para promover la proliferación celular. Basándose en estudios, tanto *in vivo* como *in vitro* en hepatocitos aislados, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, *Hepatocyte growth factor*) ha sido identificado como uno de los más importantes [266].

La expresión de HGF aumenta en las células no parenquimales del hígado, así como en diversos tejidos extrahepáticos post-HP y los niveles en sangre aumentan considerablemente tras la HP [241]. El precursor de HGF (pro-HGF) es rápidamente activado por proteasas como la uroquinasa activadora de plasminógeno (uPA). El

bloqueo de uPA retrasa la aparición de HGF provocando una cinética de regeneración más tardía [248]. Además, la sobreexpresión de HGF en ratones transgénicos provoca un incremento de la proliferación de los hepatocitos y una rápida regeneración hepática [267].

El mitógeno HGF es el único ligando del receptor tirosina quinasa c-Met, y como consecuencia se observa una activación de este receptor tras la HP paralelamente al incremento de HGF [268]. Cabe destacar que los hepatocitos de ratones deficientes en el receptor c-Met presentan una entrada al ciclo celular deficiente provocando un retraso en la regeneración hepática [269]. En otro estudio, se ha detectado que la depleción de c-Met en el hígado provoca la muerte de la mayoría de los ratones a las 48 horas post-HP [266].

Otro mitógeno activador de la respuesta aguda del proceso de regeneración hepático es el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal Growth Factor*). EGF es ligando, entre otros como TGF α , del receptor de EGF (EGFR) [243]. Estos factores de crecimiento se encuentran incrementados tras la HP [241]. En ausencia de EGF, los hepatocitos muestran una proliferación retrasada, aunque solo de forma transitoria, probablemente debido a una compensación por parte de TGF α [270]. Y viceversa, al aumentar EGF, la proliferación se ve acelerada [271]. Sorprendentemente, el déficit de TGF α no afecta a la regeneración del hígado [272]. Por otra parte, ratones genoanulados para EGFR presentan una función hepática normal, sin embargo aproximadamente un tercio de los ratones mueren a las 36-48 horas post-HP y los que sobreviven muestran un retraso en la proliferación [273].

Ambos receptores de factores de crecimiento, c-Met y EGFR, son receptores tirosina quinasa que reclutan diferentes enzimas y proteínas de andamiaje para fosforilar dominios intracelulares de cada receptor. De esta manera, se ha descrito la fosforilación de EGFR en los primeros 60 minutos tras la HP [274]. A partir de aquí, se activan múltiples cascadas de señalización que regulan diversos factores de transcripción y vías de señalización metabólicas. Una de estas vías, con especial interés durante el proceso de regeneración hepática es la vía de MAPK Raf-MEK-ERK, que resulta en la activación por fosforilación de ERK1/2. Esta activación se correlaciona con la replicación del DNA en hepatocitos. Por otra parte, como ya se

ha comentado, aparte de los factores de crecimiento, citoquinas como TNF α y IL-6 también estimulan la actividad de ERK1/2 en cultivos primarios de hepatocitos [275, 276].

Por último, en el proceso de regeneración hepática pueden participar otros factores de crecimiento como los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF, *Fibroblast growth factor*) [277] y los factores de crecimiento vasculares epiteliales (VEGF, *Vascular epithelial growth factor*) [278].

C. Otros reguladores de la fase de activación.

También se ha descrito que la noradrenalina incrementa al cabo de 1 hora tras la HP [279]. Además, en cultivos primarios de hepatocitos amplifica las señales mitogénicas de EGF y HGF a través de su unión al receptor α 1 adrenérgico [280]. Por otro lado, estimula la secreción de EGF en la glándula de Brunner en el duodeno, incrementando los niveles de EGF a nivel hepático [281]. Por último, se ha descrito que antagonistas del receptor α 1 adrenérgico provocan una disminución de la síntesis de DNA a las 24 horas post-HP [279].

La insulina, el glucagón y la hormona tiroidea también se han visto implicadas en la regeneración hepática, siendo importantes para la señalización mitogénica que se da tras la HP actuando sinérgicamente con los factores de crecimiento anteriormente detallados [255, 282].

4.2.2 Proliferación celular:

La división celular es un proceso que raramente se da en hepatocitos de un individuo adulto sano, ya que estas células se encuentran en estado de quiescencia en la fase G₀ del ciclo celular [283]. Las vías de señalización de citoquinas de la fase de activación tras la HP provocan la transición de quiescencia a la entrada en el ciclo celular (G₀ a G₁) en los hepatocitos. A partir de entonces, la progresión en el ciclo celular es inducida por factores de transcripción.

El tiempo de replicación del DNA parece ser intrínseco de las propiedades de los hepatocitos. Este proceso se da a las 36-48 horas post-HP en ratón y entre 12-16

horas antes en rata. La síntesis de DNA en el resto de células hepáticas ocurre más tarde [255]. La máxima progresión mitótica en ratón se observa a las 48-72 horas [284]. Estudios en los que se trasplantaron hepatocitos tras una HP de rata en ratón demostraron que los hepatocitos de rata replicaban el DNA antes que los de ratón, resultando en un hígado quimérico [285]. Esto indica que el momento de replicación del DNA tras una HP es un proceso autónomo que es iniciado por señales intrínsecas [243].

Como ya se ha comentado, la síntesis de DNA se da de forma altamente sincronizada en los hepatocitos, con un 30% de la población que lo hace al mismo tiempo. La fase S empieza por las células que rodean la zona portal extendiéndose hasta la vena central. Por otra parte, el índice mitótico (fase M) es menor de lo previsible basándose en el número de hepatocitos que replican el DNA, viéndose aumentada la ploidía de los hepatocitos con los sucesivos ciclos de síntesis de DNA [286].

Por otra parte, se ha observado que los tiempos de regeneración correlacionan con los ritmos circadianos y se ha postulado que pueden estar controlando la proliferación tras la HP [287]. En este sentido se ha determinado que el pico de síntesis de DNA en ratón siempre se da a las 36 horas post-HP, independientemente del momento en que se realizara la cirugía. En cambio, la entrada de las células que habían replicado el DNA a mitosis siempre ocurría en el mismo momento del día, sugiriendo la existencia de un reloj que controla la transición G₂/M. Dicho regulador circadiano de la división celular podría ser WEE1, cuya expresión sigue el ciclo circadiano. WEE1 fosforila Cdc2 quinasa que regula la actividad del complejo Cdc2/Ciclina B1 implicado en la mitosis de los hepatocitos [288].

4.2.1 Terminación:

El proceso de regeneración termina tras el crecimiento hepático y la reestructuración del órgano. Al final de la regeneración, la masa hepática se ajusta a la preexistente antes de la HP [289]. En este sentido, se ha descrito la habilidad de los hepatocitos para entrar en apoptosis y seguramente corregir así el número celular adecuado [290].

Los supresores de las señales de citoquinas (SOCS) son importantes reguladores negativos que previenen la fosforilación de los factores de transcripción STAT al interactuar directamente con las proteínas JAK y evitar la activación. Así, se ha visto como el aumento de IL-6 en el hígado incrementa los niveles de SOCS3 y esto se ha correlacionando con una disminución de STAT3 fosforilado [291].

La mayoría de estudios sobre la terminación de la respuesta regenerativa se han centrado en TGF β 1, un conocido inhibidor de la proliferación en hepatocitos en cultivo [255, 292, 293]. La expresión aumenta a las 5 horas post-HP estabilizándose hasta las 72 horas [294]. Por alguna razón los hepatocitos se hacen resistentes a estos niveles de TGF β 1 y proliferan a pesar de ellos durante la regeneración hepática. TGF β 1 actúa activando SMAD que promueve la expresión de diversos genes. Las proteínas SNON y SKI son represoras transcripcionales de la vía TGF β 1/SMAD mediante la unión a SMAD y también se encuentran sobreexpresadas tras la HP, pudiendo explicar la resistencia de los hepatocitos a TGF β 1 durante la fase proliferativa [295]. En este sentido también se encuentra la proteína activina, de la familia de TGF β que también bloquea la mitogénesis. Durante la regeneración hepática la señalización de activina se encuentra reducida debido a la disminución de su receptor, pero este se reestablece una vez la masa hepática se ha recuperado [296].

4.3 Respuesta metabólica durante la regeneración hepática.

La regeneración hepática ha sido propuesta como un proceso que requiere de la activación mediante citoquinas y factores de crecimiento. Al mismo tiempo es necesaria una red de mecanismos metabólicos que conectan las funciones hepáticas con la proliferación y el crecimiento celular [243].

El hígado, al ser un órgano vital, debe seguir funcionando con normalidad al tiempo que transcurre la regeneración hepática. El estudio de cómo el hígado consigue llevar a cabo las funciones vitales durante la respuesta regenerativa es muy importante [248]. Aproximadamente, un tercio de los genes tempranos que se expresan durante la respuesta regenerativa están relacionados con la respuesta metabólica durante la regeneración hepática. Tanto los hepatocitos como las células no parenquimales expresan muchos de estos genes, aunque la mayoría de ellos están limitados a los hepatocitos [297-299].

Así, los roedores a los que se les realiza una HP, o están expuestos a sustancias hepatotóxicas, desarrollan alteraciones en su metabolismo de todo el organismo [127]. Estos cambios se inician con una marcada alteración de la glucemia sistémica, seguida de cambios en los niveles de metabolitos, en la circulación y en el hígado, y un proceso esteatótico, con la acumulación de TAG y otros lípidos neutros en los hepatocitos en forma de CL. A medida que el proceso de regeneración avanza las perturbaciones en el metabolismo hepático y sistémico vuelven a la normalidad [284]. Por ejemplo, la concentración de TAG en el hígado disminuye a medida que aumenta la proliferación hepática, así como se recuperan los niveles de glucosa en sangre y el peso corporal a medida que el índice hígado/masa corporal progresa [300, 301].

4.3.1 Metabolismo lipídico:

Los animales a los que se les realiza una HP experimentan una respuesta catabólica sistémica caracterizada por una reducción del tejido adiposo [301]. Esta depleción de grasas también se da en los modelos de regeneración hepática inducidos por hepatotoxinas [302].

Tras una resección hepática, las células del hígado remanente debe obtener suficiente energía para hacer frente a la elevada demanda metabólica de la inminente proliferación [303]. A partir de las 12 post-HP los hígados regenerantes desarrollan una elevada esteatosis transitoria [304].

Los lípidos acumulados en los CL también son necesarios para la síntesis de nuevas lipoproteínas, ácidos biliares y membranas [127]. Se ha descrito ampliamente en la literatura, aunque todavía no es completamente conocido, el mecanismo mediante el cual el hígado es capaz de generar señales que provocan la secreción de NEFA del tejido adiposo periférico, al tiempo que se promueve la lipogénesis en el hígado [305, 306]. Esto conlleva la rápida acumulación de TAG intracelulares en los hepatocitos remanentes [303, 307-309]. Los ratones con una disrupción específica hepática de la expresión de la sintasa de AG presentan una acumulación de CL comparable a los ratones salvajes tras la HP [310]. Esto apunta al tejido adiposo como la principal fuente de lípidos durante la regeneración hepática [307].

Los ratones con distrofia lipídica hepática, que presentan una mutación genética para Lipin1, muestran una menor liberación de NEFA en el tejido adiposo que provoca una menor acumulación de CL en el hígado tras la HP haciendo que la regeneración se encuentre impedida [301]. Otro ejemplo son los ratones genoanulados para caveolina-1, que no acumulan CL tras la HP de manera que no se lleva a cabo el proceso regenerativo. Los hígados de estos ratones no proliferan y muestran una mortalidad superior al 75% a las 72 horas post-HP [311].

Mientras se lleva a cabo el proceso esteatótico, la β -oxidación de AG es la fuente predominante de ATP en el hígado regenerante [307, 312]. Además, con la β -

oxidación aumenta la producción de cuerpos cetónicos, necesarios para hacer frente a las demandas energéticas del organismo.

Contrariamente a la observación de que la regeneración hepática está fisiológicamente relacionada con la esteatosis, existen diversas evidencias que muestran una inhibición del proceso regenerativo en modelos genéticos de acumulación de CL en el hígado, como en el caso de la obesidad. Por ejemplo, ratones *ob/ob* o *db/db*, presentan una mortalidad del 70% tras la HP y una regeneración defectuosa en aquellos que consiguen sobrevivir [313, 314]. Por otro lado, otros modelos nutricionales de esteatohepatitis, como las dietas deficientes en metionina y colina o las dietas de alto contenido en grasas, no alteran el proceso regenerativo [315, 316].

4.3.2 Metabolismo de la glucosa:

Durante las horas sucesivas a la HP, los animales experimentan una hipoglucemia significativa [300]. Esta disminución en la glucemia, en concordancia con el papel del hígado en el metabolismo glucídico, probablemente se deba a la considerable reducción de la masa hepática que conlleva una importante reducción de los depósitos de glucógeno, así como de los hepatocitos con capacidad gluconeogénica [284]. Además, los depósitos de glucógeno en el hígado remanente se agotan a las pocas horas tras la HP [317]. Por otra parte, la reducción de los niveles de glucosa en sangre provocan una disminución de los niveles de insulina y un incremento de los de glucagón [318]. La adaptación del hígado tras la HP, para hacer frente a esta hipoglucemia, incluye la inducción de la maquinaria gluconeogénica, así como la supresión de la glucólisis. Estos cambios pretenden evitar la bajada de glucosa en sangre a expensas de la producción de ATP [319]. Además, el glucagón, así como los glucocorticoides, activan la expresión de las enzimas gluconeogénicas esenciales como la G6Pasa y la PEPCK a través de la activación de PKA [228]. Esta respuesta adaptativa por parte del hígado permite al tejido remanente compensar y producir glucosa suficiente para hacer frente a los requerimientos de todo el organismo [320, 321].

Tras la HP, muchos de los genes tempranos que se activan en los hepatocitos están involucrados en la regulación de la respuesta gluconeogénica del hígado [248]. Entre los factores de transcripción que se inducen con la respuesta regenerativa y los que ya se expresan normalmente en el hígado [322, 323], se encuentra el factor de transcripción C/EBP implicado en la capacidad del hígado para mantener la producción de glucosa durante el daño hepático. Existen dos isoformas de este factor de transcripción, la α , que es antiproliferativa y disminuye durante la regeneración hepática y la β , que se encuentra sobreactivada promoviendo la proliferación y la homeostasis metabólica [324-326].

Se ha descrito que la hipoglucemia como consecuencia de la HP es necesaria y activa toda una red transcripcional para que se lleve a cabo el proceso regenerativo [307]. Modelos experimentales en los que se suplementa con dextrosa tras la HP han descrito una inhibición de la proliferación inducida tras la HP [300, 312].

4.2.1 Metabolismo de los aminoácidos:

Durante el proceso de regeneración, el hígado experimenta un aumento en la demanda de aminoácidos. Evidencias de este hecho se confirman en ratas mantenidas con dietas de alto contenido proteico a la que se les realiza una HP y que presentan un incremento en la actividad mitótica de hepatocitos [327]. De la misma forma, ratas mantenidas con dietas bajas en proteínas presentan una menor síntesis de DNA tras una HP comparado con ratas alimentadas con dietas estándar [328].

Tras la HP los niveles de aminoácidos gluconeogénicos, cetogénicos, ramificados y del ciclo de la urea aumentan en sangre y se utilizan en el hígado [284]. Muchos de estos aminoácidos, como los de cadena ramificada, son necesarios para la síntesis proteica y su suplementación se ha visto beneficiosa para el proceso regenerativo [329].

La disponibilidad de los aminoácidos en los hepatocitos viene determinada por los diferentes transportadores de la familia SCL. En este sentido se ha descrito un aumento del Sistema A de transporte de aminoácidos durante el proceso de regeneración hepática [221, 330, 331], así como con la activación de la GNG [203,

332], el control del volumen celular [333] y la entrada a ciclo celular [334]. El Sistema A transporta activamente pequeños aminoácidos neutros como alanina, glutamina y prolina de forma dependiente de Na^+ [335]. Estos transportadores se expresan en la mayoría de tejidos aunque alguno de ellos es especialmente abundante en el hígado. Se han descrito 3 transportadores diferentes del Sistema A, SNAT1 (SLC38A1 o ATA1), SNAT2 (SLC38A2 o ATA2) y SNAT4 (SLC38A4 o ATA3). SNAT1 se expresa específicamente en la placenta y el cerebro mientras que, SNAT2 se expresa ubicuamente en los tejidos de mamífero y SNAT4, aunque se encuentra ampliamente [220] es muy abundante en hígado [335]. De entre todos estos transportadores, SNAT2 es el mejor caracterizado hasta el momento [336].

Los flujos de transporte de aminoácidos entre órganos vienen determinados por las hormonas insulina y glucagón. La insulina inhibe el flujo de aminoácidos del músculo a la circulación sanguínea con la disminución de la proteólisis y activa la captación de aminoácidos [337]. Se ha descrito que la insulina promueve rápidamente la translocación de los transportadores del Sistema A desde compartimentos endosomales a la membrana plasmática en el músculo esquelético [338].

Por otra parte, en adipocitos la captación bajo condiciones fisiológicas de pequeños aminoácidos gluconeogénicos neutros, como la glutamina y la alanina también se lleva a cabo a través del Sistema A [339]. El estudio de SNAT2 en adipocitos ha mostrado que la insulina acelera la translocación del transportador desde el Golgi hasta la membrana plasmática. Esta translocación se lleva a cabo mediante transporte vesicular y depende básicamente de la señalización de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la reorganización de los filamentos de actina [336].

En cambio, en el hígado es el glucagón el encargado de la activación del Sistema A [340, 341] vía cAMP [342], de la misma forma que se encarga de la activación de la GNG [343]. Tras una HP, el transportador SNAT2 se transloca de compartimentos subcelulares a la membrana plasmática [331] [344]. Igual que ocurre durante el ayuno, tras la HP, la demanda de sustratos gluconeogénicos

aumenta, de manera que el hígado requiere del aporte de alanina, uno de los principales sustratos gluconeogénicos, junto con glutamina [182]. Así, la translocación de los transportadores del Sistema A a la membrana plasmática es necesaria para mantener la homeostasis de glucosa durante el proceso de regeneración hepático [331]. Además, la administración de MeAIB, sustrato competidor inhibitorio de este sistema, es capaz de inhibir la proliferación de los hepatocitos tras la HP [221].



OBJETIVOS

AnxA6, miembro de una familia de proteínas altamente conservadas de unión a fosfolípidos de membrana de forma dependiente de calcio, está implicada en diferentes procesos celulares como la endocitosis y exocitosis, la regulación de la homeostasis intracelular de colesterol y la señalización celular. Además, AnxA6 es una de las proteínas más abundantes en el hígado, representando el 0.25% del total de proteína en este órgano. El hígado es un órgano imprescindible para el funcionamiento de todo el organismo llevando a cabo procesos básicos como la regulación del metabolismo lipídico y glucídico, la homeostasis del colesterol y la detoxificación de diferentes sustancias. En esta tesis nos proponemos estudiar la función de AnxA6 en este órgano.

Para el estudio del hígado y el papel de la AnxA6 en éste se analizará el proceso de regeneración hepática, ampliamente utilizado como modelo de proliferación *in vivo* en roedores. La regeneración hepática se da en respuesta a un estrés agudo que implica una activación proliferativa por parte de los hepatocitos y otras células hepáticas. Al mismo tiempo el hígado activa diferentes mecanismos metabólicos para hacer frente a la elevada demanda energética derivada de la división celular y para garantizar la homeostasis en el organismo.

Concretamente, los objetivos propuestos en esta tesis son:

1. Caracterizar la arquitectura y funcionalidad hepática de los ratones deficientes para AnxA6.
2. Determinar el papel de AnxA6 durante el proceso de regeneración hepática inducido por la hepatectomía parcial.
3. Estudiar el metabolismo hepático durante la respuesta regenerativa hepática y durante un periodo de ayuno, en ausencia de AnxA6.

RESULTADOS

1. Caracterización de la estructura y función hepática de los ratones $AnxA6^{-/-}$.

Inicialmente, se procedió al estudio de la arquitectura del hígado en líneas de ratón C57/Bl6, WT y $AnxA6^{-/-}$. Se realizaron cortes histológicos para la tinción de hematoxilina/eosina (H/E) de los hígados de ambos genotipos incluidos en parafina. Las imágenes de microscopía de campo claro muestran una arquitectura hepática en los ratones $AnxA6^{-/-}$, comparable con el control WT. En estas secciones, se puede observar la estructura del hígado con una zona periportal representativa, compuesta por la vena porta (VP), la arteria hepática (AH) y el conducto biliar (CB) (Figura 1A).

Para analizar el tejido a más detalle se realizó una fijación por perfusión de ratones WT y $AnxA6^{-/-}$ (en 2.5% de glutaraldehído) para el posterior procesamiento y análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Se hicieron cortes semifinos de estas muestras y se tiñeron con azul de metileno. En las imágenes de microscopía de campo claro de estas secciones se observan hepatocitos a más detalle (Figura 1B). Además, las imágenes representativas de MET muestran un hepatocito $AnxA6^{-/-}$ donde se puede apreciar una morfología comparable a la muestra WT (Figura 1C).

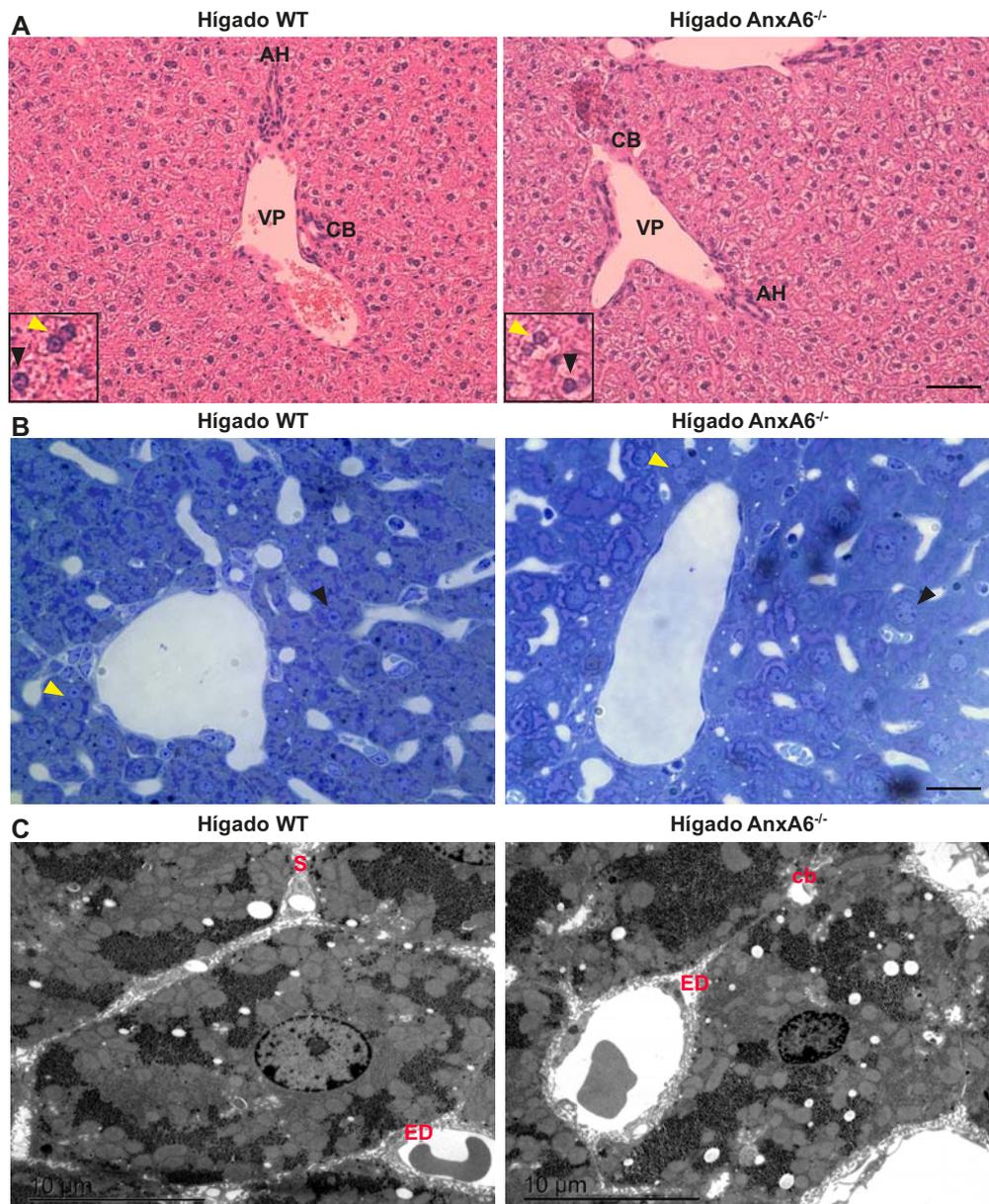


Figura 1. Estudio estructural de los hígados de ratones WT y $Anx6^{-/-}$ en condiciones estándar.

(A) Imágenes representativas de microscopía de campo claro de cortes histológicos de tejido hepático de ratones WT y $Anx6^{-/-}$ incluidos en parafina y teñidos con H/E. Se pueden observar las zonas periportales compuestas por la vena porta (VP), la arteria hepática (AH) y el conducto biliar (CB). La ampliación del cuadro inferior izquierdo muestra el detalle de un hepatocito mononucleado (flecha negra) y uno binucleado (flecha amarilla). Barra, 60 μ m. (B) Imágenes representativas de microscopía de campo claro de cortes semifinos de hígados teñidos con azul de metileno. Se marcan también un hepatocito mononucleado (flecha negra) y binucleado (flecha amarilla). Barra, 20 μ m. (C) Detalle de un

hepatocito analizado mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). En las imágenes se marcan los sinusoides (S), el canalículo biliar (cb) y el Espacio de Disse (ED). Barra, 10 μ m.

Con el fin de analizar la función hepática de estos ratones, se cuantificaron diferentes marcadores en plasma sanguíneo como las transaminasas alanina aminotransferasa (ALAT) y aspartato aminotransferasa (AST), la lactato deshidrogenasa (LDH), la albúmina y la concentración de total de proteína (Figura 2A, 2B, 2C, 2D y 2E, respectivamente).

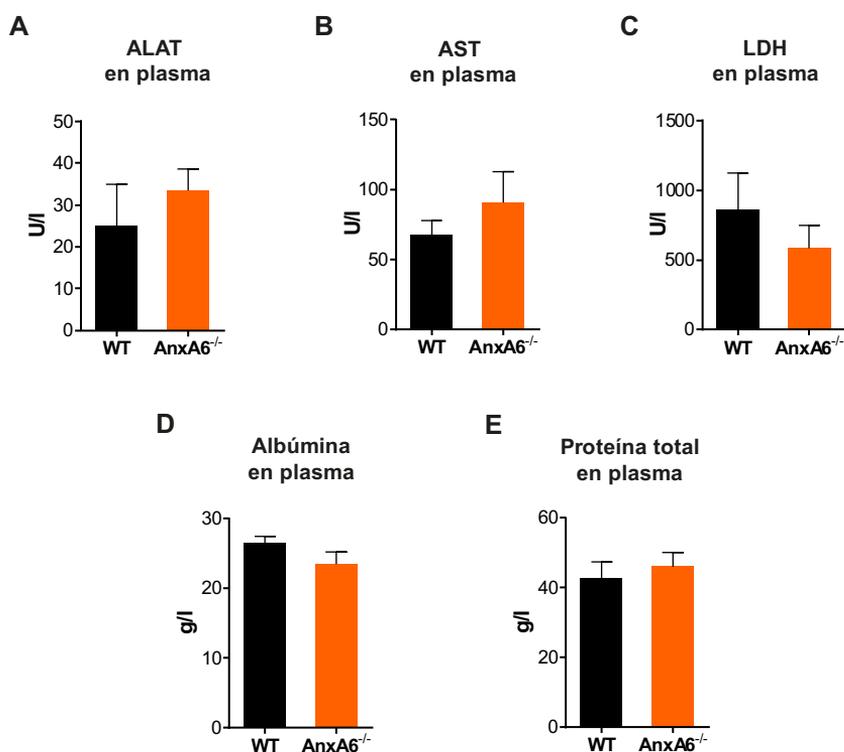


Figura 2. Estudio de la funcionalidad hepática de ratones WT y AnxA6^{-/-} a partir de marcadores sanguíneos en condiciones estándar.

Niveles séricos de diferentes marcadores de función hepática a partir del plasma obtenido por punción cardíaca de ratones WT y AnxA6^{-/-}. Concentraciones de transaminasas (A) alanina aminotransferasa (ALAT) (U/l), (B) aspartato aminotransferasa (AST) (U/l), (C) de lactato deshidrogenasa (LDH) (U/l), (D) albúmina (g/l) y (E) proteína total (g/l) (n= 4 por genotipo).

Todos estos marcadores se encuentran en concentraciones consideradas estándar para la cepa de ratón C57/Bl6 [345], en concordancia con lo descrito por el grupo del Dr. Steven E. Moss [106]. La bilirrubina, otro marcador ampliamente cuantificado como indicador de lesión, daño o anomalía hepática, tampoco se encuentra alterada en plasma con niveles por debajo de la sensibilidad de la técnica. Con ello se concluyó que en ausencia de AnxA6 la función hepática basada en los marcadores clásicos se encuentra preservada.

Tal como se ha introducido anteriormente, una de las principales funciones del hígado consiste en la regulación del metabolismo lipídico. A su vez, AnxA6 está implicada en la homeostasis intracelular de colesterol. Por esta razón, se llevaron a cabo estudios de lipidómica para la cuantificación de colesterol libre y ésteres de colesterol (EC) mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*) en el laboratorio de la Prof. Katharina Gaus (*Center of Vascular Research*, UNSW, Australia). Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en el colesterol libre (Figura 3A) con valores de 881.2 ± 50.6 nmol/mg y 1011 ± 102.1 nmol/mg para los hígados de ratones WT y AnxA6^{-/-}, respectivamente. En cambio, se observó un aumento significativo del 71.6% en EC en los hígados de ratones AnxA6^{-/-} (Figura 3B), concretamente dado por el mayor incremento de las especies esterificadas con linoleato, oleato y palmitato (Figura 3C).

Al mismo tiempo, se procedió a la caracterización de esfingomielina y diferentes especies de fosfolípidos en hígados de ratones AnxA6^{-/-} respecto los ratones WT mediante espectrometría de masas. En estos análisis no se observaron diferencias significativas (Figura 3D).

Para dilucidar estas mínimas diferencias en la lipidómica hepática, que aparentemente parecen no afectar las funciones esenciales del hígado y, teniendo en cuenta que los EC son lípidos neutros que se encuentran almacenados en los cuerpos lipídicos (CL), juntamente con triacilglicéridos (TAG) [145], se analizó la cantidad de TAG en los homogenados de hígado de ratón (Figura 3E). La cuantificación demostró que éstos se encuentran en concentraciones alrededor de los 100 mg/dl sin diferencias significativas en ausencia de AnxA6.

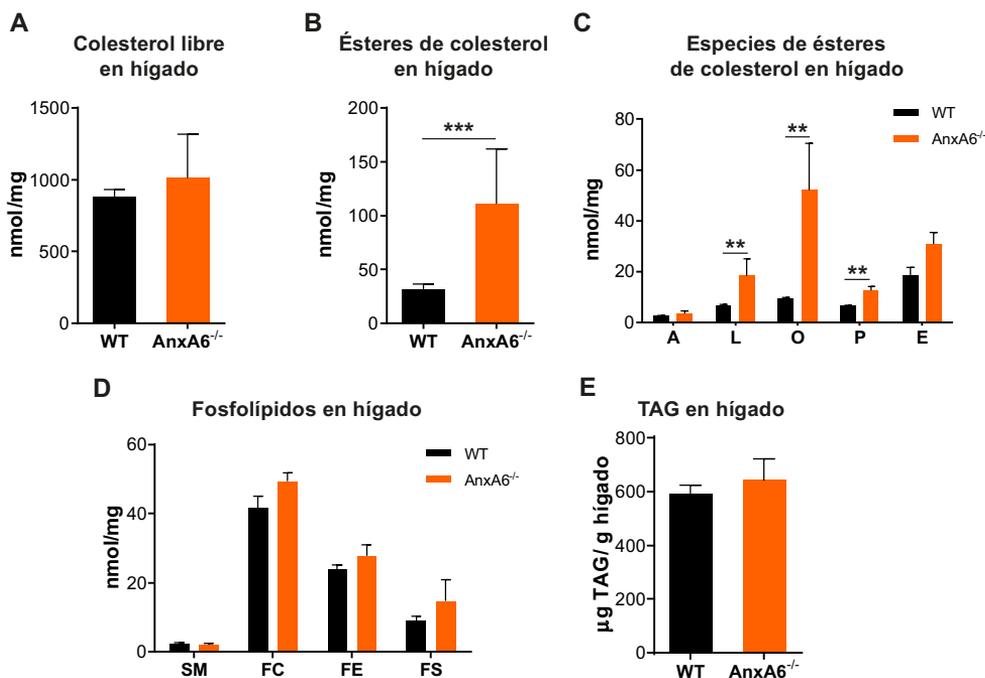


Figura 3. Estudio lipídico hepático de ratones WT y AnxA6^{-/-} en condiciones estándar.

Determinación lipídica por HPLC en hígado de ratón WT y AnxA6^{-/-} de (A) colesterol libre (nmol/mg), (B) ésteres de colesterol (nmol/mg) y (C) especies de ésteres de colesterol (nmol/mg) (n= 3 por genotipo). Cada especie corresponde al ácido graso esterificado en el colesterol. A: ácido araquidónico; L: linoleato; O: oleato; P: palmitato; E: ácido esteárico (n= 3 por genotipo). (D) Cuantificación de fosfolípidos positivos (nmol/mg) en homogenado de hígado de ratón. SM: esfingomielina; FC: fosfatidilcolina; FE: fosfatidiletanolamina; FS: fosfatidilserina (n= 3 por genotipo). (E) TAG (µg TAG por g de hígado) en homogenado de hígado (n= 12-13 por genotipo).

Por otra parte, se analizaron los niveles de colesterol libre, ácidos grasos libres (AG libres) y TAG en plasma para determinar si estas diferencias lipídicas correspondientes a la cantidad de EC se debían a un incremento en la movilización de lípidos a nivel sistémico. No se encontraron diferencias en las concentraciones plasmáticas de estos marcadores para ambos genotipos, con niveles de 70-80 mg/dl para colesterol libre, aproximadamente 70 mg/dl de TAG y 1500 U/l para AG libres (Figura 4A, 4B y 4C, respectivamente). También se determinaron las concentraciones en plasma, en los ratones WT y AnxA6^{-/-}, de HDL con niveles de 37.5 y 35.5 mg/dl, respectivamente (Figura 4D) y de LDL a una concentración de entre 30.5 mg/dl en ratones WT y 24.5 mg/ml en AnxA6^{-/-} (Figura 4E).

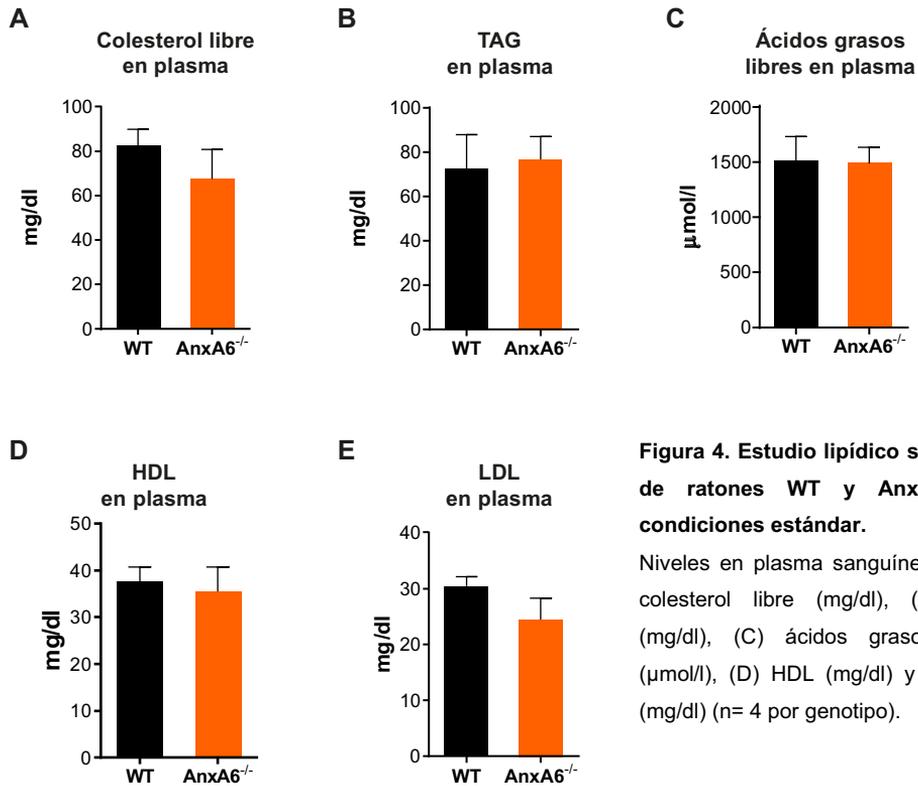


Figura 4. Estudio lipídico sistémico de ratones WT y AnxA6^{-/-} en condiciones estándar.

Niveles en plasma sanguíneo de (A) colesterol libre (mg/dl), (B) TAG (mg/dl), (C) ácidos grasos libres (µmol/l), (D) HDL (mg/dl) y (E) LDL (mg/dl) (n= 4 por genotipo).

El estudio comparativo de los hígados de los ratones WT y AnxA6^{-/-} mostró que, en ausencia de AnxA6, este órgano es estructural y funcionalmente normal, a excepción del contenido en EC, sin un aumento significativo de TAG.

2. Análisis de la regeneración hepática en ratones AnxA6^{-/-}.

En condiciones estándar de estabulación (dieta de mantenimiento y agua *ad libitum*), los ratones AnxA6^{-/-} muestran una función hepática comparable a los ratones control. AnxA6 es una proteína muy abundante en hígado [67] y, dado que el hígado es el único órgano capaz de regular su tamaño [237], se determinó el papel de AnxA6 en éste mediante la inducción de un proceso de regeneración hepática. La regeneración hepática consiste en un estrés agudo, metabólico y proliferativo. En esta tesis, la respuesta regenerativa se indujo a través de la resección de la masa hepática mediante una hepatectomía parcial de 2/3 siguiendo el método de Higgins y Anderson [250].

En primer lugar, se realizó un estudio de supervivencia después de la hepatectomía parcial (HP) en presencia o ausencia de AnxA6. La baja supervivencia a los 4 días post-cirugía de los ratones AnxA6^{-/-} (18.5±7.5%) en comparación con los ratones WT (90±6.4%) sugiere la implicación de esta proteína en el proceso de regeneración hepática (Figura 5A). Cabe destacar que la supervivencia de los ratones AnxA6^{-/-} se ve reducida a un 48.14±9.6 a las 48 horas post-HP. La recuperación de la masa hepática correspondiente al 5% del peso corporal total se calculó mediante el índice de regeneración hepática a diferentes tiempos post-HP. Como se muestra en la Figura 5B, los ratones WT recuperan la masa hepática inicial tal como está descrito [240]. En el caso de los ratones AnxA6^{-/-} solo un 18% sobreviven y, únicamente en este caso los animales son capaces de recuperar la masa hepática inicial.

Durante el estudio de supervivencia y como marcador de recuperación post-cirugía se realizó un registro de la pérdida de peso corporal (Figura 5C). Se observa una disminución durante los 3 primeros días en ambos genotipos, que se normaliza hasta los niveles iniciales en los ratones WT. En los ratones AnxA6^{-/-} la disminución de peso corporal se prolonga hasta los 5 días, a partir de los cuales, la pequeña proporción de ratones que sobreviven consiguen recuperar el peso anterior a la HP.

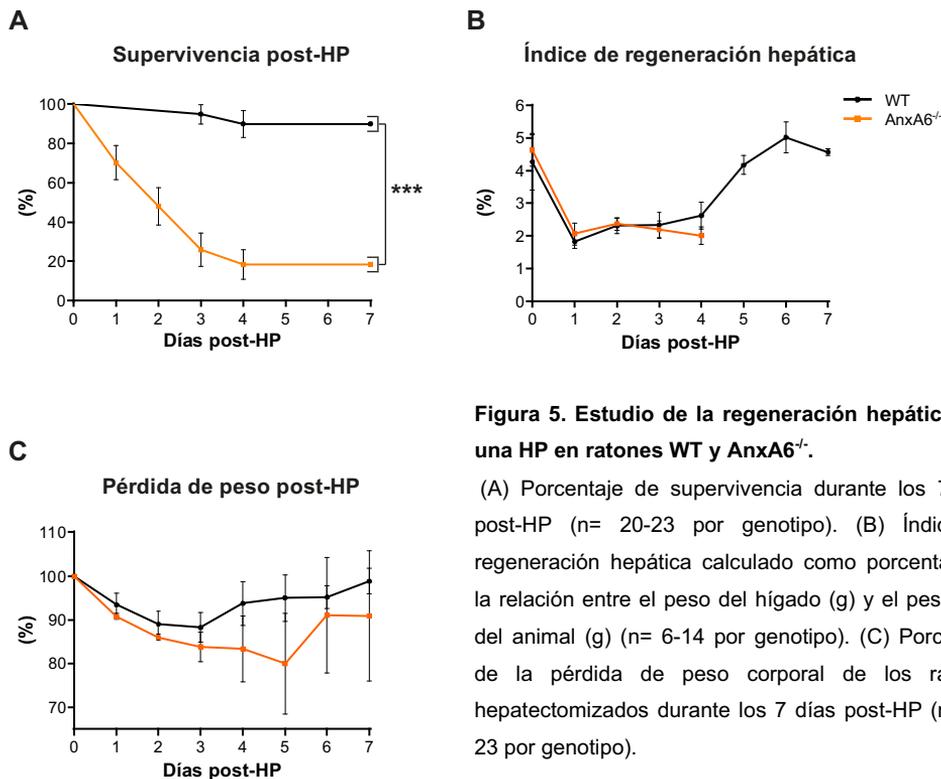


Figura 5. Estudio de la regeneración hepática tras una HP en ratones WT y *AnxA6*^{-/-}.

(A) Porcentaje de supervivencia durante los 7 días post-HP (n= 20-23 por genotipo). (B) Índice de regeneración hepática calculado como porcentaje de la relación entre el peso del hígado (g) y el peso total del animal (g) (n= 6-14 por genotipo). (C) Porcentaje de la pérdida de peso corporal de los ratones hepatectomizados durante los 7 días post-HP (n= 20-23 por genotipo).

A partir de aquí y teniendo en cuenta que la supervivencia de los ratones *AnxA6*^{-/-} es menor al 50% a las 48 horas post-HP, se realizó la caracterización del proceso de regeneración hepática hasta este punto.

Tal como se realizó en el estudio de la funcionalidad del hígado, se cuantificaron los niveles plasmáticos de los distintos marcadores de daño hepático tras la HP de 2/3 [346], como las transaminasas ALAT y AST, bilirrubina, LDH, albúmina y niveles totales de proteína. Como se puede observar en la Figura 6A y 6B, en ambas cepas se da un aumento pronunciado de las transaminasas durante las primeras 36 horas post-HP, con niveles que acaban retornando a los valores iniciales en los ratones WT a diferencia de los *AnxA6*^{-/-} que se mantienen elevados. Para los otros marcadores como LDH, bilirrubina, albúmina y proteínas en sangre se da un aumento en las horas que siguen a la HP en ambos genotipos (Figura 6C, 6D, 6E y 6F, respectivamente).

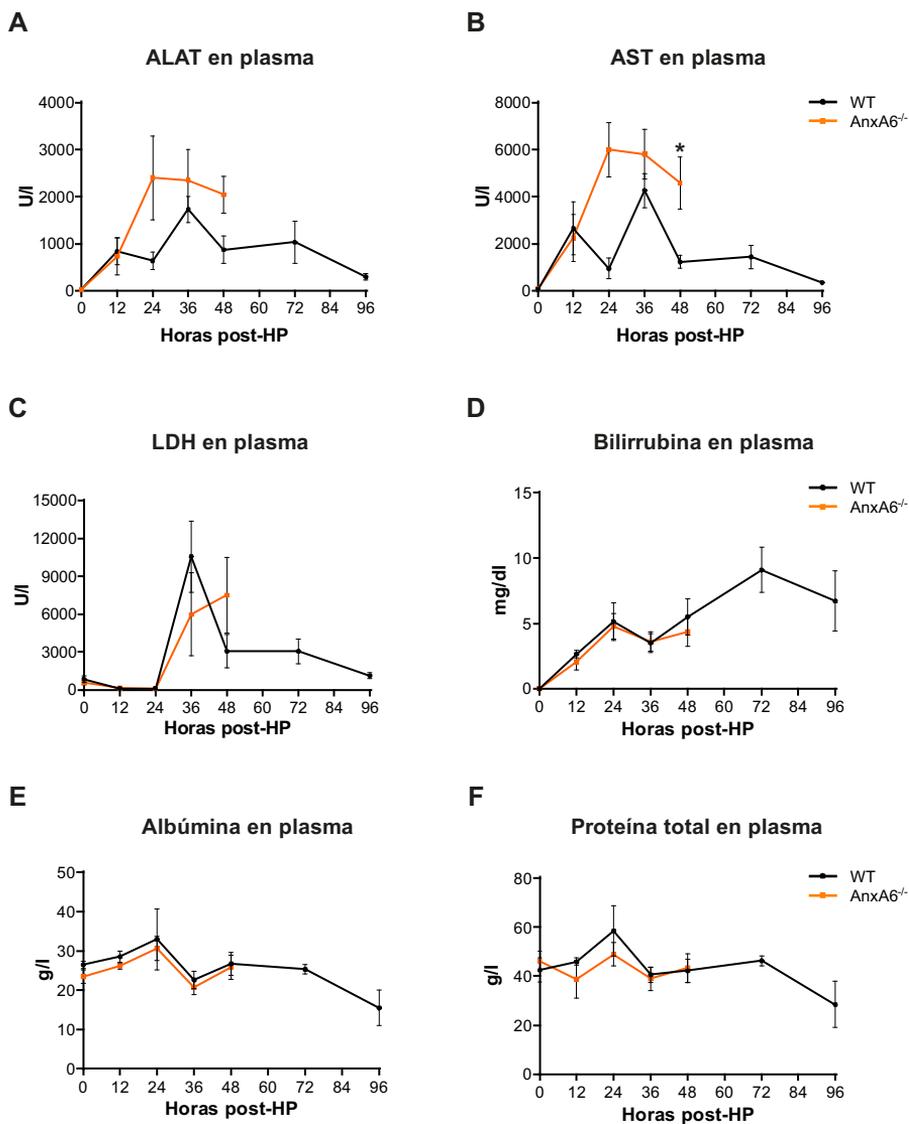


Figura 6. Estudio de la funcionalidad hepática en ratones WT y AnxA6^{-/-} a partir de marcadores sanguíneos tras la hepatectomía parcial.

Niveles séricos de diferentes marcadores de función hepática a partir del plasma obtenido por punción cardíaca de ratones WT y AnxA6^{-/-} a los diferentes tiempos post-HP. Concentraciones de (A) ALAT (U/l), (B) AST (U/l), (C) LDH (U/l), (D) bilirrubina (mg/dl), (E) albúmina (g/l) y (F) proteínas (g/l) (n= 4-12 por genotipo).

3. Estudio de las fases de regeneración hepática.

Como se ha visto hasta el momento, tras la HP, y en ausencia de AnxA6, hay una elevada mortalidad en los ratones, indicando la importancia de AnxA6 en el proceso de regeneración hepática. A partir de aquí, se procedió al estudio de dicho proceso en ausencia de AnxA6, analizando la respuesta de la fase de activación, llevada a cabo por citoquinas y factores de crecimiento, la progresión en el ciclo celular, y por último, la repuesta metabólica llevada a cabo a nivel hepático y sistémico. Todas estas señales y procesos, algunos de ellos iniciados a los pocos minutos de la resección, promueven la recuperación de la masa hepática inicial, la arquitectura y la función. [243, 255].

3.1 Fase de activación.

Existen diferentes citoquinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF α , *Tumor necrosis factor α*), que incrementa su expresión y secreción a los 30-120 minutos tras la HP por parte de las células de Kupffer [257]. TNF α , a su vez activa la producción de IL-6. IL-6 activa la cascada de señalización JAK/STAT que fosforila STAT3 para translocarse al núcleo y activar la expresión de diversos genes. Así, analizamos la expresión relativa de TNF α e IL-6 en homogenado de hígado de ratón mediante PCR cuantitativa. El análisis de la expresión de TNF α en hígado a las 6 horas post-HP reveló un 59.3% menos de expresión relativa en ausencia de AnxA6 en comparación con los ratones WT (Figura 7A). La expresión relativa de mRNA de IL-6 en los hígados de ratones AnxA6^{-/-} a las 6 horas post-HP también muestra una reducción significativa de un 53.6% (Figura 7B).

Tras la HP también se ha descrito un aumento de los niveles de factores de crecimiento, que promueven y regulan la proliferación. Uno de ellos es el factor de crecimiento hepático (HGF, *Hepatocyte growth factor*). Éste es el único ligando del receptor tirosina quinasa c-Met y como consecuencia se observa una activación del receptor al realizar la HP. Por otra parte, otro mitógeno activador de la respuesta aguda del proceso de regeneración hepático es el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal Growth Factor*). EGF es ligando, entre otros, del receptor de EGF (EGFR) [243].

Ambos receptores, c-Met y EGFR, son receptores tirosina quinasa que reclutan diferentes enzimas y proteínas de andamiaje para fosforilar dominios intracelulares de cada receptor. A partir de ahí, se activan múltiples cascadas de señalización, como la vía de Ras/MAPK (*Mitogen activated protein kinase*) que resulta en la activación de ERK1/2 [243].

Para el estudio de esta vía se procedió al tratamiento de hepatocitos aislados de ratones WT y AnxA6^{-/-} con HGF y EGF. Posteriormente, se analizaron mediante inmunodetección los niveles de proteína total y fosforilación de la proteína efectora ERK1/2. Tanto en hepatocitos WT como AnxA6^{-/-} se observa una activación de las vías a los 10 minutos de ambos tratamientos (Figura 7C y 7D respectivamente). Sin embargo, tras la incubación con EGF dicha activación se mantiene hasta los 30 minutos en los hepatocitos aislados WT mientras que en ausencia de AnxA6 se prolonga al menos hasta 60 minutos (Figura 7D y cuantificación en 7E). Por otra parte, la expresión relativa de c-Met a las 6 horas post-HP en hígado no se encuentra modificada respecto el basal antes de la HP en ambos genotipos (Figura 7F).

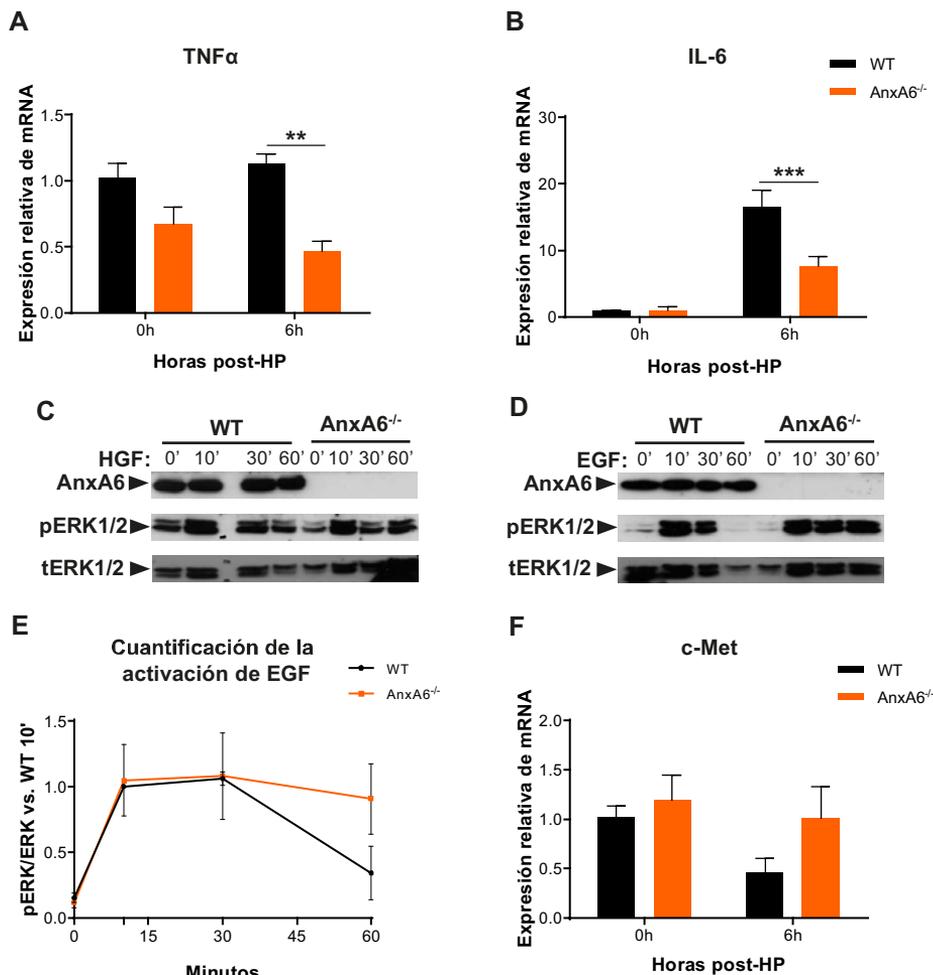


Figura 7. Estudio de la fase de activación post-HP en ratones WT y AnxA6^{-/-}. Citoquinas y factores de crecimiento.

Expresión relativa de mRNA por PCR cuantitativa de homogenado de hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-} de (A) TNF α , (B) IL-6 (n= 3 por genotipo). (C y D) Inmunodetección de AnxA6, fosfo-ERK1/2 (pERK1/2) y total-ERK1/2 (tERK1/2) de lisados de hepatocitos aislados de ratones WT y AnxA6^{-/-} tratados durante los tiempos indicados (0, 10, 30 y 60 minutos) con HGF (20 ng/ml) y EGF (30 ng/ml) (n=2-3 por línea de hepatocitos primarios). (E) Cuantificación de pERK2/ERK1/2 versus WT a los 10 minutos para el tratamiento de EGF (F) Expresión relativa de mRNA de c-Met mediante PCR cuantitativa (n= 3 por genotipo).

Por último, la activación de estas vías de señalización acaba resultando en un incremento en la expresión de diferentes genes tempranos necesarios para el proceso regenerativo, como cMyc, cFos y cJun, en el hígado a las 6 horas post-HP,

los cuales fueron también analizados por PCR cuantitativa. No se vieron diferencias significativas en la expresión de estos factores de transcripción entre los genotipos WT y *AnxA6*^{-/-} (Figura 8A, 8B y 8C).

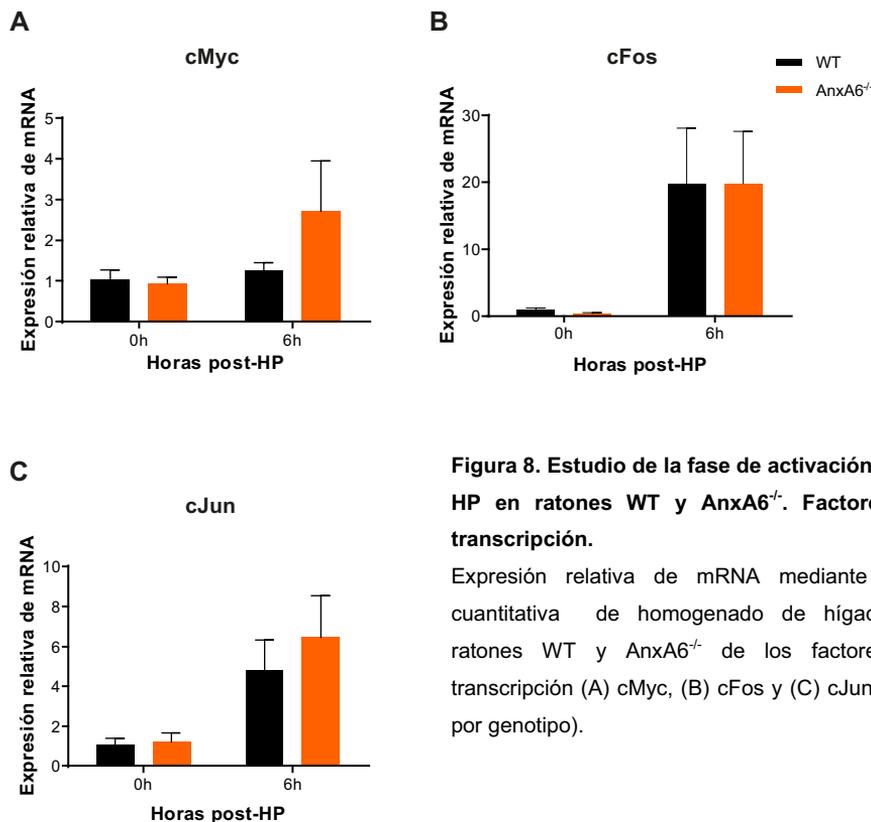


Figura 8. Estudio de la fase de activación post-HP en ratones WT y *AnxA6*^{-/-}. Factores de transcripción.

Expresión relativa de mRNA mediante PCR cuantitativa de homogenado de hígado de ratones WT y *AnxA6*^{-/-} de los factores de transcripción (A) cMyc, (B) cFos y (C) cJun (n= 3 por genotipo).

Los resultados del estudio de la fase de activación muestran una deficiencia en la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-6. Por otra parte, las vías que implican factores de crecimiento, como EGF, presentan una cinética de activación prolongada en el caso de los hepatocitos aislados de ratones *AnxA6*^{-/-}. Sin embargo, la expresión relativa de los genes tempranos no se vio alterada en ausencia de *AnxA6*.

3.2 Proliferación celular.

Tras una HP se inicia la fase pre-replicativa con la transición de los hepatocitos quiescentes (G_0) y la activación de genes tempranos (G_1), que culmina con la síntesis de DNA (Fase S). Principalmente la replicación y posterior proliferación se lleva a cabo en hepatocitos, aunque también otros tipos celulares hepáticos están implicados [241], con un pico máximo de síntesis de DNA descrito a las 36-48 horas, que varía según la cepa de ratón e incluso la edad del animal. La mitosis de los hepatocitos consecuente a la fase de replicación se da entre 6-10 horas después.

El 95% de los hepatocitos realiza entre 1-2 ciclos de replicación, aunque solo un 30% lo hace al mismo tiempo de forma altamente sincronica, avanzando desde la zona periportal hasta la zona pericentral de los lóbulos hepáticos como “olas de mitosis” [347]. Los hepatocitos situados alrededor de la vena central son los últimos en entrar en mitosis [348].

Para analizar si el defecto de regeneración en los hígados $AnxA6^{-/-}$ es debido a alteraciones en el ciclo celular, se analizó la entrada de los hepatocitos a la fase S del ciclo celular en que se lleva a cabo la replicación de DNA. Para ello se realizó el estudio inmunohistoquímico, en secciones de parafina de hígado de ratones WT y $AnxA6^{-/-}$, del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, *Proliferating cell nuclear antigen*). Esta proteína es un marcador de ciclo celular, que incrementa su expresión durante la fase S [349]. No se detectaron diferencias cuantitativas en el marcaje de las inmunohistoquímicas de PCNA para los cortes histológicos de hígado de ratón WT en comparación con los $AnxA6^{-/-}$ como se puede observar en las imágenes representativas y la cuantificación a las 48 horas post-HP (Figura 9A y 9B).

El estudio de replicación de DNA se llevó a cabo también mediante la administración de $1 \mu\text{Ci/g}$ de [^3H]-timidina intraperitonealmente 2 horas antes del tiempo post-HP a analizar (0, 12, 24, 36, 48, 72 horas). La incorporación de [^3H]-timidina al DNA demuestra que tras la HP y en ausencia de $AnxA6$ los ratones replican el DNA con la misma cinética que los ratones WT, con un pico de máxima síntesis de DNA a las 48 horas (Figura 9C).

En los cortes histológicos de hígado de ratón WT y AnxA6^{-/-} teñidos con H/E para los diferentes puntos de estudio post-HP (0, 12, 24, 36, 48 horas para los dos genotipos; 72 y 96 horas para los ratones WT) se cuantificaron las mitosis de 4 áreas por cada sección (Índice mitótico). El conteo demostró una reducción significativa de hepatocitos mitóticos en el hígado de los ratones AnxA6^{-/-} a las 48 horas post-HP (Figura 9D y 9E).

Con estos resultados queda demostrada la entrada y la progresión en ciclo celular, al menos hasta fase S, tras la HP en el hígado de ratón AnxA6^{-/-}.

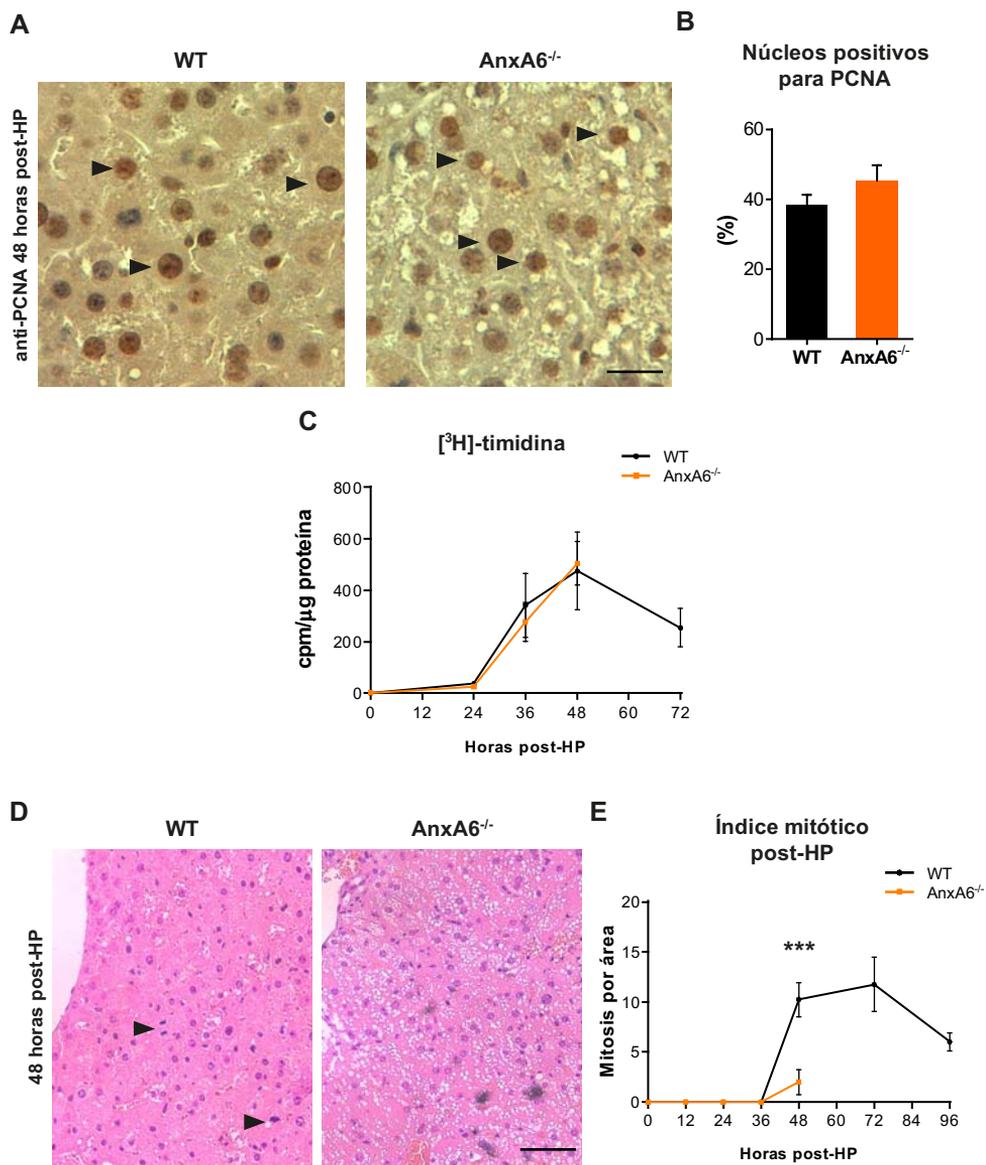


Figura 9. Estudio de la progresión en el ciclo celular en ratones WT y AnxA6^{-/-} post-HP.

(A) Imágenes representativas de microscopía de campo claro de inmunohistoquímica de PCNA para ambos genotipos. Las flechas negras muestran núcleos marcados. Barra, 20 μm. (B) Porcentaje de núcleos positivos marcados por inmunohistoquímica de PCNA en muestras de hígados de ratones WT y AnxA6^{-/-} incluidos en parafina a las 48h post-HP. El conteo se realizó por doble ciego de 4 por muestra (n= 7 por genotipo). (C) Incorporación de [³H]-timidina (cpm) correspondiente a la incorporación de ésta al DNA a los diferentes tiempos post-HP. (n= 4-13 por genotipo). (D) Imágenes representativas de

microscopía de campo claro de las secciones cuantificadas para mitosis a las 48 horas post-HP. Barra, 60 μm . (E) Cuantificación del índice mitótico por área en secciones de hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-} incluidos en parafina a los diferentes tiempos post-HP y teñidos con H/E. El conteo se realizó en 4 áreas por muestra (n= 4 por genotipo).

3.3 Respuesta metabólica.

El hígado, entre sus múltiples funciones, juega un papel esencial en la regulación del metabolismo sistémico encargándose del aporte extrahepático de energía [307]. Paralelamente a la respuesta inicial de fase aguda, durante la regeneración hepática en respuesta a la hepatectomía parcial, se desencadenan una serie de adaptaciones metabólicas tanto a nivel sistémico como hepático con la alteración del metabolismo lipídico y la homeostasis de glucosa [307]. Estas respuestas se caracterizan por una marcada hipoglucemia post-HP [284], así como por una gran acumulación de CL (esteatosis) en los hepatocitos [149]. De esta forma, se procedió a la caracterización de ambos procesos durante la respuesta regenerativa hepática en ausencia de AnxA6.

3.3.1 Esteatosis hepática post-HP:

Se ha sugerido que la esteatosis observada post-HP deriva de la necesidad de los hepatocitos para adquirir y almacenar la energía necesaria para hacer frente a la demanda metabólica en preparación a la activación proliferativa [149]. Tras una HP y ante una respuesta regenerativa, se producen diferentes señales que estimulan la secreción de AG por parte del tejido adiposo periférico aumentando así la captación de estos en el hígado. Al mismo tiempo se promueve la lipogénesis hepática conllevando a una rápida acumulación intracelular en los hepatocitos de TAG, AG libres y ésteres de colesterol en cuerpos lipídicos (CL) [127, 149]. Se ha demostrado que los CL son necesarios para el proceso de regeneración, ya que los lípidos almacenados son la fuente energética necesaria para llevar a cabo la proliferación de los hepatocitos, así como para la formación de nuevas membranas, producción de sales biliares y lipoproteínas [127, 308].

Para analizar las posibles causas en el fallo del proceso regenerativo en los ratones AnxA6^{-/-}, se determinó el nivel de esteatosis de los ratones WT respecto los

AnxA6^{-/-} a partir de diferentes secciones histológicas teñidas con H/E a diferentes tiempos post-HP (0, 12, 24, 36, 48 horas para los dos genotipos; 72 y 96 horas para los ratones WT). Para cada una de las muestras (4 áreas por muestra) se asignaron valores cualitativos, del 0 al 5, según el grado de acumulación de esteatosis observada en los cortes histológicos. Con ello se pudo observar cómo a las 12 horas post-HP los ratones WT incrementan su contenido en CL mientras que los ratones AnxA6^{-/-} acumulan significativamente menos. Además, se observó un máximo de acumulación de CL en los ratones WT a las 24 horas post-HP mientras que en ausencia de AnxA6 se retrasa hasta las 36 horas (Figura 10A y 10B). Estos resultados sugieren que, si bien en ausencia de AnxA6 se lleva a cabo el proceso esteatótico, la acumulación máxima de CL se da a tiempos post-HP más tardíos.

Para profundizar en la caracterización de dicha esteatosis, se optimizó el análisis mediante citometría de flujo del contenido lipídico en hepatocitos aislados a los diferentes tiempos post-HP (0, 12, 24, 36 y 48 horas) mediante la tinción de *Nile Red* (NR) como marcador de lípidos neutros [350]. Este análisis mostró una ligera tendencia a la acumulación tardía de CL en ausencia de AnxA6 durante las primeras horas post-HP aunque no es significativo. Se observó una acumulación máxima de CL a las 36 horas para ambos genotipos (Figura 10C).

La Perilipina 2 (Plin2) o adipofilina, proteína de la familia PAT que se encuentra en los CL [351], es ampliamente utilizada como marcador de CL. Así, en paralelo se determinó la expresión de Plin2 en homogenado de hígado de los ratones WT y AnxA6^{-/-} a las diferentes horas post-HP (Figura 10D). Se observó una mayor expresión de Plin2 a tiempo 0 horas en los ratones AnxA6^{-/-}. A las 24 y 36 horas post-HP es cuando los niveles de Plin2 son más elevados en ambos genotipos, con mayor expresión en ausencia de AnxA6, correspondiendo con los tiempos de más acumulo de CL. A las 48 horas, la expresión de Plin2 disminuye tal como era de esperar según la cuantificación de CL en secciones de H/E y el marcaje de NR.

Los lípidos que se almacenan en los CL lo hacen en forma de TAG. Así, se procedió a la cuantificación de estos en homogenados de hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-} a las diferentes horas post-HP. A pesar de las diferencias observadas y el grado de esteatosis de los cortes histológicos de hígado, la cuantificación de los

niveles de TAG en los homogenados de hígado post-HP no muestra diferencias significativas entre los ratones WT y *AnxA6*^{-/-} (Figura 10E), observándose un aumento de estos durante las primeras horas post-HP con la máxima concentración a las 36 horas.

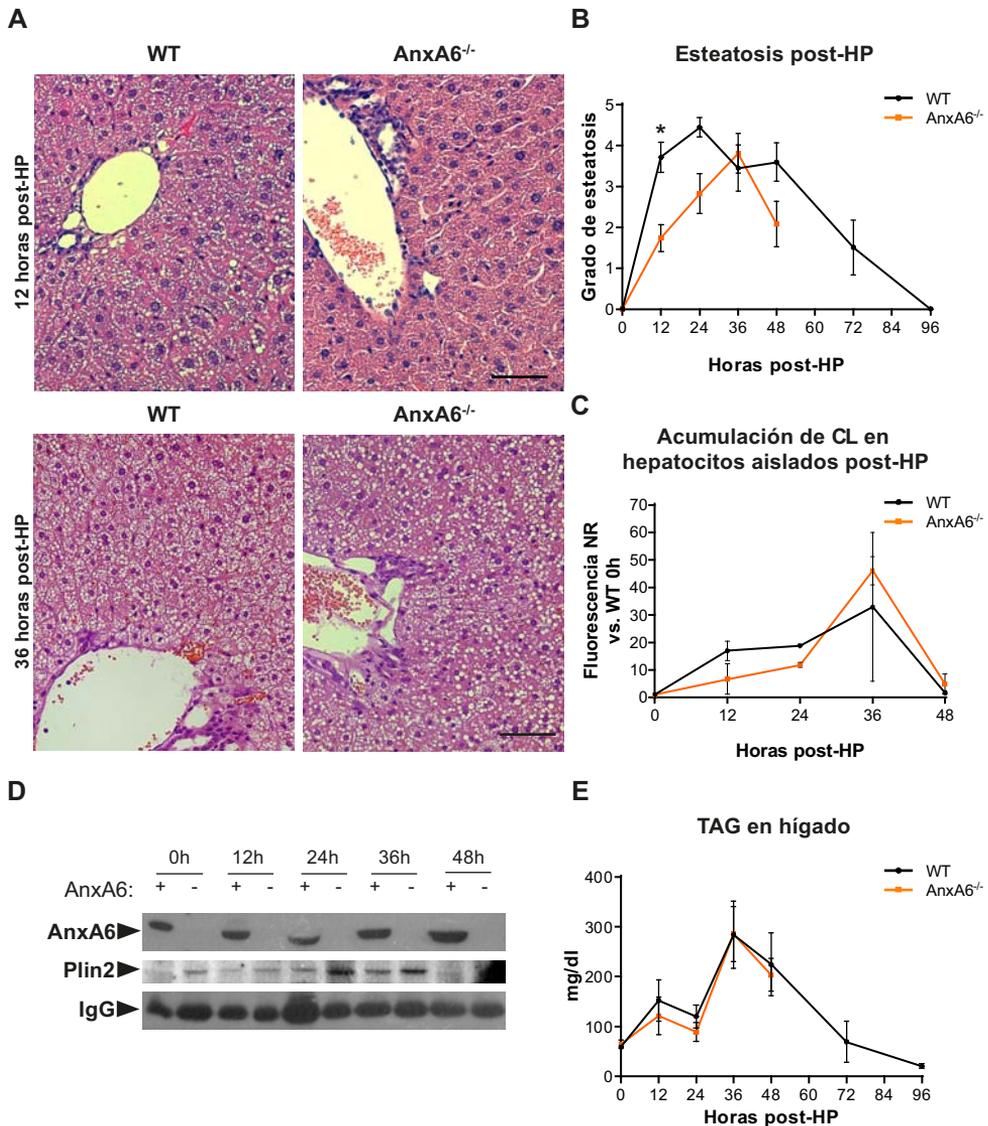


Figura 10. Estudio de la esteatosis hepática en ratones WT y *AnxA6*^{-/-} post-HP.

(A) Imágenes representativas de microscopía de campo claro de cortes histológicos de hígado de

ratones WT y *AnxA6*^{-/-} a las 12 y 36 horas post-HP teñidos con H/E. Barra, 60 μm . (B) Grado de esteatosis cuantificado con valores de 0 a 5, de menos a más CL acumulados, a partir de cortes histológicos teñidos con H/E de hígados de ratones WT y *AnxA6*^{-/-} incluidos en parafina a los diferentes tiempos post-HP. El conteo se realizó de 4 áreas por muestra (n= 6-14 por genotipo). (C) Contenido de lípidos neutros en hepatocitos aislados de ratón a los tiempos indicados post-HP analizado mediante la tinción de Nile Red por citometría de flujo. Valores calculados respecto la muestra WT a tiempo 0 (sin HP) (n= 2-3 por genotipo). (D) Inmunodetección de *AnxA6*, Perilipina 2 (*Plin2*) e IgG como control de carga. (E) Concentración de TAG (μg de TAG por g de hígado) en homogenados de hígados de ratón WT y *AnxA6*^{-/-} (n= 4-12 por genotipo).

Para confirmar estos resultados, se procedió al estudio de la acumulación de CL en hepatocitos aislados de los ratones WT respecto *AnxA6*^{-/-} en cultivo, en respuesta al tratamiento durante 16 horas con concentraciones crecientes de ácido oleico (AO) (50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$). Se cuantificó la formación de CL mediante la tinción de NR por citometría de flujo. Como se puede observar en la Figura 11A, los hepatocitos *AnxA6*^{-/-} acumulan menos CL con una diferencia significativa para la incubación con 200 $\mu\text{g/ml}$ de AO. En la Figura 11B, se muestran imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de hepatocitos tratados con 200 $\mu\text{g/ml}$ de AO durante 16 horas marcados con NR, donde se observa una clara diferencia en la intensidad del marcaje que es menor en los hepatocitos *AnxA6*^{-/-}.

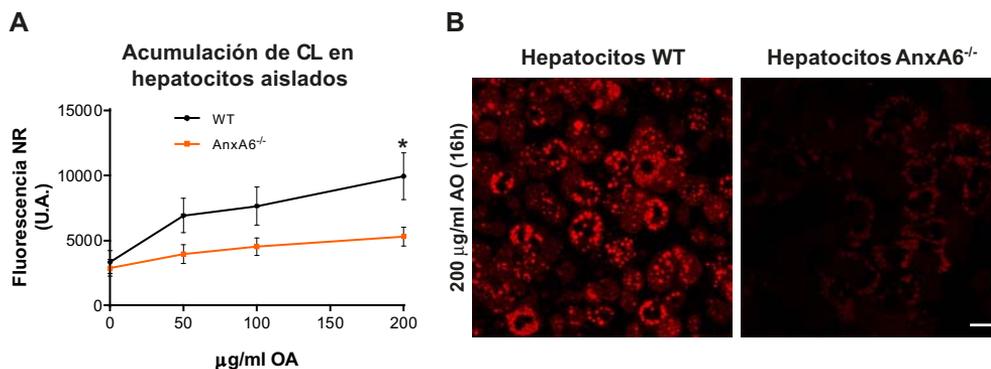


Figura 11. Estudio de la acumulación de CL en hepatocitos WT y *AnxA6*^{-/-} aislados.

(A) Contenido de lípidos neutros en hepatocitos aislados de ratón en condiciones normales ante una dosis respuesta de ácido oleico (AO) durante 16 horas (n= 3 por genotipo). (B) Imágenes representativas de microscopía confocal de hepatocitos aislados en cultivo primario incubados con 200 $\mu\text{g/ml}$ de AO durante 16 horas. Barra, 20 μm .

La capacidad del hígado para almacenar todos estos lípidos en CL y hacer frente a la demanda energética del proceso de regeneración se debe a la movilización de AG y TAG desde el tejido adiposo [127], por ello se determinaron los niveles de estos lípidos en plasma a los diferentes tiempos de estudio post-HP (Figura 12A y 12B). El análisis demuestra que los TAG y los AG son movilizados correctamente durante las primeras 12 y 24 horas post-HP tanto en presencia como ausencia de AnxA6.

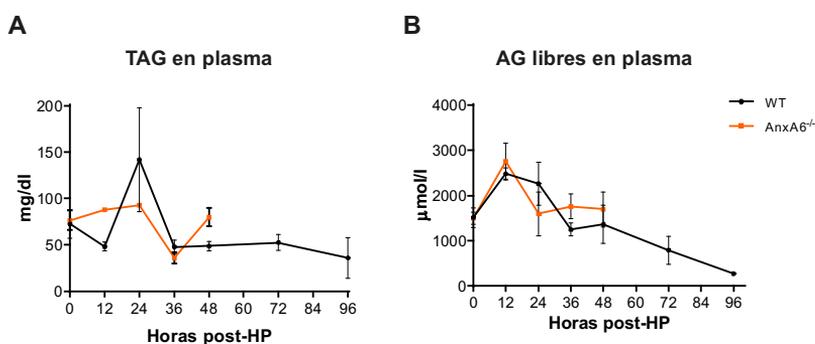


Figura 12. Estudio de los indicadores en plasma de la esteatosis hepática en ratones WT y AnxA6^{-/-} post-HP.

Niveles séricos a partir del plasma obtenido por punción cardíaca de ratones WT y AnxA6^{-/-} a los diferentes tiempos post-HP. Concentraciones de (A) TAG (mg/dl) y (B) AG libres (µmol/l) (n= 4-12 por genotipo).

Como conclusión, se demostró que en ausencia de AnxA6 y tras realizar una HP no hay cambios en la movilización periférica de lípidos con respecto a los ratones WT. Si bien es cierto que el análisis histológico y el marcaje de NR sugieren un retraso en el proceso de esteatosis en los hígados de ratón AnxA6^{-/-} a las 12 horas post-HP.

3.3.2 Metabolismo de la glucosa post-HP:

Tras la HP, el metabolismo se ve rápida y específicamente alterado [284, 307]. Así, se ha descrito una hipoglucemia significativa como resultado de la eliminación de 2/3 de la masa hepática, suponiendo una dramática reducción del glucógeno almacenado y la capacidad gluconeogénica de los hepatocitos [300], que confirma el papel esencial del hígado en la homeostasis de glucosa. Posteriormente, el hígado se somete a diversas adaptaciones que revierten esta situación mediante la inducción de la maquinaria gluconeogénica y la inhibición de la actividad glucolítica [352].

Los niveles de glucosa en sangre post-HP en los ratones WT se mantienen estables durante las 3 primeras horas post-HP, momento en el cual empiezan a disminuir progresivamente hasta las 24 horas, llegando a valores hipoglucémicos de 57 ± 5.4 mg/dl. A partir de este momento la glucemia vuelve a la normalidad, tal como está descrito [300]. Por el contrario, los ratones $AnxA6^{-/-}$ desarrollan una rápida hipoglucemia durante la primera hora post-HP con valores de 45.75 ± 4.5 mg/dl, que disminuye aún más llegando hasta niveles de 23 ± 4 mg/dl a las 24 horas. La hipoglucemia en los ratones $AnxA6^{-/-}$ se mantienen hasta la muerte del animal (Figura 13A).

Por otra parte los almacenes de glucógeno se ven también reducidos en las primeras horas post-HP tal como es de esperar después de la resección de 2/3 del hígado [317]. Esta reducción es más rápida y acusada en ratones $AnxA6^{-/-}$ que, a diferencia de los ratones WT, han agotado los depósitos a las 6 horas tras la HP (Figura 13B).

La insulina y el glucagón son hormonas descritas como estimuladoras de la proliferación hepática post-HP [353]. Los niveles en plasma sanguíneo fueron analizados post-HP en ratones WT y $AnxA6^{-/-}$. En ambos genotipos los niveles de insulina decrecen durante las primeras horas post-HP tal como se describe en la bibliografía [300] (Figura 13C). En ratones WT los niveles se mantienen hasta la primera hora post-HP en valores de 0.66 ± 0.1 pg/ml, muy similares a la concentración en condiciones normales, disminuyendo a 0.39 ± 0.1 pg/ml a las 3

horas. Por otra parte, los niveles de insulina en sangre en ratones $AnxA6^{-/-}$ pasan de 0.74 ± 0.2 pg/ml en condiciones normales a 0.31 ± 0.1 pg/ml durante la primera hora post-HP siendo significativamente menores respecto a los WT. Esta cinética diferencial en la disminución de la concentración de insulina en plasma se corresponde con la rápida hipoglucemia observada anteriormente en los ratones $AnxA6^{-/-}$ (Figura 13A). A las 12 horas post-HP se describe un pico de concentración máxima de insulina tanto en WT como $AnxA6^{-/-}$ volviendo a los valores iniciales a partir de las 24 horas (Figura 13C).

La insulina es una hormona anabólica por excelencia al contrario del glucagón que tiene un papel opuesto por lo que respecta al metabolismo glucídico y lipídico, ejerciendo una influencia catabólica. Aun así se ha apuntado a una actuación sinérgica entre ambas hormonas en el proceso de regeneración hepática [354]. Durante la regeneración hepática el glucagón se encarga de mantener los niveles de glucosa en sangre en respuesta a la hipoglucemia y compensar los niveles altos de insulina que se detectan a las 12 horas post-HP [355]. Al analizar los niveles de glucagón en plasma durante las primeras horas post-HP se observa un aumento de en los ratones WT durante la primera hora post-HP, que se mantiene hasta las 4 horas, pudiéndose explicar los niveles normales de glucosa en sangre durante estas primeras horas ya observados en la Figura 13A. Por otra parte, los ratones $AnxA6^{-/-}$ parten de mayor concentración de glucagón en sangre en condiciones normales y durante la primera hora post-HP los niveles descienden sin recuperarse durante las horas siguientes. No es hasta las 12 horas en que, ambos genotipos, aumentan los niveles de glucagón, posiblemente para hacer frente a la preocupante hipoglucemia y a los altos niveles de insulina observados a estos tiempos (Figura 13D).

Con estos resultados, se postuló un problema en la homeostasis de glucosa en los ratones $AnxA6^{-/-}$ tras la HP que no parece ser debido a un problema en la señalización hormonal de insulina/glucagón. La prolongada e irreversible hipoglucemia a partir de la primera hora post-HP en los ratones $AnxA6^{-/-}$, a diferencia de la cepa WT, sugería un coma hipoglucémico como posible causa de la muerte en estos ratones tras la HP [356, 357].

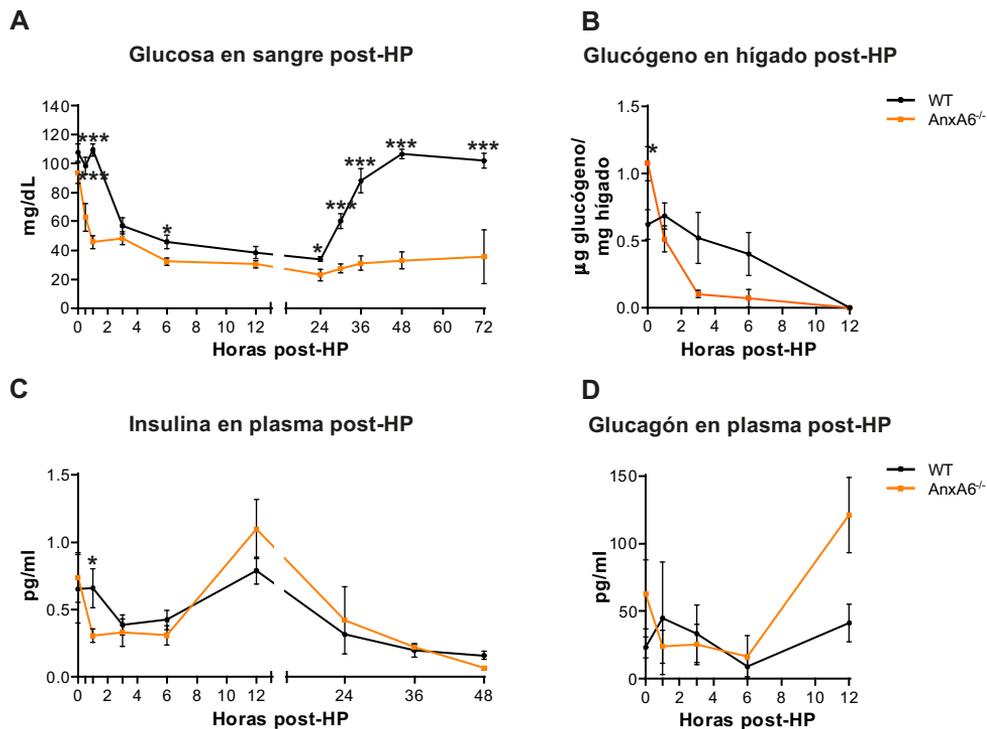


Figura 13. Metabolismo de glucosa en ratones WT y AnxA6^{-/-} post-HP.

(A) Concentración de glucosa (mg/dl) en sangre a los diferentes tiempos post-HP indicados en los ratones WT y AnxA6^{-/-} (n= 4-12 por genotipo). (B) Concentración de glucógeno (µg de glucógeno por mg de hígado) en homogenados de hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-} (n= 4-6 por genotipo). (C) Niveles de insulina (pg/ml) y (D) glucagón (pg/ml) en plasma sanguíneo de ratones WT y AnxA6^{-/-} a los diferentes tiempos post-HP (n= 3-8 por genotipo).

4. Efecto del aporte adicional de glucosa en la regeneración hepática de los ratones *AnxA6*^{-/-}.

Los carbohidratos, particularmente la glucosa, son la principal fuente energética en situaciones de daño, necrosis hepática o regeneración hepática [312]. Para analizar si la prolongada hipoglucemia es la causa de la mortalidad en los ratones *AnxA6*^{-/-} se procedió al estudio de la regeneración hepática tras la HP en presencia de glucosa en el agua de bebida *ad libitum*. De esta forma se pretendía revertir la hipoglucemia y analizar la posibilidad de llevar a cabo el proceso de regeneración hepática independientemente del déficit energético [358]. Así, los ratones fueron suplementados con glucosa al 10% en el agua de bebida 72 horas antes de realizar la HP y durante el post-operatorio y proceso de regeneración. De nuevo y bajo estas condiciones, se determinó la supervivencia de los ratones WT y *AnxA6*^{-/-} tras la HP. La mortalidad de los ratones *AnxA6*^{-/-} a la HP se revierte en estas condiciones con una supervivencia del 90.9 ± 8.7 % a los 7 días post-HP (Figura 14A) frente al 18.5 ± 7.5 % que se mostraba en la Figura 5A sin el aporte de glucosa.

Además, bajo el suplemento de glucosa, la masa hepática inicial a los 7 días post-HP se restablece tanto en ratones WT como *AnxA6*^{-/-}, demostrando la capacidad para regenerar el hígado en ausencia de *AnxA6* (Figura 14B). En estas condiciones de aporte externo de glucosa, se cuantificaron tanto las mitosis como el grado de esteatosis, en cortes histológicos de hígados de ratones WT y *AnxA6*^{-/-} incluidos en parafina y teñidos con H/E (Figura 14C), con los mismos criterios indicados anteriormente. Al cuantificar las mitosis a las diferentes horas post-HP se observa una progresión normal en el ciclo celular de los ratones *AnxA6*^{-/-} (Figura 14D), revertiendo la incapacidad para entrar en mitosis observada sin el aporte de glucosa (Figura 9E). Además, el proceso esteatótico se produce con total normalidad para los ratones WT y *AnxA6*^{-/-}, con acumulación máxima de CL entre las 24 y 48 horas y disminuyendo a las 72 horas (Figura 14E).

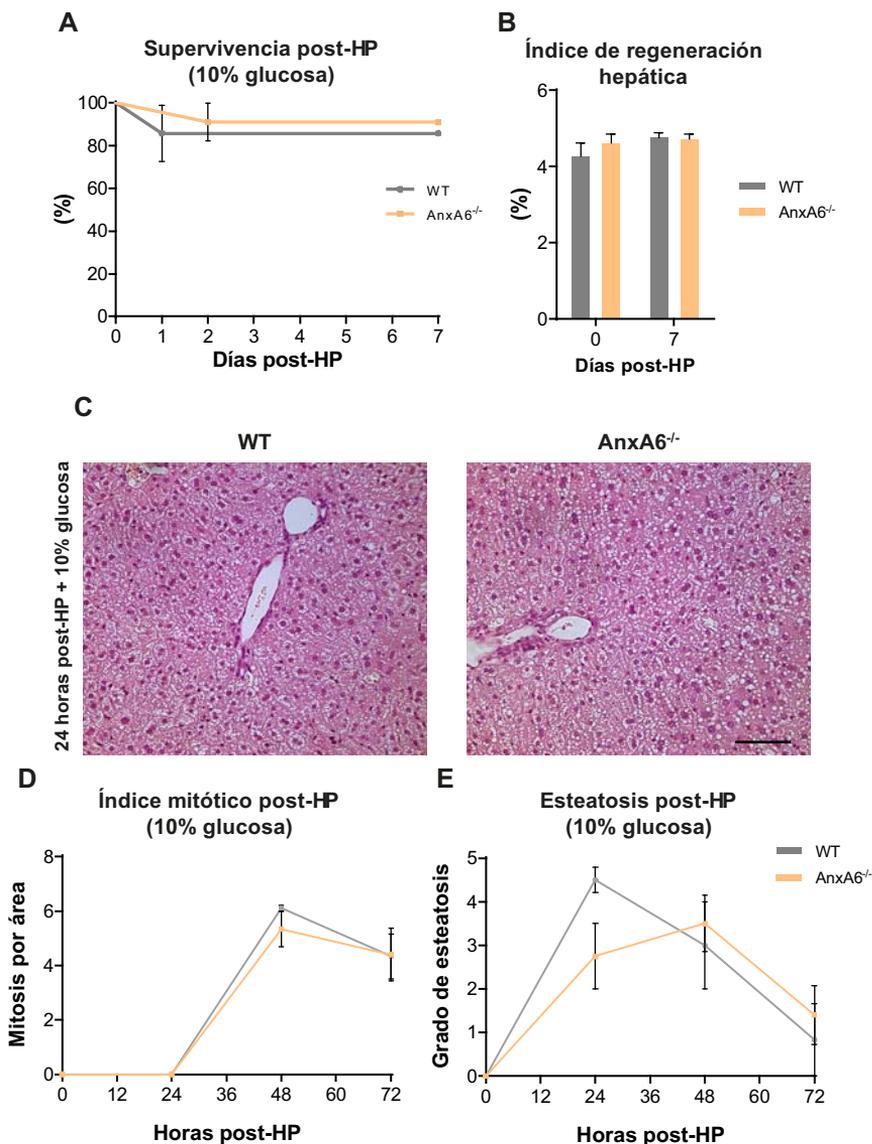


Figura 14. Estudio de la regeneración hepática tras la HP en ratones WT y AnxA6^{-/-} con la administración de glucosa en el agua de bebida.

HP realizadas en ratones mantenidos durante 72 horas antes de la cirugía y durante la recuperación con 10% de glucosa en el agua de bebida. (A) Porcentaje de supervivencia durante los 7 días post-HP (n= 20-21 por genotipo). (B) Índice de regeneración hepática calculado como porcentaje de la relación entre el peso del hígado (g) y el peso total del animal (g) (n= 6-9 por genotipo). (C) Imágenes representativas de microscopía de campo claro de la esteatosis a las 24 horas post-HP en secciones de hígado de ratón WT y AnxA6^{-/-} teñidas con H/E. Barra, 60 μm. (D) Cuantificación del número de mitosis por área en

secciones de hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-} incluidos en parafina a los diferentes tiempos post-HP y teñidos con H/E. El conteo se realizó en 4 áreas por muestra (n= 3-6 por genotipo) (E) Grado de esteatosis cuantificado con valores de 0 a 5, de menos a más CL acumulados, a partir de los mismos cortes histológicos descritos a los diferentes tiempos post-HP (n= 3-6 por genotipo).

Los niveles de glucosa en sangre de los ratones mantenidos durante 72 horas con un 10% de glucosa en el agua de bebida *ad libitum*, al inicio del ciclo de luz en el estabulario, son de 95.30 ± 5.7 mg/dl en los ratones WT y de 98.44 ± 3.1 mg/dl para los AnxA6^{-/-} (Figura 15A) sin detectarse diferencias con los valores de glucosa en sangre en las condiciones sin el suplemento de glucosa (Figura 13A). Tras la HP con el aporte adicional de glucosa, los ratones WT muestran un nivel constante de la glucemia a todos los tiempos post-HP. En cambio, los ratones AnxA6^{-/-} desarrollan la misma rápida hipoglucemia que en la HP sin glucosa, pasando de 98.44 ± 3.1 mg/dl iniciales a 23.11 ± 7.6 mg/dl durante la primera hora. Estos bajos niveles de glucosa en sangre en ausencia de AnxA6 vuelven a valores normales a partir de las 12 horas (Figura 15B).

Las imágenes de la tinción de PAS muestran el glucógeno acumulado en secciones histológicas de hígado a las 48 horas post-HP con y sin el suplemento de glucosa (Figura 15C). Se puede observar cómo tras la HP sin glucosa los ratones AnxA6^{-/-}, que están en una situación de hipoglucemia, no presentan depósitos de glucógeno hepático a diferencia de los WT. Por el contrario, a este mismo tiempo y con el aporte de glucosa, se puede constatar la capacidad de los hepatocitos AnxA6^{-/-} para almacenar glucógeno, aunque en menor medida que los ratones WT.

Con estos resultados, se demostró que en ausencia de AnxA6 y con la suplementación energética necesaria, el hígado puede regenerar y recuperar la masa hepática inicial tal como ocurre en los ratones WT.

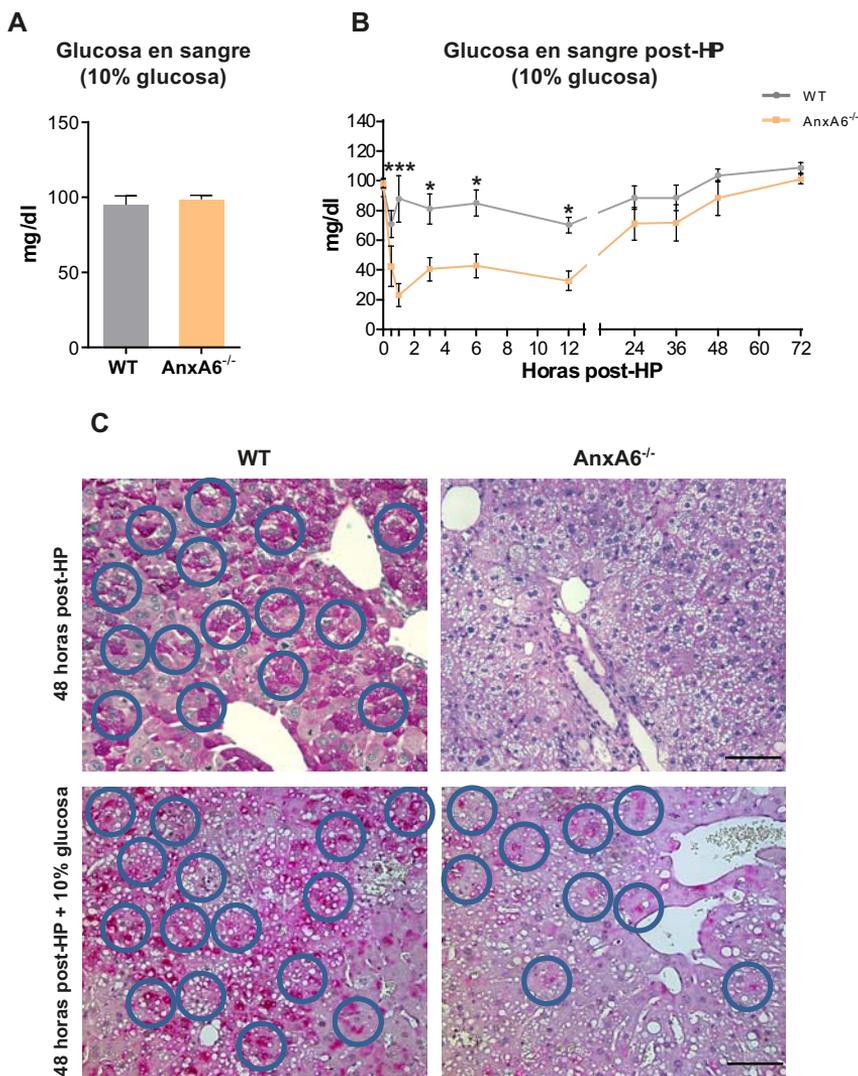


Figura 15. Metabolismo de glucosa post-HP en ratones WT y AnxA6^{-/-} con el suplemento de glucosa.

(A) Concentración de glucosa en condiciones de suplemento de 10% de glucosa en el agua de bebida *ad libitum* durante 72h. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron en ratones WT y AnxA6^{-/-} al inicio del ciclo de luz (n=10 por genotipo). (B) Concentración de glucosa (mg/dl) en sangre a los diferentes tiempos post-HP indicados (n= 6-10 por genotipo). (C) Imágenes representativas de microscopía de campo claro de secciones histológicas de hígados de ratones WT y AnxA6^{-/-} incluidos en parafina y teñidos con ácido PAS que corresponde a los depósitos de hidratos de carbono, en este caso glucógeno. Barra, 60 µm.

5. Análisis de la homeostasis de glucosa en ausencia de AnxA6.

Los resultados anteriormente expuestos sugieren un problema en la homeostasis de glucosa en ausencia de AnxA6 y en respuesta a la drástica reducción de la masa hepática tras la HP, como causa del impedimento de la regeneración hepática. Con el objetivo de encontrar la posible causa de la prolongada hipoglucemia observada post-HP en ausencia de AnxA6, se procedió al estudio del metabolismo de la glucosa en los ratones AnxA6^{-/-}. Existen numerosos síndromes y enfermedades que cursan con una incapacidad para el mantenimiento de los niveles normales de glucosa en sangre y en las cuales, el estudio de la homeostasis de la glucosa en roedores está ampliamente descrito. El complejo control hormonal en este proceso implica diferentes órganos, desde el hígado al sistema nervioso central, pasando por el músculo esquelético, páncreas endocrino y tejido adiposo. Básicamente, esta regulación está determinada por dos factores principales: la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans en respuesta a la glucosa circulante y la sensibilidad de los órganos diana a la insulina para la captación de glucosa [359, 360]. En cambio, en una situación de ayuno, en que los niveles de glucosa en sangre disminuyen, la regulación hormonal viene dada por las células α pancreáticas que secretan glucagón promoviendo la adaptación del metabolismo hepático para proveer de glucosa a todo el organismo mediante la glucogenólisis y la gluconeogénesis (GNG) [225].

Inicialmente se comprobaron los niveles de glucosa en sangre en ratones WT y AnxA6^{-/-} estabulados en condiciones estándar, con dieta de mantenimiento y agua *ad libitum*. Para estos estudios, la concentración de glucosa se determina en el estado postprandial de los ratones, al inicio del ciclo de luz en el estabulario (a las 8.00 horas). Cabe destacar que los ratones, así como los demás roedores, son animales nocturnos y el periodo de actividad se da en ausencia de luz, estando en estado postprandial al inicio del ciclo lumínico. De esta manera, se registraron niveles de 108 ± 3.4 mg/dl para los ratones WT y 100.8 ± 4.2 mg/dl en el caso de

los AnxA6^{-/-}, valores que indican una correcta homeostasis de glucosa en condiciones estándar de estabulación (Figura 16A).

El método más comúnmente utilizado para analizar la homeostasis de glucosa en un organismo es el test de tolerancia a la glucosa (GTT) [361, 362]. En este caso los ratones se ayunaron durante 5 horas, al inicio del periodo de luz y posteriormente se realizó la administración intraperitoneal (i.p) de glucosa al 10% en suero fisiológico. Los valores de glucosa basales se anotaron previamente a la administración de glucosa y posteriormente a diferentes intervalos de tiempo de 30, 60, 90 y 120 minutos. Los valores absolutos de glucosa en sangre muestran una normal captación de glucosa, indicando una tolerancia adecuada con un máximo de concentración de glucosa en sangre de aproximadamente 140 mg/dl para ambos genotipos a los 30 minutos, que decrece hasta valores de euglucemia a los 120 minutos (Figura 16B).

Para analizar en detalle la homeostasis de glucosa *in vivo* y establecer la capacidad de los tejidos extrahepáticos, como el músculo esquelético, para captar glucosa de forma dependiente de insulina [360], es necesario realizar estudios de resistencia a la insulina. El test de tolerancia a la insulina (ITT) es muy similar metodológicamente al GTT. Los ratones fueron administrados con 0.75 U/kg de insulina (i.p) y se determinaron los niveles de glucosa en sangre a los 15, 30, 60 y 120 minutos. Partiendo de una concentración basal de glucosa en sangre de aproximadamente 110 mg/dl en ratones WT y AnxA6^{-/-}, la glucemia disminuye a 34.50 ± 3.4 mg/dl en WT y a 47.80 ± 11.9 mg/dl en ausencia de AnxA6 a los 15 minutos. Estos niveles se mantienen bajos hasta los 60 minutos en que empiezan a reestablecerse sin diferencias entre ambos genotipos (Figura 16C). Además, se cuantificaron los niveles de insulina en plasma sanguíneo de ratones WT y AnxA6^{-/-} al inicio del ciclo de luz sin diferencias entre ambos genotipos con concentraciones de 0.65 ± 0.2 pg/ml y 0.74 ± 0.2 pg/ml respectivamente (Figura 16D). Así se puede concluir que, en ausencia de AnxA6 los ratones no presentan una resistencia a la insulina.

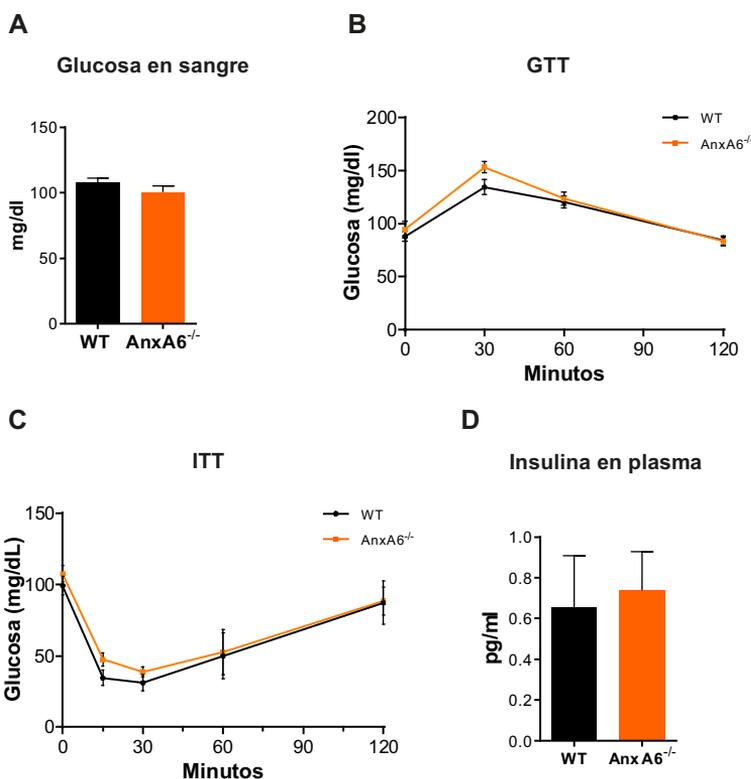


Figura 16. Estudio de la homeostasis de glucosa en ratones WT y AnxA6^{-/-}.

(A) Concentración de glucosa en condiciones normales de los ratones WT y AnxA6^{-/-} al inicio del ciclo de luz (n=23-25 por genotipo). (B) Test de tolerancia a la glucosa (GTT). La concentración de glucosa se determina en sangre a los tiempos indicados tras la administración intraperitoneal (i.p) de 10% de glucosa en ratones WT y AnxA6^{-/-} ayunados durante 5h desde el inicio del período de luz de estabulación (n=12 por genotipo). (C) Test de tolerancia a la insulina (ITT). La concentración de glucosa se determina en sangre a los tiempos indicados tras la administración (i.p) de 0.75 U/kg de insulina en ratones WT y AnxA6^{-/-} (n=5-6 por genotipo). (D) Niveles de insulina (pg/ml) en plasma sanguíneo en condiciones estándar (n= 6 por genotipo).

Por otra parte, el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre en un rango de euglucemia se lleva a cabo en los hepatocitos, que pueden almacenar o producir glucosa dependiendo del requerimiento de cada situación concreta [225]. La captación de glucosa en el hígado se da de forma pasiva por el transportador GLUT2 [169]. Al tener baja afinidad y alta capacidad absorbe diferentes azúcares obtenidos por la dieta como fructosa, glucosa y galactosa en un amplio rango de concentraciones fisiológicas [77]. En el hígado, este transportador media el transporte bidireccional de glucosa en los hepatocitos en función de las

necesidades del organismo [363, 364]. Para comprobar la capacidad de los hepatocitos $AnxA6^{-/-}$ de captar glucosa, se procedió al análisis mediante citometría de flujo del marcador fluorescente 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) Amino)-2-Deoxiglucosa (NBDG), un análogo de la glucosa, en hepatocitos aislados durante una incubación de 10 minutos. Al realizar el experimento, no se obtuvieron diferencias indicando una normal captación de glucosa en los hepatocitos de ratones $AnxA6^{-/-}$ (Figura 17A).

Además, se analizaron los depósitos de glucógeno en homogenados de hígado. Los ratones $AnxA6^{-/-}$ presentan aproximadamente 1.6 veces más glucógeno en hígado que los WT (Figura 17B). En las imágenes de microscopía electrónica de transmisión se muestran detalles la acumulación y distribución del glucógeno en los hepatocitos (Figura 17C).

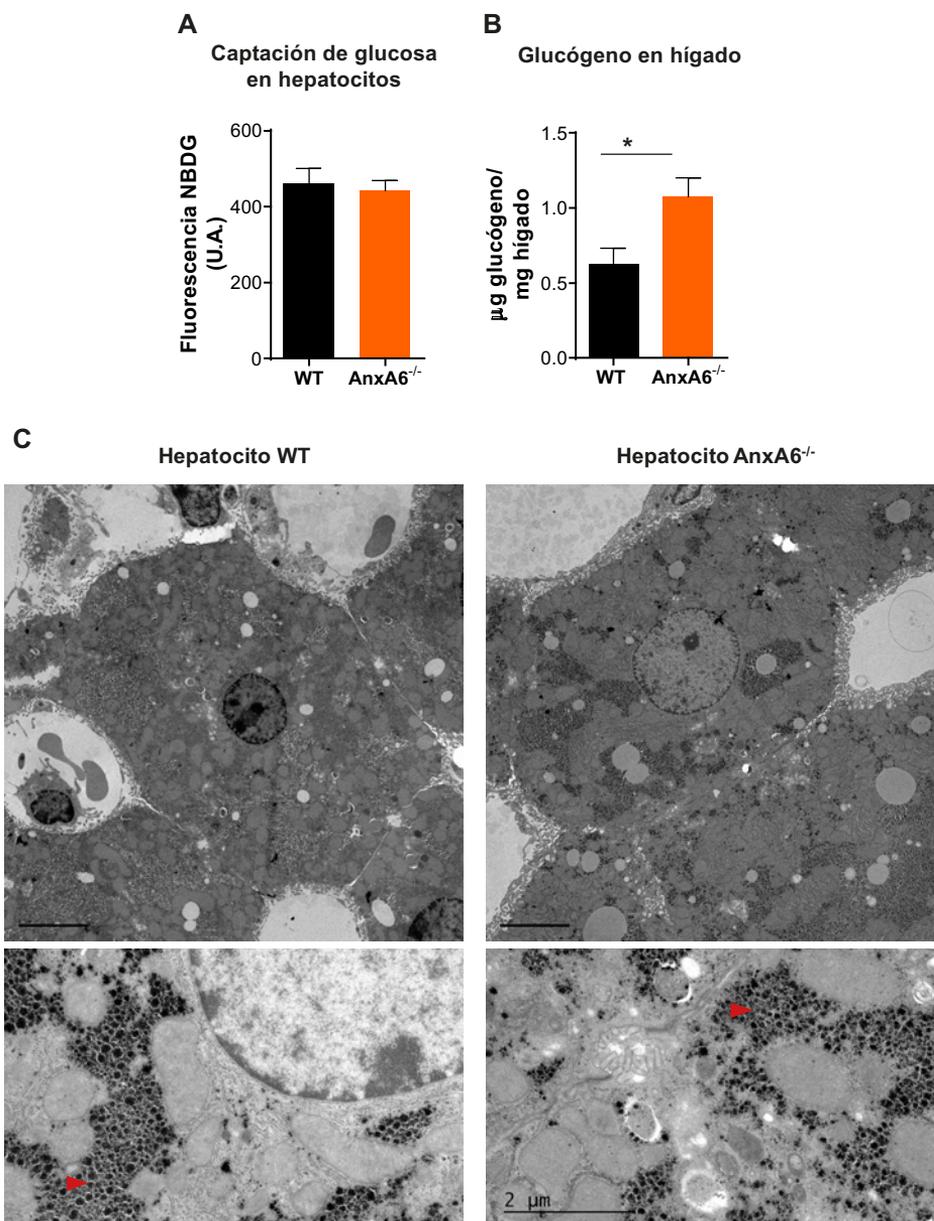


Figura 17. Captación y almacenaje de glucosa en el hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-}.

(A) Captación de 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxiglucosa (2-NBDG) en hepatocitos aislados por citometría de flujo (n=2 por genotipo). (B) Concentración de glucógeno (μg de glucógeno por mg de hígado) en homogenados de hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-} en condiciones normales (n= 4-6 por genotipo). (C) Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de hepatocitos WT y AnxA6^{-/-} en condiciones normales (paneles superiores) y detalle de las rosetas (flecha roja) de glucógeno en estos hepatocitos (paneles inferiores). Barras, 5 μm y 2 μm , respectivamente.

El estudio de la homeostasis de glucosa hasta este punto muestra que, en ausencia de AnxA6, los ratones son tolerantes a glucosa e insulina, los hepatocitos son capaces de captar glucosa y almacenarla en forma de glucógeno. Todo ello indica una correcta funcionalidad del metabolismo de la glucosa.

Para determinar si la mayor concentración de glucógeno hepático en los ratones AnxA6^{-/-} es debido a un aumento en la cantidad de nutrientes incorporados por la dieta en comparación con los ratones WT, se procedió al estudio de la ingesta. Los ratones WT y AnxA6^{-/-} fueron estabulados individualmente en cámaras metabólica con dieta de mantenimiento y agua *ad libitum*. Durante 4 días se registró la ingesta de pienso y agua, y la excreción de orina y heces en estos ratones. Los resultados obtenidos demostraron que, para ratones con el mismo peso corporal (aproximadamente 26 g) (Figura 18A), la ingesta de comida es igual para ambos genotipos WT y AnxA6^{-/-} (Figura 18B). Asimismo, la excreción de heces tampoco varía (Figura 18C). En cambio, la cantidad de agua ingerida es significativamente mayor en los ratones AnxA6^{-/-} (Figura 18D) que también excretan mayor volumen de orina (Figura 18E). La polidipsia y poliuria detectada en los ratones AnxA6^{-/-} podía ser debida a un intento de mantener la osmosis diurética posiblemente debida a una glucosuria. Por esta razón se procedió a la cuantificación de los niveles de glucosa en orina. Los resultados muestran un aumento significativo de la concentración de glucosa en orina de 17.50 ± 2.7 mg/dl en los ratones WT frente a 60.33 ± 15 mg/dl en los ratones AnxA6^{-/-} (Figura 18F).

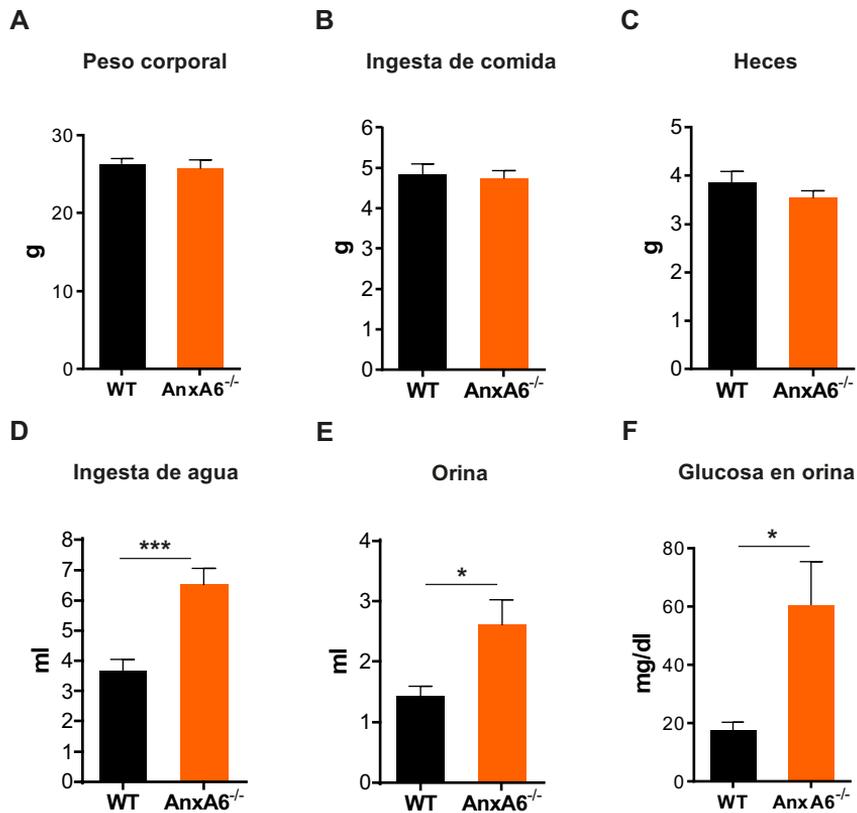


Figura 18. Estudio de la ingesta y excreción de los ratones WT y AnxA6^{-/-}.

Estudio de la ingesta en ratones WT y AnxA6^{-/-} establecidos individualmente en cámaras metabólicas de ratón con comida y agua *ad libitum*. El registro de (A) peso corporal (g), (B) ingesta de comida (g), (C) heces (g), (D) ingesta de agua (ml) y (E) orina (ml) se realiza durante 4 días a la misma hora de la mañana (n= 7-8 por genotipo). (F) Glucosa (mg/dl) en orina recogida durante 12 horas desde el inicio del ciclo de luz (n= 6 por genotipo).

Globalmente, los resultados del estudio de la homeostasis de glucosa en condiciones normales indican que los ratones AnxA6^{-/-} no presentan ningún defecto en el metabolismo hepático de glucosa y el hígado parece realizar correctamente su función.

6. Respuesta metabólica de los ratones AnxA6^{-/-} en situación de ayuno.

El hígado es un órgano central en la regulación del metabolismo energético proveyendo de sustratos a todo el organismo. El mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre en el rango de euglucemia y la movilización de lípidos son procesos fisiológicos que requieren de diversas vías metabólicas e implican diferentes órganos.

El modelo de ayuno, que consiste en retirar la dieta de mantenimiento, provoca la secreción de glucagón por el páncreas para evitar y hacer frente a la hipoglucemia, estimulando la degradación de glucógeno y la activación de la GNG para promover la producción y secreción de glucosa en el hígado [127, 225]. Además, esta hormona activa la lipólisis en el tejido adiposo [134], así como la secreción de sustratos gluconeogénicos por parte del músculo esquelético [183].

6.1 Homeostasis de glucosa durante el ayuno.

Inicialmente se analizó la glucemia de los ratones WT y AnxA6^{-/-} mediante el modelo de ayuno. Para ello, los ratones que habían sido alimentados *ad libitum* fueron ayunados al inicio del ciclo de luz (8.00 horas) y se midieron los niveles de glucosa en sangre a diferentes tiempos de ayuno, durante 24 horas. Se observó que los ratones AnxA6^{-/-} son incapaces de mantener la euglucemia ya que la concentración de glucosa en sangre decrece significativamente más rápido que en los ratones WT (Figura 19A). Mientras los ratones WT tienen niveles que oscilan sobre los 110 mg/dl de glucosa en sangre durante las 10 primeras horas de ayuno disminuyendo a 52.23 ± 3.4 mg/dl a las 24 horas, los AnxA6^{-/-} presentan niveles hipoglucémicos de 72.46 ± 3 mg/dl desde las 10 horas de ayuno.

Por otro lado, se cuantificaron los niveles de glucógeno en homogenados de hígado observándose la degradación progresiva y completa de los depósitos a las 10 horas de ayuno en ambos genotipos (Figura 19B). Si bien es cierto que los ratones AnxA6^{-/-} que partían de una concentración de glucógeno mayor, tienen una cinética de degradación más rápida. Durante las 3 primera horas de ayuno, los

niveles de glucógeno disminuyen un 43% en los ratones $AnxA6^{-/-}$ mientras que los ratones WT mantienen la concentración inicial durante las 6 primeras horas.

Dada la implicación de la regulación hormonal de insulina y glucagón, en la homeostasis de la glucosa, se procedió al análisis en plasma de estas hormonas en condiciones de ayuno. Los niveles de insulina en los ratones $AnxA6^{-/-}$ disminuyen de 0.74 ± 0.2 a 0.23 ± 0.1 pg/ml (Figura 19C), mientras que los niveles de glucagón aumentan de 62.43 ± 25.4 a 131 ± 40.7 pg/ml (Figura 19D) durante las 3 primeras horas de ayuno. Esto correlaciona con el estado de glucemia en sangre que presentan los ratones $AnxA6^{-/-}$ y la elevada degradación de glucógeno detectada. Los valores de glucagón en los ratones $AnxA6^{-/-}$ decrecen de nuevo a las 10 horas y vuelven a verse incrementados a las 24 horas. Los ratones WT presentaban una disminución y aumento progresivos de los niveles de insulina y glucagón, respectivamente.

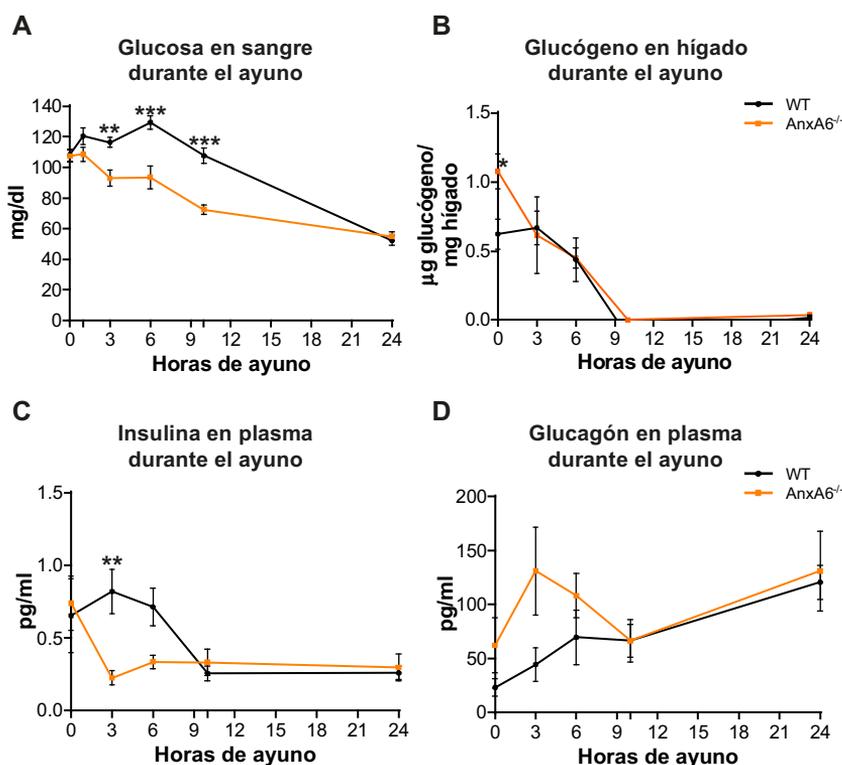


Figura 19. La homeostasis de glucosa en ratones WT y $AnxA6^{-/-}$ durante el ayuno.

(A) Concentración de glucosa en sangre (mg/dl) a los diferentes tiempos de ayuno de los ratones WT y

AnxA6^{-/-} (n= 13 por genotipo). (B) Concentración de glucógeno (μg de glucógeno por mg de hígado) en homogenados de hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-} a los tiempos indicados (n= 3-6 por genotipo). (C) Niveles de insulina (pg/ml) y (D) glucagón (pg/ml) en plasma sanguíneo de ratones WT y AnxA6^{-/-} a los diferentes tiempos de ayuno (n= 6-9 por genotipo).

Para concluir, los ratones AnxA6^{-/-} en condiciones de ayuno, como pasa tras la HP, no son capaces de mantener los niveles normales de glucosa en sangre. Con lo estudiado hasta ahora se descarta que la alteración en la homeostasis de glucosa sea debida a un problema de regulación hormonal, ya que los niveles de insulina y glucagón responden a las concentraciones de glucosa en sangre.

6.2 Homeostasis lipídica durante el ayuno.

En una situación de ayuno, el hígado obtiene energía principalmente de la β -oxidación de AG para posteriormente obtener ATP mediante el ciclo de Krebs o producir cuerpos cetónicos y proveer de energía a los tejidos extrahepáticos [127, 128]. Estos AG provienen de la lipólisis en el tejido adiposo que se encuentra también activada en esta situación metabólica [134].

En este caso, se analizaron las concentraciones en sangre de colesterol, TAG y AG libres en ratones WT y AnxA6^{-/-} ayunados durante 24 horas. Los niveles de colesterol aumentan ligeramente en ambos genotipos en comparación con la situación control de los ratones estabulados con dieta de mantenimiento (Figura 4A) hasta concentraciones de 100-120 mg/ml (Figura 20A). En cambio la concentración de TAG tras el ayuno es significativamente mayor en los ratones AnxA6^{-/-} (Figura 20B). Además, en el caso de los ratones WT los niveles TAG en sangre durante el ayuno se mantienen igual que en la situación control (Figura 4B). Por último, se observa un claro aumento a las 24 horas de ayuno en la concentración de AG libres en ratones AnxA6^{-/-} respecto a la condición control. En ausencia de AnxA6 los niveles de AG libres en ayuno son ligeramente mayores que en los ratones WT, con niveles de 3727 ± 1023 U/l respecto los ratones WT con niveles de 2201 ± 344.5 U/l (Figura 20C).

Los lípidos en sangre son captados por el hígado y almacenados en CL para su posterior consumo [128]. Mediante el análisis de microscopía electrónica de transmisión se observó la acumulación de CL en hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-} a las 24 horas de ayuno. El número de CL en cada hepatocito es heterogéneo para ambos genotipos y el tamaño de los CL acumulados en hígado de ratones AnxA6^{-/-} es mucho mayor (Figura 20D). La cuantificación de estas imágenes determinó que el número de CL por hepatocito es mayor en los hepatocitos WT (Figura 20E), pero en ausencia de AnxA6 estos tienen un área significativamente mayor (Figura 20F).

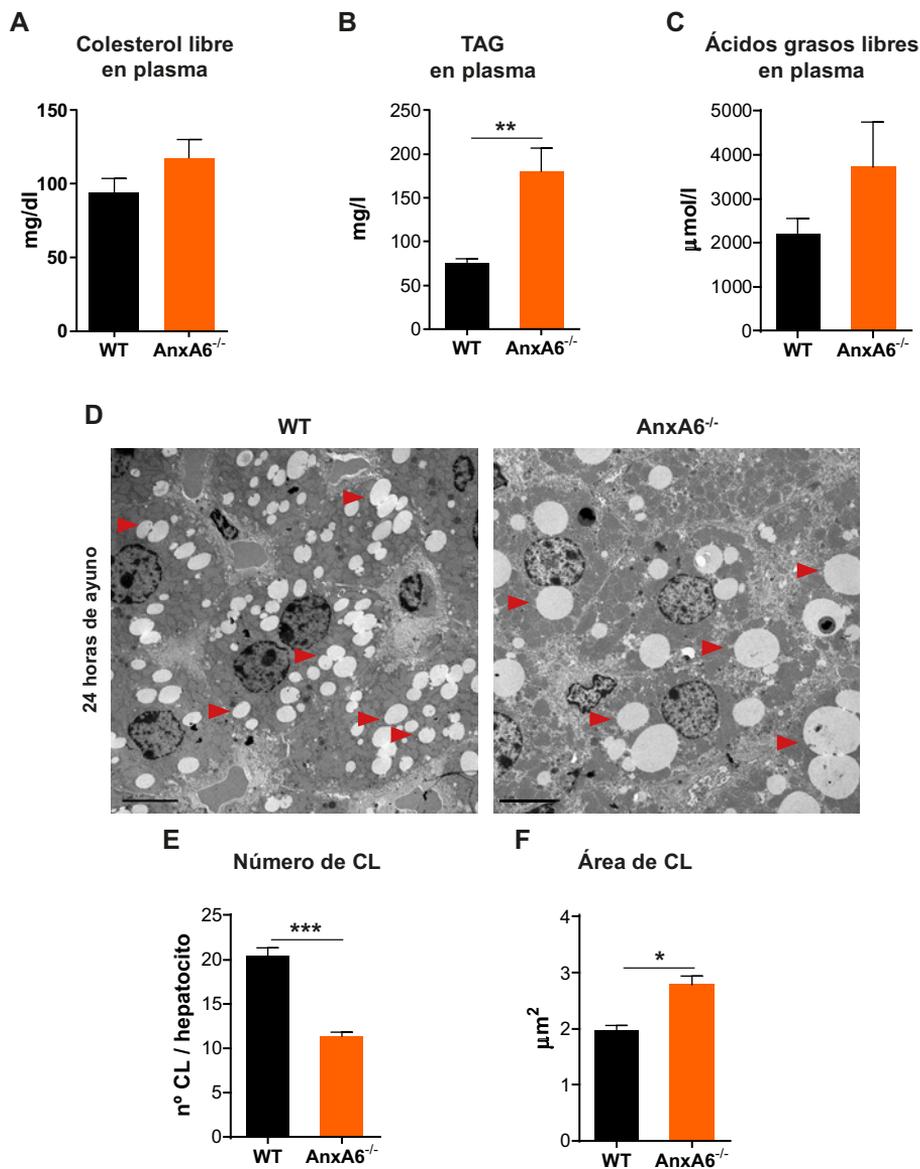


Figura 20. El metabolismo lipídico en ratones WT y *AnxA6*^{-/-} durante el ayuno.

Niveles en plasma sanguíneo de (A) colesterol libre (mg/dl), (B) TAG (mg/dl) y (C) AG libres (U/l) a las 24 horas de ayuno (n= 4 por genotipo). (D) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de hígados de ratón WT y *AnxA6*^{-/-} a las 24 horas de ayuno. Las flechas rojas muestran CL acumulados. Barra, 5 μm. (E) Cuantificación del número de CL por hepatocito y (F) cuantificación del área media de cada CL. Se cuantificaron 15-25 hepatocitos por genotipo (n=3 por genotipo).

6.3 Homeostasis de aminoácidos durante el ayuno.

Durante el ayuno, los aminoácidos son esenciales para el mantenimiento de la glucosa circulante [179]. Así, ante la privación de nutrientes el flujo de aminoácidos que provienen de la proteólisis del músculo esquelético hacia los órganos gluconeogénicos es elevado. Normalmente, existe una concordancia entre los niveles de aminoácidos circulantes liberados por el músculo esquelético y los aminoácidos captados por los órganos gluconeogénicos [183].

Para el estudio de este flujo durante el ayuno se analizaron los niveles de aminoácidos en plasma y homogenado de hígado en ratones WT y AnxA6^{-/-} en condiciones normales de dieta de mantenimiento *ad libitum* y tras 24 horas de ayuno.

Los resultados obtenidos muestran diversas diferencias en los niveles de aminoácidos en ausencia de AnxA6. El aminograma obtenido correspondiente al plasma (Figura 21A) muestra como la glutamina en los ratones WT se mantiene a la misma concentración tras el ayuno mientras que en los ratones AnxA6^{-/-} esta concentración es mayor en ambas condiciones. Por otro lado, la alanina disminuye significativamente tras el ayuno en los ratones WT a diferencia de los AnxA6^{-/-} en que se mantiene igual. Los ratones AnxA6^{-/-} tienen una menor concentración en plasma de leucina, tirosina y lisina en situación control. En el caso de la valina, la lisina y la arginina, los ratones WT presentan alteraciones a las 24 horas de ayuno a diferencia de los ratones AnxA6^{-/-}. Únicamente en el caso de la taurina, los ratones AnxA6^{-/-} presentan un aumento a las 24 horas de ayuno.

En el hígado (Figura 21B) la alanina, principal aminoácido gluconeogénico, se encuentra disminuido en los ratones WT a las 24 hora de ayuno a diferencia de los AnxA6^{-/-}. Otros aminoácidos como el glutamato aumentan a las 24 horas de ayuno en los ratones WT, seguramente debido a la metabolización de la alanina a piruvato. Este aumento no se detecta en los ratones AnxA6^{-/-} indicando una menor tasa gluconeogénica. Lo mismo ocurre en el caso de la leucina, que se encuentra aumentada en la situación de ayuno en los ratones WT y con niveles similares en los AnxA6^{-/-}.

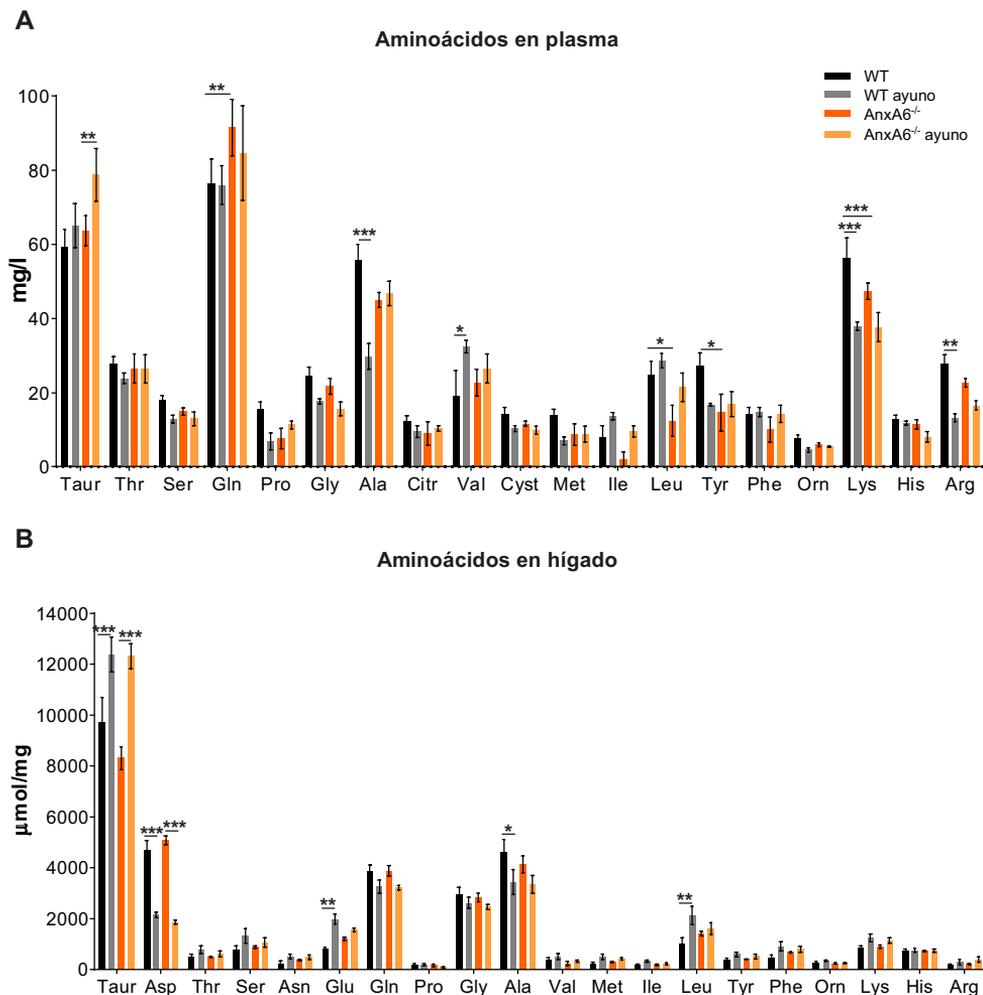


Figura 21. Aminogramas en plasma e hígado en los ratones WT y *AnxA6^{-/-}* en condiciones estándar y 24 horas de ayuno.

Niveles de aminoácidos en (A) plasma (mg/l) y (B) homogenado (µmol/mg) de hígado en condiciones estándar y tras 24 horas de ayuno (n=4 por genotipo). Para el análisis se precipitó la proteína de la muestra mediante TCA y se analizó mediante cromatografía de separación por intercambio de cationes seguido de derivación post-columna con ninidrina y detección por UV. Taur: Taurina; Asp: Aspartato; Thr: Treonina; Ser: Serina; Asn: Asparagina; Glu: Glutamato; Gln: Glutamina; Pro: Prolina; Gly: Glicina; Ala: Alanina; Citr: Citrulina; Val: Valina; Cyst: Cisteina Met: Metionina; Ile: Isoleucina; Leu: Leucina; Tyr: Tirosina; Phe: Fenilalanina; Orn: Ornitina; Lys: Lisina; His: Histidina; Arg: Arginina.

7. Estudio de la gluconeogénesis hepática en ausencia de AnxA6.

En condiciones de bajos niveles de glucosa en sangre, el hígado puede producir glucosa a partir de la degradación de glucógeno y de la gluconeogénesis hepática, y, aunque en menor medida, en el riñón e intestino [184, 365]. La GNG es un proceso anabólico que se induce en una situación de catabolismo sistémico. Consiste en la biosíntesis de glucosa a partir de diferentes precursores como el piruvato, el lactato, el glicerol y algunos aminoácidos como la alanina y la glutamina [175]. Este proceso juega un papel muy importante en el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre durante el ayuno llegando a ser crítico cuando los depósitos de glucógeno se han agotado [225]. Por ello, se estudió como la ausencia de AnxA6 afecta a la GNG y en consecuencia a la producción de glucosa.

7.1 Expresión relativa de las enzimas gluconeogénicas.

En primer lugar, analizamos la expresión relativa de mRNA de las enzimas clave en la GNG. Este proceso está regulado básicamente por las enzimas glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y fructosa-1,6-bisfosfatasa (F1,6Pasa) [127], enzimas activadas por glucagón [225]. Al analizar la expresión relativa de dichas enzimas en homogenados de hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-} se observa un aumento de todas ellas a partir de las 10 horas de ayuno. La G6Pasa tiene un pico máximo de expresión relativa a las 10 horas alcanzando niveles similares en ambos genotipos (Figura 22A). Cabe destacar que la expresión de la G6Pasa antes del ayuno en los ratones AnxA6^{-/-} se encuentra incrementada. De nuevo la expresión relativa de la PEPCK en situación basal es 2 veces más elevada en los hígados AnxA6^{-/-} (Figura 22B). Por último, hay un ligero incremento en la expresión relativa de F1,6Pasa a las 24 horas en los ratones AnxA6^{-/-} que en este caso no estaba sobrepresada antes del ayuno (Figura 22C).

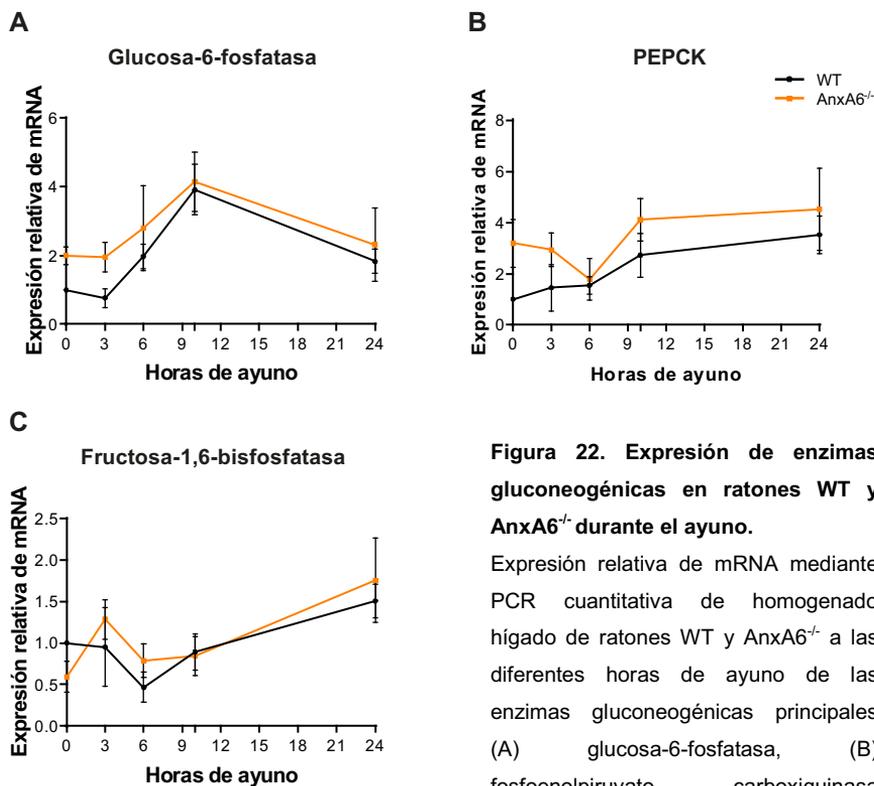


Figura 22. Expresión de enzimas gluconeogénicas en ratones WT y AnxA6^{-/-} durante el ayuno.

Expresión relativa de mRNA mediante PCR cuantitativa de homogenado hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-} a las diferentes horas de ayuno de las enzimas gluconeogénicas principales (A) glucosa-6-fosfatasa, (B) fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y (C) Fructosa-1,6-bisfosfatasa (n= 3-6 por genotipo).

7.2 Gluconeogénesis a partir de diferentes sustratos.

Seguidamente se analizó la actividad gluconeogénica *in vivo* a partir de los diferentes sustratos. Así, se procedió a la administración de piruvato, L-glutamina, lactato, L-alanina y glicerol intraperitonealmente en ratones ayunados durante 24 horas. En este punto los depósitos de glucógeno están agotados, de manera que la glucosa producida deriva de la GNG a partir de los diferentes sustratos [366]. Tras determinar los bajos niveles de glucosa basales a las 24 horas de ayuno, se administraron los sustratos gluconeogénicos y se registraron los niveles de glucosa en sangre a 15, 30, 60 y 120 minutos para establecer las curvas de tolerancia de cada uno de ellos.

Al inyectar 2 g/kg de piruvato (i.p) los ratones WT y AnxA6^{-/-} alcanzan valores normales de glucosa en sangre de 121.2 ± 7.1 mg/dl y 106.0 ± 6.9 mg/dl, respectivamente a los 30 minutos indicando una tolerancia normal y la capacidad gluconeogénica frente a este sustrato (Figura 23A). Con el test de L-glutamina administrada i.p a una dosis de 2 g/kg los ratones AnxA6^{-/-} llegan a niveles máximos de glucemia de 89.09 ± 4.3 mg/dl a los 15 minutos siendo más elevados que los ratones WT, que recuperan los niveles normales de glucosa con 109.5 ± 10.1 mg/dl a los 60 minutos (Figura 23B). A los 60 minutos, la glucosa en sangre de los ratones AnxA6^{-/-} disminuye de nuevo de forma significativa.

Al realizar el test de lactosa, inyectando i.p 2 g/kg, se detectó una reducción de la capacidad gluconeogénica, ya que los ratones AnxA6^{-/-} presentan una concentración de glucosa en sangre menor que los ratones WT a los 30 y 60 minutos. Aun así, los ratones AnxA6^{-/-} alcanzan niveles de glucosa en sangre de 104.9 ± 4.7 mg/dl a los 60 minutos mostrando que son capaces de revertir la hipoglucemia inicial pero en menor medida que los ratones WT (Figura 23C).

Sorprendentemente, al administrar de 2g/kg de L-alanina los ratones AnxA6^{-/-} son incapaces de recuperar la hipoglucemia llegando únicamente concentraciones de 73.54 ± 5 mg/dl a los 60 minutos mientras que los ratones WT revierten este estado con niveles de 115.7 ± 9.6 mg/dl de glucosa en sangre (Figura 23D).

Por último, los niveles de glucosa en sangre tras la administración de 2g/kg de glicerol incrementan en ambos genotipos hasta valores normales de glucemia (Figura 23E).

Durante el ayuno, la mayor producción de glucosa derivada de la GNG se da en el hígado a partir de los sustratos analizados, particularmente por los sustratos específicos hepáticos: alanina y lactato. Si bien es cierto que en ayunos prolongados adquiere importancia la GNG llevada a cabo en el riñón y el intestino, básicamente a partir de glutamina y glicerol, llegando a suponer un 20% de la producción total de glucosa en el organismo [184-186, 367-369].

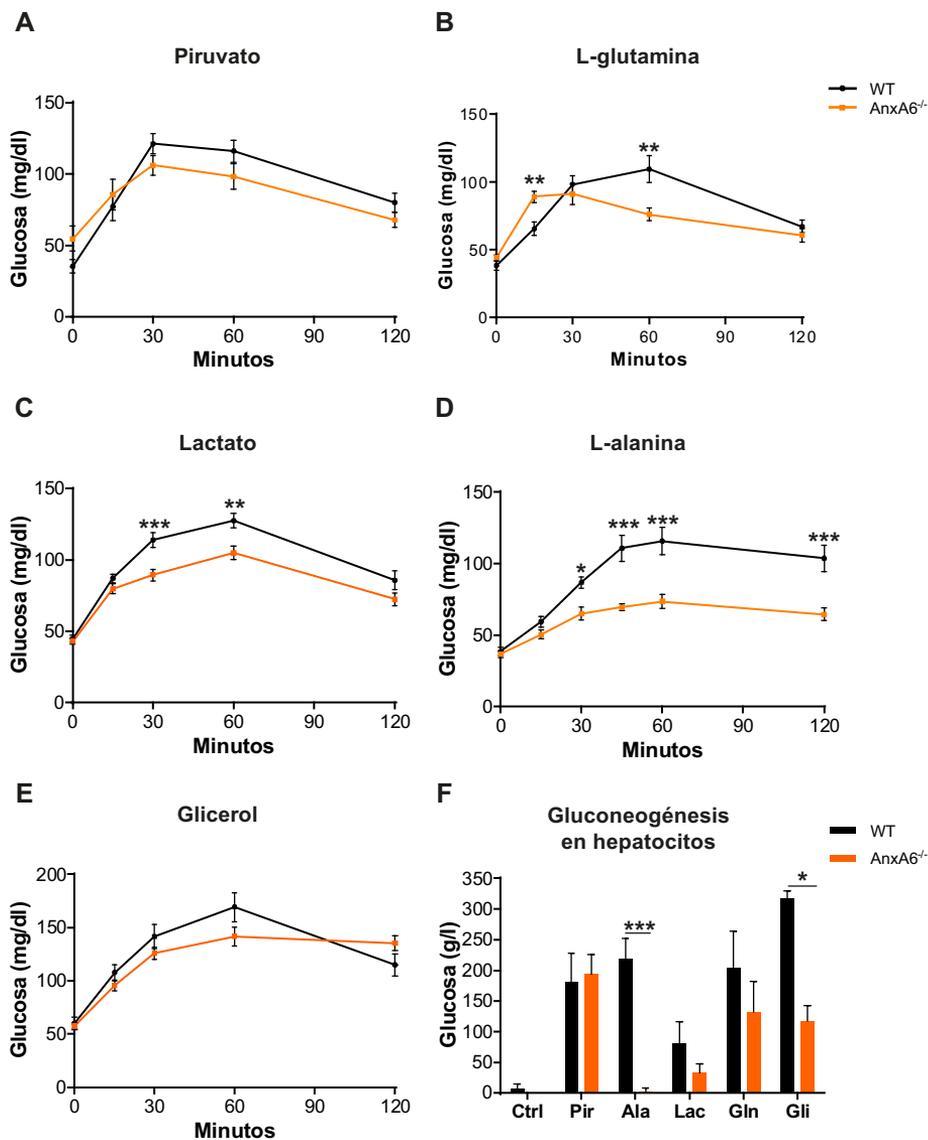


Figura 23. Producción de glucosa a partir de sustratos gluconeogénicos en ratones WT y AnxA6^{-/-} durante el ayuno.

Producción de glucosa en sangre (mg/dl) tras la administración i.p de sustratos gluconeogénicos en ratones WT y AnxA6^{-/-} a las 24 horas de ayuno. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron a los tiempos indicados tras la administración de (A) piruvato 2g/kg (n=5-6 por genotipo), (B) L-glutamina 2g/kg (n= 11-12 por genotipo), (C) lactato 2g/kg (n= 21-22 por genotipo), (D) L-alanina 2g/kg (n= 12-13 por genotipo) y (E) glicerol 2g/kg (n= 11-12 por genotipo). (F) Concentración de glucosa (g/l) en el medio de hepatocitos aislados WT y AnxA6^{-/-} tras ser activados con 200nM dexametasona, ayunados durante 6 horas y posteriormente incubados durante 24 horas en medio sin glucosa (ctrl, control), con piruvato 2

mM (Pir), L-alanina 20 mM (Ala), Lactato 20 mM (Lac), L-glutamina 20 mM (Gln) y glicerol 20 mM (Gli) (n= 4 por genotipo para todos los sustratos y n=2 por genotipo para glicerol).

Para descartar la producción de glucosa derivada de la GNG en los órganos extrahepáticos, y analizar la capacidad gluconeogénica específica de los hepatocitos, se procedió al estudio de ésta en hepatocitos aislados de ratones WT y AnxA6^{-/-}.

Los hepatocitos fueron aislados a partir de ratones WT y AnxA6^{-/-} que se encontraban estabulados en condiciones de dieta de mantenimiento y bebida *ad libitum*. Tras ser mantenidos durante 16 horas en medio de mantenimiento (1:1 DMEM:HAM F-12, 0% FCS), los hepatocitos aislados fueron ayunados de glucosa durante 6 horas (medio DMEM *base* sin glucosa), momento en que se dejaban de detectar niveles de glucosa secretada al medio, indicando que los depósitos de glucógeno se han agotados. A partir de entonces, se incubó con los diferentes sustratos anteriormente analizados *in vivo* durante 24 horas y se cuantificó la producción de glucosa secretada al medio (Figura 23F). Los resultados mostraron un impedimento total de los hepatocitos AnxA6^{-/-} para producir glucosa a partir de L-alanina, confirmando los resultados obtenidos *in vivo*. En cambio, al incubar con ácido pirúvico, tanto en presencia como ausencia de AnxA6, se detectaron concentraciones de aproximadamente 200 mg/dl de glucosa en el medio. La producción de glucosa a partir de los demás sustratos (lactato, L-glutamina y glicerol) está ligeramente disminuida en los hepatocitos AnxA6^{-/-}. Esta reducción era de 2.7 veces para glicerol sin diferencias significativas para lactato y L-glutamina en los hepatocitos deficientes en AnxA6.

El estudio de la GNG en hepatocitos aislados de ratón muestra una alteración en esta vía metabólica en ausencia de AnxA6, viéndose reducida la producción de glucosa endógena a partir de glicerol e impedida totalmente con L-alanina.

Por otro lado, se analizó la producción de glucosa a las 24 horas post-HP en ratones WT y AnxA6^{-/-}, a partir de L-alanina, situación en que los ratones se encontraban también en una situación de hipoglucemia (Figura 13A). Al inyectar L-alanina, aunque la producción de glucosa no era de niveles equivalentes al test realizado en animales ayunados, se observó una reducción significativa de un

52.3% en los ratones AnxA6^{-/-} respecto los WT (Figura 24). Así, durante el proceso de regeneración los hígados de ratones AnxA6 también son incapaces de producir glucosa a partir de alanina, pudiendo ser ésta la causa de su incapacidad para recuperar la glucemia post-HP o ayuno.

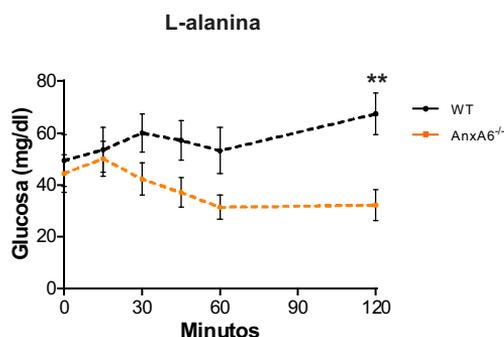


Figura 24. Producción de glucosa en ratones WT y AnxA6^{-/-} tras la HP a partir de sustratos gluconeogénicos.

Producción de glucosa (mg/dl) en sangre tras la administración i.p de L-alanina en ratones WT y AnxA6^{-/-} a las 24 horas post-HP. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron a los tiempos indicados tras la administración de L-alanina 2g/kg (n= 8-10 por genotipo).

7.3 Expresión relativa de las enzimas alanina aminotransferasa y lactato dehidrogenasa.

A continuación se analizaron las posibles causas de la deficiencia gluconeogénica a partir de alanina observada en los ratones AnxA6^{-/-}. La alanina, así como el lactato, es considerada la principal fuente de piruvato en el hígado. El metabolismo de la alanina está determinado por la cantidad de ésta en el torrente sanguíneo, regulando la expresión y actividad de la enzima alanina aminotransferasa [182]. La alanina puede derivar de la dieta o ser secretada por el músculo esquelético en una situación de ayuno. La producción de piruvato a partir de alanina y lactato viene dada por las enzimas alanina aminotransferasa (ALAT) y lactato deshidrogenasa (LDH), respectivamente [370].

La expresión relativa de estas enzimas fue analizada por PCR cuantitativa a diferentes horas de ayuno en ratones WT y AnxA6^{-/-}. Los resultados no muestran diferencias significativas en la expresión de las enzimas entre los dos genotipos. Se analizaron dos isoformas de ALAT; ALAT1 y ALAT2. ALAT1 presenta un pico máximo a las 10 horas de ayuno con niveles de 1.79 ± 0.5 veces en los ratones WT y 2.68 ± 1 vez en los ratones AnxA6^{-/-} (Figura 25A). La isoforma ALAT2 aumenta la

expresión durante las 6 primeras horas de ayuno hasta 1.82 ± 0.7 veces en los ratones WT, mientras que en los ratones *AnxA6*^{-/-} la expresión no incrementa hasta las 10 horas, aunque estas diferencias no eran significativas (Figura 25B).

La expresión de LDH es ligeramente más elevada en los ratones WT que en ausencia de *AnxA6* a las 24 horas de ayuno mientras que la expresión en los ratones *AnxA6*^{-/-} parece mantenerse constante a medida que avanzaba el ayuno, aunque de nuevo sin diferencias significativas (Figura 25C).

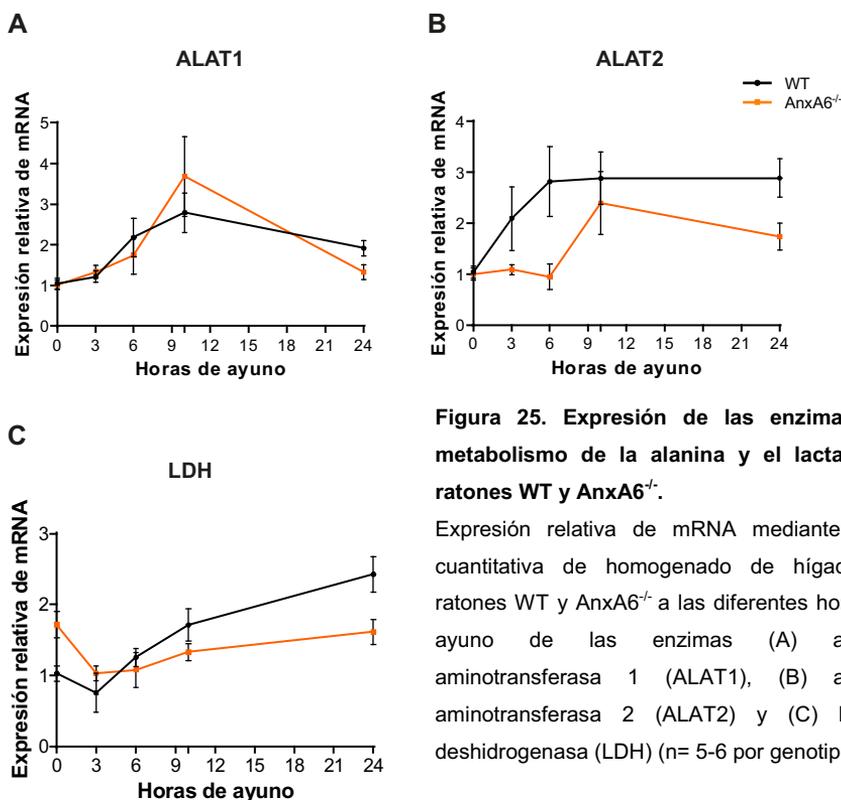


Figura 25. Expresión de las enzimas del metabolismo de la alanina y el lactato en ratones WT y *AnxA6*^{-/-}.

Expresión relativa de mRNA mediante PCR cuantitativa de homogenado de hígado de ratones WT y *AnxA6*^{-/-} a las diferentes horas de ayuno de las enzimas (A) alanina aminotransferasa 1 (ALAT1), (B) alanina aminotransferasa 2 (ALAT2) y (C) lactato deshidrogenasa (LDH) (n= 5-6 por genotipo).

Así, se demostró que en ausencia de *AnxA6* la expresión de las enzimas responsables de la metabolización de alanina y lactato aumentan en respuesta al ayuno.

8. Estudio de la implicación de la AnxA6 en la gluconeogénesis hepática a partir de alanina.

La alanina es el principal aminoácido gluconeogénico captado por el hígado [181, 182]. El primer nivel de regulación en el metabolismo de este aminoácido consiste en su captación mediante una serie de transportadores, mayoritariamente dependientes de Na^+ [182].

8.1 Captación de L-alanina en los hepatocitos.

Inicialmente se procedió al estudio de la captación de alanina en hepatocitos aislados de ratones WT y AnxA6^{-/-}. Así, se cuantificó la cantidad de alanina captada en los hepatocitos aislados con [¹⁴C]-L-alanina (0.1 $\mu\text{Ci}/400 \mu\text{l}$) a 2, 5 y 10 minutos de incubación [182]. Los resultados demostraron una muy baja capacidad de captación de [¹⁴C]-L-alanina por parte de los hepatocitos AnxA6^{-/-} a los tiempos estudiados, con una reducción del 83.5% respecto los hepatocitos WT a los 5 minutos (Figura 26A). Así se observó una cinética de captación lineal en el tiempo de [¹⁴C]-L-alanina para los hepatocitos WT a diferencia de los AnxA6^{-/-}.

8.2 Efecto de la AnxA6 en los transportadores de alanina.

En el hígado, se han identificado los transportadores del Sistema A, SNAT2 (SLC38A2 o ATA2) y SNAT4 (SLC38A4 o ATA3) mediando el transporte de alanina, entre otros. Además, el transportador SNAT3 (SLC38A3 o ATA4) del Sistema N, que principalmente transporta glutamina, también está implicado en la captación de alanina en el hígado. La actividad de estos transportadores es muy relevante durante la regeneración hepática [221, 330], la GNG [203, 332] y en la regulación del volumen celular [371]. El Sistema A, de la misma manera que el N, forma parte de la familia de transportadores SLC. Los transportadores de estos sistemas se encargan de la entrada de pequeños aminoácidos neutros, como la alanina a través de la membrana plasmática [220].

La expresión de los transportadores del Sistema A aumenta en el hígado en situación de ayuno en que la GNG está activada y la necesidad de sustrato es

elevada [372]. Además, tras la realización de una HP, se ha observado una redistribución del transportador SNAT2 a la membrana plasmática [331]. De esta manera, se procedió al análisis de la expresión, en homogenado de hígado de ratones WT y *AnxA6*^{-/-} durante el ayuno, de los transportadores SNAT2, SNAT4 (Sistema A) y SNAT3 (Sistema N).

En el hígado de ratones WT, la expresión relativa de todos ellos aumenta a las 6 horas de ayuno, tiempo en que, como se ha mostrado anteriormente, las reservas de glucógeno están agotadas. Esto demuestra la necesidad de la captación de aminoácidos para activar y llevar a cabo la GNG [332]. En cambio, en los ratones *AnxA6*^{-/-} no se observa un aumento en la expresión en los transportadores SNAT4 y SNAT3. La expresión relativa de SNAT2 sí aumenta en ausencia de *AnxA6* aunque con un pico máximo a las 10 horas de ayuno, 4 horas más tarde que los ratones WT (Figura 26B, 26C y 26D).

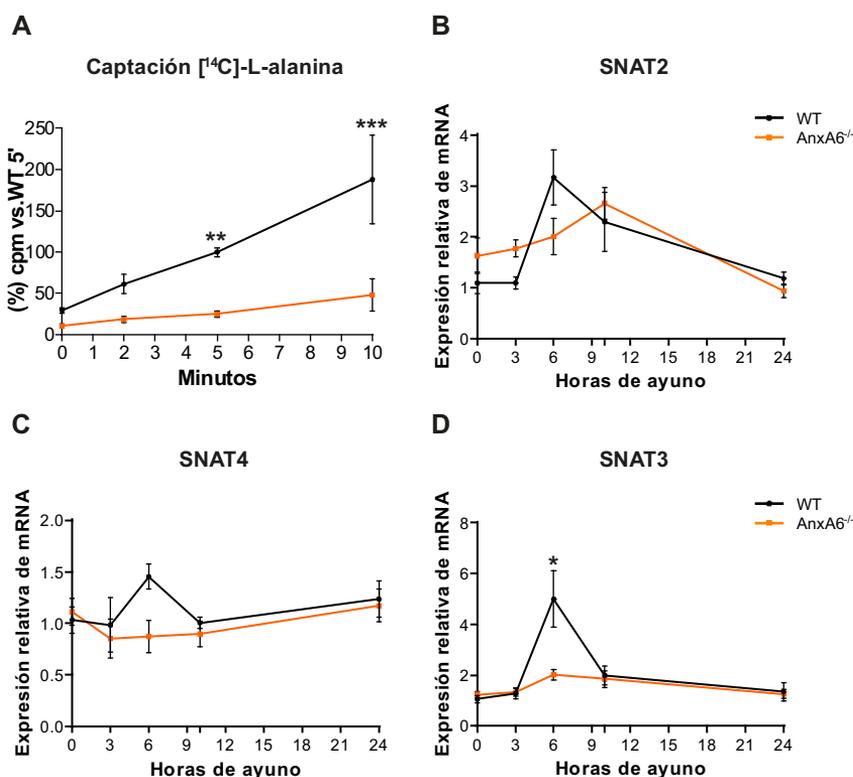


Figura 26. Transporte de alanina en los hepatocitos WT y *AnxA6*^{-/-}.

(A) Cantidad relativa de marcaje radioactivo equivalente a captación de [¹⁴C]-L-alanina en hepatocitos

aislados de ratones WT y AnxA6^{-/-} a lo largo de los tiempos indicados respecto el WT a 5 minutos (n=4). Expresión relativa de mRNA mediante PCR cuantitativa de homogenado de hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-} a las diferentes horas de ayuno de los transportes de aminoácidos del Sistema A (B) SNAT2, (C) SNAT4 y del Sistema N (D) SNAT3 (n= 5-6 por genotipo).

La captación de alanina por parte de estos transportadores se lleva a cabo en la membrana plasmática sinusoidal de los hepatocitos, ya que es en esta parte donde hay contacto e intercambio con los sustratos que llegan de la circulación. Para determinar la implicación directa de la ausencia de AnxA6 en la imposibilidad para transportar alanina, se aisló de membrana sinusoidal de hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-}, en condiciones control y tras 24 horas de ayuno, y se determinó la presencia del transportador en estas fracciones. Los resultados obtenidos sugieren una mayor presencia del transportador SNAT2 en las membranas sinusoidales de los hígados WT ante el ayuno respecto los ratones AnxA6^{-/-} (Figura 27A y 27B).

Por último, se estudió la posible interacción entre AnxA6 y el transportador SNAT2. Para ello se llevaron a cabo ensayos de *Pull down* con AnxA6 (Figura 27C) en hígado de ratón que confirman la interacción de SNAT2 con AnxA6.

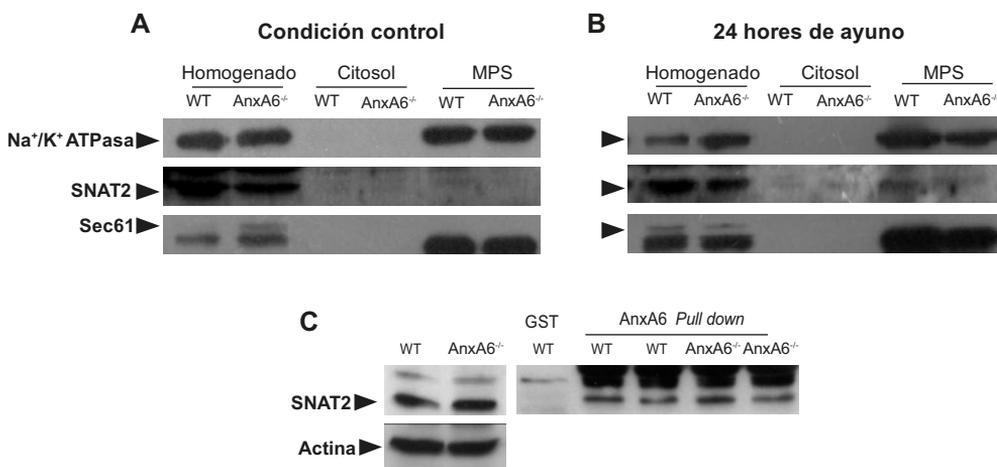


Figura 27. Estudio del transportador SNAT2 en ratones WT y AnxA6^{-/-}.

(A) Inmunodetección de Na⁺/K⁺-ATPasa, SNAT2 y Sec61 en fracciones aisladas de homogenado de hígado (H), citoplasma (C) y membrana plasmática sinusoidal (MPS) de ratones WT y AnxA6^{-/-} en condiciones (A) control de dieta de mantenimiento y bebida *ad libitum* y (B) 24 horas de ayuno (n = 3). (C) Inmunodetección de SNAT2 en homogenados de hígado de ratón WT y AnxA6^{-/-} y en los Pull down de AnxA6 de estos homogenados (n = 3).

Para finalizar, los resultados obtenidos sugieren que la captación de alanina en los hepatocitos AnxA6^{-/-} podría estar inhibida por una incapacidad del transportador del Sistema A de aminoácidos SNAT2 para llegar a la membrana plasmática sinusoidal durante el ayuno. En esta situación, la interacción de AnxA6 con SNAT2 podría ser el mecanismo mediante el cual, el sustrato gluconeogénico alanina no es captado en los hepatocitos provocando una menor producción de glucosa endógena.

DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de esta tesis se ha realizado el estudio de la función de Annexina A6 (AnxA6), una de las proteínas más abundantes en el hígado [67]. AnxA6 pertenece a una familia de proteínas altamente conservada de unión a fosfolípidos de membrana de forma dependiente de Ca^{2+} . Estudios previos en el laboratorio del Dr. Carles Enrich han demostrado una implicación directa de la AnxA6 en la homeostasis intracelular del colesterol, así como en el tráfico intracelular de vesículas y en la regulación de la vía de Ras/MAPK [34]. Es importante tener en cuenta que la mayor parte de los estudios realizados hasta el momento en el grupo han sido en modelos de sobreexpresión de AnxA6 en líneas celulares estables.

Concretamente, en este proyecto se ha estudiado el papel de la AnxA6 en el hígado, utilizando un modelo de ratón genoanulado para la proteína (AnxA6^{-/-}). Así, se ha descrito un papel esencial de AnxA6 durante la regeneración hepática, observándose una baja supervivencia en los ratones AnxA6^{-/-} tras una hepatectomía parcial (HP) en comparación con los ratones WT. Aun así, ante un aporte de glucosa, los ratones AnxA6^{-/-} sobreviven a la HP y recuperan la masa hepática correspondiente, demostrando que si bien es cierto que en ausencia de AnxA6 la regeneración hepática se encuentra inhibida, esto es debido a un problema energético.

En este estudio hemos definido un defecto en la homeostasis de glucosa, en que los ratones AnxA6^{-/-} eran incapaces de revertir la hipoglucemia tras la HP a diferencia de los ratones WT. Esto conlleva unos niveles de glucosa en sangre muy reducidos de forma permanente tras la HP, que podrían ser la causa de la muerte del animal.

Con estos resultados, se ha analizado la implicación de AnxA6 en la homeostasis de glucosa a nivel hepático. Los resultados obtenidos muestran que, en ausencia de AnxA6, la gluconeogénesis en situaciones de estrés agudo, como se da durante el proceso de regeneración hepática o el ayuno, se encuentra disminuida. La producción de glucosa endógena hepática a partir de uno de los sustratos gluconeogénicos principales, alanina, está alterada en los ratones AnxA6^{-/-}.

Además, se observó una inhibición en la captación de alanina por parte de hepatocitos aislados en ausencia de AnxA6.

Por último, en esta tesis, se demuestra la interacción entre AnxA6 y el transportador del Sistema A de aminoácidos SNAT2, de la familia de proteínas SLC, encargada de la entrada de alanina en el caso del hígado [220]. Así, se observó una incapacidad del transportador SNAT2 para alcanzar la membrana plasmática sinusoidal de los hepatocitos en condiciones de ayuno.

A continuación se discutirán en detalle estos puntos y se describirá el modelo propuesto para el papel de AnxA6 en el hígado.

1. Caracterización del ratón $AnxA6^{-/-}$.

La proteína AnxA6 se encuentra en casi en todos los tejidos de mamífero y es especialmente abundante en músculo esquelético, corazón, bazo, nódulos linfáticos e hígado [67]. A pesar de la amplia expresión, la única alteración que se ha observado en los ratones $AnxA6^{-/-}$ hasta el momento es a nivel cardíaco [105].

Los ratones genoanulados para la proteína de estudio Annexina A6 ($AnxA6^{-/-}$), en condiciones estándar de estabulación y alimentados con dieta de mantenimiento y agua *ad libitum*, son perfectamente viables. No muestran alteraciones fenotípicas y su longevidad es la esperada para el ratón de esta cepa. Aparentemente todas sus funciones orgánicas se encuentran preservadas, y la histología de los tejidos es comparable a los ratones control (WT). La colonia de ratones $AnxA6^{-/-}$ se reproduce y el número de crías es similar a los ratones WT [106].

También existen ratones genoanulados para otras annexinas como AnxA1 [373] y AnxA5 [374] que se han descrito viables y fértiles, con un fenotipo comparable a los ratones WT. En cambio, el ratón deficiente de AnxA7 es letal al décimo día del desarrollo embrionario y debe mantenerse en heterocigosis. El ratón $AnxA7^{+/-}$ presenta un defecto en el receptor inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), en la señalización de Ca^{2+} y en la secreción de insulina por las células β pancreáticas [375]. Por último, los ratones $AnxA2^{-/-}$, también viables y fértiles, han sido muy útiles para demostrar la implicación de AnxA2 en la regulación de la homeostasis de fibrina [27, 376].

Como se ha comentado, la única alteración descrita en los ratones $AnxA6^{-/-}$ es una mayor contractibilidad cardíaca debida a una eliminación mucho más rápida del Ca^{2+} citoplasmático durante la diástole [105]. AnxA6 es una de las proteínas más abundantes del miocardio y se localiza en el sarcolema. En las células de la musculatura lisa se asocia a actomiosina y a lípidos de las caveolas de forma dependiente de Ca^{2+} formando un complejo reversible que permite la contractilidad del miocardio [377].

La ausencia de un fenotipo evidente en la fisiología de los ratones $AnxA6^{-/-}$ no implica que AnxA6 no sea una proteína esencial teniendo en cuenta su

abundancia. Además, en los estudios *in vitro*, AnxA6 es una proteína pleiotrópica que interacciona con la membrana de forma dependiente de Ca²⁺ y el citoesqueleto de actina y está implicada en múltiples procesos celulares que van desde la homeostasis intracelular del colesterol, la remodelación del citoesqueleto de actina, el transporte endosomal y la señalización celular [34] de manera que, el déficit de esta proteína puede estar afectando a diferentes procesos celulares.

Debido a la gran abundancia de AnxA6 en el hígado nos planteamos estudiar su papel en este órgano. Así, inicialmente se analizó la estructura hepática y posteriormente, debido a su función en la homeostasis de colesterol intracelular descrita *in vitro*, se analizó la composición lipídica.

El estudio histológico del hígado de los ratones AnxA6^{-/-} mostró una arquitectura con lobulillos y hepatocitos estructuralmente comparable a los ratones WT. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión muestran hepatocitos aparentemente funcionales con la habitual disposición de los canalículos y espacios de Disse.

2. Composición lipídica del hígado de los ratones *AnxA6*^{-/-}.

El resultado más significativo del análisis lipidómico comparativo es la mayor concentración de ésteres de colesterol (EC) en el hígado de los ratones *AnxA6*^{-/-}, mientras que los niveles de colesterol libre no están alterados respecto a los ratones WT. Los EC son productos de la esterificación del colesterol con ácidos grasos (AG) a través de un enlace éster. Los EC se almacenan en el interior de los hepatocitos en cuerpos lipídicos (CL) [378]. Los CL difieren en su composición según el tipo celular, por ejemplo en adipocitos el colesterol libre presente corresponde al 30% del total y es rápidamente liberado cuando se elimina el colesterol de la membrana plasmática [379]. Contrariamente, en la mayoría de tipos celulares los CL típicamente contienen niveles muy reducidos de colesterol libre que se acumula en su forma esterificada [145]. Células como las del córtex adrenal, los ovarios y testículos contienen CL muy enriquecidos en EC como precursores de la síntesis de esteroides [380].

La acumulación de EC en el hígado se ha relacionado con diferentes patologías hepáticas, como la enfermedad de *Wolman* que consiste en la acumulación de EC celular. Estas enfermedades cursan con mutaciones en la lipasa ácida lisosomal (LAL) de manera que no se degradan los EC provocando hepatomegalia y acumulación en diferentes órganos [381]. Estudios en ratones deficientes para LAL, mantenidos con dietas bajas en colesterol, muestran una acumulación de EC en el hígado 100 veces superior a la normal y con una tasa de producción de colesterol más elevada. En los ratones *AnxA6*^{-/-}, los elevados niveles de EC en los homogenados de hígado no son tan significativos y además no parece provocar un fenotipo patológico como en el anterior caso. Aun así, la mayor concentración de EC puede deberse a una acumulación de CL en los hepatocitos o a una mayor captación de lipoproteínas en los hepatocitos [378, 382]. Sin embargo, la concentración de TAG y lipoproteínas en plasma en los ratones *AnxA6*^{-/-} son similares a los ratones WT. Por otro lado, la expresión en homogenados de hígado de ratón de Perilipina 2, una proteína residente en los CL [351], es mayor en

ausencia de AnxA6. Así, la mayor concentración de EC podría conllevar una mayor acumulación de CL.

La fosfolipasa citosólica A₂ (cPLA₂) es necesaria para la biogénesis de los CL. El tratamiento con inhibidores o la depleción de la cPLA₂ previene la formación de CL en células tratadas con ácidos grasos [383]. Por otra parte, estudios previos en nuestro grupo han descrito una menor actividad de la cPLA₂ en células que sobreexpresan establemente AnxA6 provocando una disminución de ácido araquidónico (AA) [74]. De esta forma, en ausencia de AnxA6, la actividad de la cPLA₂ podría ser mayor de manera que aumentarían los niveles de AA y la síntesis de EC.

Además, nuestro grupo realizó un cribado por doble híbrido en levadura (Y2H, *Yeast two hybrid*) con el fragmento N-terminal de AnxA6 contra una librería de mRNA de hígado de ratón en el que se detectó la interacción con la proteína Lipina-2. Las lipinas están involucradas en la síntesis de fosfolípidos y su ausencia provoca problemas metabólicos severos que cursan con el hígado graso [384]. De manera que, la ausencia de AnxA6 podría estar afectando la actividad de las lipinas provocando un desequilibrio lipídico.

AnxA6 está implicada en la regulación de la homeostasis intracelular de colesterol y la presencia o el déficit pueden provocar desequilibrios en la localización y niveles de colesterol celular [34]. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la sobreexpresión de AnxA6 provoca una acumulación y retención de colesterol libre en los endosomas tardíos conllevando una reducción de éste en el aparato de Golgi y la membrana plasmática [34]. En paralelo a esta tesis, se han generado fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, *mouse embryonic fibroblast*) a partir de animales AnxA6^{-/-}, que nos han permitido determinar el efecto de la ausencia de AnxA6 en la homeostasis de colesterol. A diferencia del hígado, las MEF AnxA6^{-/-} contienen aproximadamente un 50% más de colesterol libre que las células control. El marcaje con filipina, una tinción fluorescente que marca colesterol libre, muestra que en las células AnxA6^{-/-}, éste se encuentra mayoritariamente en la membrana plasmática, aunque también se observa en vesículas intracelulares, mientras que en las células WT el colesterol se observa en

compartimentos intracelulares [90]. Así, la ausencia de AnxA6 provocaría un aumento de colesterol libre intracelular que en los hepatocitos podría estar esterificándose y acumulándose en CL.

En el transporte de colesterol en los endosomas tardíos participan múltiples proteínas como las NPC, ORP y Rab7, entre otras. Previamente nuestro grupo ha demostrado la interacción de AnxA6 con NPC1 [75] y el análisis de Y2H determinó la interacción de AnxA6 con una proteína GAP reguladora de la actividad de Rab7. Alteraciones en estas proteínas mimetizan el fenotipo de acumulación de colesterol en los endosomas tardíos observado con la sobreexpresión de AnxA6 [34]. Rab7 se encuentra en los endosomas tardíos y participa en el transporte de estos desde los endosomas tempranos [385]. Resultados preliminares de nuestro grupo muestran que AnxA6 estaría inhibiendo Rab7 a través de su unión a la proteína GAP de manera que, al sobreexpresar AnxA6, el colesterol quedaría retenido en los endosomas tardíos y habría una menor esterificación. Siguiendo este razonamiento, en nuestro modelo de AnxA6^{-/-}, Rab7 se encontraría sobreactivado permitiendo la salida de colesterol de los endosomas tardíos que se podría dirigirse al retículo endoplásmico donde se esterificaría en EC, provocando la mayor concentración de estos observada en el hígado de ratones AnxA6^{-/-}.

3. Los ratones $AnxA6^{-/-}$ en el proceso de regeneración hepática.

Para estudiar la función de $AnxA6$ en el hígado del modelo *in vivo* de ratón $AnxA6^{-/-}$ se indujo un estrés agudo de carácter proliferativo y metabólico a nivel hepático. Para ello, se realizó una hepatectomía parcial (HP), procedimiento que desencadena un proceso regenerativo caracterizado por una respuesta altamente coordinada, proliferativa y metabólica [249].

La HP en los ratones $AnxA6^{-/-}$, estabulados en condiciones estándar con dieta de mantenimiento y *agua ad libitum*, induce un dramático incremento en la mortalidad de un 52% a las 48 horas y 81.5% a los 4 días post-HP. Además, los marcadores plasmáticos de funcionalidad hepática como las transaminasas ALAT y AST, y LDH aumentan a las pocas horas tras la HP en ambos genotipos. Los ratones $AnxA6^{-/-}$ no consiguen volver a los niveles iniciales de estos marcadores a diferencia de los ratones WT, sugiriendo una insuficiencia hepática.

Al ser un órgano esencial en la homeostasis de carbohidratos y lípidos, la producción de determinadas proteínas y factores de coagulación, producción y secreción de bilis y detoxificación de diversas sustancias y elementos patógenos, el hígado remanente debe hacer frente a una elevada presión por parte de todo el organismo para mantener las funciones fisiológicas básicas [241, 243]. La regeneración hepática no se lleva a cabo a partir de una única vía de activación, sino que se da como consecuencia de múltiples cascadas de señalización. Existen muchos ejemplos en la literatura en que la deficiencia de un determinado gen involucrado en alguna de estas vías de señalización puede inhibir la regeneración. Así, existen diferentes ejemplos de ratones genoanulados para genes que presentan defectos en el proceso regenerativo. En la mayoría de estos casos hay una elevada mortalidad tras la HP y un bloqueo en la síntesis de DNA. En ningún caso estas consecuencias son del 100%, indicando que no hay ningún gen que sea absolutamente esencial para la regeneración hepática y que las múltiples vías pueden actuar compensándose entre ellas [243].

Clásicamente, se define la regeneración hepática como un proceso coordinado que implica citoquinas, factores de crecimiento y una respuesta metabólica que conecta la función hepática con la activación proliferativa [243]. Así, AnxA6 podría estar afectando a alguna de estas vías.

Inmediatamente después de la HP hay un aumento de las citoquinas IL-6 y TNF α tanto a nivel de expresión relativa en el hígado como en la concentración en plasma [386]. Al analizar los niveles de expresión de estas citoquinas en los ratones AnxA6^{-/-} tras la HP observamos una disminución de ambas a las 6 horas post-HP. Se ha descrito que, mientras los ratones genoanulados para el receptor de TNF α tienen múltiples alteraciones en el proceso de regeneración, los ratones deficientes para TNF α son capaces de llevar a cabo un proceso completo indicando que esta citoquina no es esencial, ya que otros ligandos del receptor podrían realizar la misma señalización [258]. De este modo, en el caso de los ratones AnxA6^{-/-}, podría haber compensación por otras moléculas a la deficiencia en TNF α .

También se ha descrito la expresión de un 40% de genes tempranos de forma dependiente de IL-6 durante el proceso de regeneración hepática [298, 387]. Además, ratones genoanulados para IL-6 presentan problemas durante la regeneración que se caracterizan por necrosis y fallo hepático [263]. La supervivencia de estos ratones IL-6^{-/-} es de un 20% a los 7 días post-HP y la administración de IL-6, 30 minutos antes de la cirugía, aumenta la supervivencia y resuelve la deficiencia en la regeneración hepática [259].

La importancia de estas citoquinas en la regeneración plantea una posible causa para la elevada mortalidad de los ratones AnxA6^{-/-} indicando que de alguna manera, AnxA6 tendría un papel en la activación de la expresión TNF α e IL-6.

En el hígado TNF α se une a su receptor TNFR1 de las células de Kupffer y los hepatocitos, y activa NF- κ B. A su vez, NF- κ B promueve la transcripción de TNF α e IL-6, que serán secretados creando una regulación positiva [243]. Recientemente se ha descrito en condrocitos la interacción de AnxA6 con p65, una de las proteínas que forman parte del heterodímero de NF- κ B [101]. La activación canónica de la señalización de NF- κ B se lleva a cabo mediante la activación del

complejo IKK permitiendo la fosforilación y degradación de I κ B α que inhibe el complejo p50/p65. NF- κ B es translocado al núcleo, donde activa la transcripción de múltiples genes diana como TNF α e IL-1 [388]. En el estudio en condrocitos, la ausencia de AnxA6 provoca una menor activación y translocación de NF- κ B al núcleo y consecuentemente una disminución de la expresión de IL-1 y TNF α [101]. Con estas observaciones podemos postular que la disminución de la expresión relativa de estas citoquinas tras la HP podría ser debida a que, en ausencia de AnxA6, NF- κ B no se transloca al núcleo y como consecuencia se da una reducción en la transcripción de IL-6 y TNF α .

A pesar del efecto de la ausencia de AnxA6 en la expresión de estas citoquinas, no se observan alteraciones en la expresión de los genes tempranos analizados, necesarios para la regeneración hepática, demostrando que la fase de activación se produce adecuadamente y la disminución en la expresión de citoquinas podría estar compensada por otros mecanismos.

Por otra parte, los factores de crecimiento mitogénicos, HGF y EGF, son también claves en el proceso de regeneración hepática como encargados de la activación proliferativa de los hepatocitos [249]. Estos factores provocan una cascada de señalización tras la unión y estimulación de sus receptores tirosina quinasa, c-Met en el caso de HGF [268] y EGFR por parte de sus múltiples ligandos como TGF α , Amfiregulin y EGF [241]. La activación con EGF en hepatocitos aislados en ausencia de AnxA6 se prolonga hasta los 60 minutos a diferencia de los WT que finaliza a los 30 minutos. Esta prolongada cinética de activación podría indicar una compensación por parte de esta vía a la menor expresión relativa de las citoquinas TNF α e IL-6. Por otra parte, se ha descrito que AnxA6 regula diversos efectores de EGFR inhibiendo la cascada de señalización derivada de la activación del receptor [70], pudiendo explicar porque, en los ratones AnxA6^{-/-} esta vía presenta una cinética de activación diferente. Además, la expresión relativa de c-Met a las 6 horas post-HP es mayor en ausencia de AnxA6, hecho que apoyaría la hipótesis de que esta vía estaría compensando la menor expresión de citoquinas. Así, no se han observado cambios en la entrada a fase S en los hepatocitos AnxA6^{-/-} tras la HP respecto los ratones WT.

Al contrario de muchos modelos deficientes en regeneración, tras la HP los ratones AnxA6^{-/-} progresan a través del ciclo celular con normalidad, al menos hasta la mitosis. En ausencia de AnxA6 se observa una reducción en el porcentaje de mitosis a las 48 horas post-HP, coincidiendo con el momento en que la supervivencia de los ratones AnxA6^{-/-} es cada vez menor. Existen diferentes estudios que demuestran que los hepatocitos del hígado en regeneración pueden llegar a replicar el DNA con total normalidad, pero presentar una mitosis inhibida. Este es el caso, por ejemplo de los ratones genoanulados para el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2, *Nuclear factor erythroid 2-related factor*), que es indispensable para la regulación de ciclina A y la cascada de señalización de Wee1/Cdc2/ciclina B1. Estos ratones presentan un retraso en la entrada a mitosis debido a una desregulación en dicha cascada. Aun así, estos ratones sobreviven tras la HP y aunque muestran una diferente cinética de crecimiento del hígado remanente, la masa inicial se recupera parcialmente a los 7 días post-HP [389]. Teniendo en cuenta que los ratones AnxA6^{-/-} replican el DNA al mismo tiempo que los ratones WT y que aquellos que consiguen sobrevivir tras la HP acaban recuperando la masa hepática inicial, la deficiencia en AnxA6 no estaría provocando un impedimento en la proliferación de los hepatocitos, sino que probablemente el menor índice mitótico estaría reflejando la muerte de los animales antes de llegar a esta fase.

4. Alteraciones del metabolismo hepático durante la regeneración.

Durante la respuesta regenerativa se genera una importante red de adaptaciones metabólicas con la finalidad de mantener las funciones del hígado, en una situación de reducción de masa hepática, y promover la proliferación celular [248]. Los hepatocitos remanentes tras la HP deben obtener energía suficiente para hacer frente a una elevada demanda metabólica derivada de la reducción del número células hepáticas y el proceso de activación proliferativa para reestablecer la masa inicial [303].

Tras la HP, los ratones *AnxA6^{-/-}* presentan una acumulación máxima de CL a las 36 horas, a diferencia de los ratones WT que es a las 24 horas. Además esta acumulación es significativamente menor a las 12 horas en ausencia de *AnxA6*. A pesar de estas diferencias, la concentración de TAG en el hígado es comparable en ambos genotipos, así como la movilización de ácidos grasos (AG) por parte del tejido adiposo. Esta alteración en la acumulación de CL podría indicar que la ausencia de *AnxA6* retrasa su formación o bien que los hepatocitos *AnxA6^{-/-}*, tras la HP, están metabolizando más lípidos para hacer frente a la elevada demanda energética.

La caveolina es un componente esencial de las caveolas que tiene la habilidad de crear dominios altamente ordenados en la superficie celular. En las caveolas se llevan a cabo diversos procesos de señalización y ordenación de membrana, de forma dependiente del ambiente lipídico y proteico [390]. Tanto caveolina como las caveolas han sido descritas como elementos clave en la regulación intracelular de la homeostasis lipídica, activación celular y proliferación. Además, se ha relacionado caveolina como necesaria para la formación de CL [80] y se ha visto asociada con los CL formados tras la HP [391]. Al mismo tiempo, estudios previos en nuestro laboratorio han descrito que ante una sobreexpresión de *AnxA6* se produce una reducción del 50% en el número de caveolas de la membrana plasmática como resultado de una retención de caveolina en Golgi provocado por el desequilibrio en la homeostasis intracelular de colesterol [75]. No obstante, la

formación de CL en el hígado de ratones $AnxA6^{-/-}$ no se encuentra inhibida y el retraso en la acumulación de CL observado puede ser debido a una mayor lipólisis de estos orgánulos. Esto también se relaciona con el hecho de que tras la HP, los ratones $AnxA6^{-/-}$ presentan unos niveles muy bajos de glucosa en plasma sanguíneo. Para compensar la hipoglucemia, la lipólisis podría estar sobreactivada para hacer frente a la elevada demanda energética y el hígado estaría experimentando una mayor β -oxidación para la obtención de energía en forma de ATP y la producción de cuerpos cetónicos como fuente energética para otros órganos extrahepáticos como el sistema nervioso central. Con esta situación energética se explicaría la menor acumulación de CL tras la HP en los hígados de ratones $AnxA6^{-/-}$.

Al realizar una resección del 60% de la masa hepática el hígado pierde una gran parte del glucógeno almacenado, así como la capacidad gluconeogénica al verse reducida la población de hepatocitos, todo ello provocando una disminución de la glucosa en sangre que puede llegar a ser del 70% [300, 332]. Por esta razón, se activa en el hígado la maquinaria gluconeogénica y se suprime la actividad glucolítica [284]. También se ha descrito que esta hipoglucemia es necesaria para que se dé la respuesta regenerativa, quizá promoviendo la secreción de hormonas que llevan a un metabolismo catabólico a nivel sistémico, como el glucagón. Esta respuesta induce la lipólisis en el tejido adiposo para promover la captación de NEFA y la acumulación de CL en el hígado regenerante [284, 307].

La hipoglucemia progresa mucho más rápida y de forma más acusada en ausencia de $AnxA6$ reduciéndose en más de un 50% durante la primera hora post-HP a diferencia de los ratones WT, que mantienen los niveles normales hasta las 3 horas post-HP. Además, en comparación con los ratones WT que recuperan la glucemia normal a partir de las 24 horas post-HP, los $AnxA6^{-/-}$ muestran niveles muy bajos de glucosa en sangre sin volver a los valores de euglucemia. Estos resultados podrían indicar un posible coma hipoglucémico como causa de la muerte. El cerebro necesita constantemente el aporte de glucosa para su correcto funcionamiento [392]. La hipoglucemia severa induce una muerte neuronal masiva en ciertas regiones del cerebro más vulnerables como el hipocampo, el núcleo estriado y el córtex cerebral. Esta muerte neuronal, que se da en una situación de daño cerebral

ante una hipoglucemia, ha sido relacionada con una mayor producción de especies reactivas de oxígeno [356].

Los carbohidratos son la principal fuente energética en situaciones de daño hepático, necrosis o tras la HP. Sin embargo, en la literatura se apunta a la suplementación de glucosa como regulador negativo del proceso de regeneración [312], probablemente debido a una disminución de la tolerancia a la glucosa en estas condiciones [393]. La principal causa de esta intolerancia posiblemente se deba a un aumento en la β -oxidación de AG durante la regeneración, que incrementa la producción de NADH y acetyl-CoA. Este desequilibrio provoca la disminución de la entrada de piruvato a la mitocondria, inhibiéndose la oxidación de glucosa [394]. De todos modos, estos estudios se basan en la infusión de glucosa a elevadas concentraciones. Además, el efecto inhibitorio de la glucosa en la regeneración hepática no se observa cuando los animales son mantenidos con dietas ricas en carbohidratos o se administra glucosa en solución previamente a la realización de la HP [395, 396]. En base a ello, se realizaron las HP en ratones a los que se les suplementó el agua de bebida con el 10% de glucosa desde 72 horas antes y se analizó la capacidad de los ratones $AnxA6^{-/-}$ para llevar a cabo el proceso de regeneración hepática. Los resultados obtenidos demuestran que, con el aporte extra de glucosa, los ratones $AnxA6^{-/-}$, que no sobrevivían más allá de las 48-72 horas, sobreviven, son capaces de regenerar y recuperar la masa hepática inicial, de la misma manera que los ratones WT. Además, en estas condiciones, los ratones $AnxA6^{-/-}$ recuperan los niveles normales de glucosa en sangre a las 24 horas y el proceso esteatótico se desarrolla con normalidad en ambos genotipos, sugiriendo que la suplementación de glucosa es suficiente para mantener las necesidades energéticas y la acumulación de lípidos necesaria para el proceso regenerativo hepático.

Existen diversos modelos de ratones genoanulados en los cuales la administración de glucosa facilita o permite que el proceso de regeneración hepática se lleve a cabo. Un ejemplo son los ratones genoanulados para caveolina 1, que presentan un proceso regenerativo deficiente con una inhibición en la acumulación de CL y una elevada mortalidad. Este fenotipo es completamente revertido cuando la HP se

realiza en ratones que han sido mantenidos con glucosa en agua días antes y tras la HP [311].

Por último, los cortes histológicos con tinción de PAS muestran cómo, a diferencia de las HP llevadas a cabo sin glucosa, a las 48 horas post-HP los ratones AnxA6^{-/-} son capaces de almacenar glucógeno hepático, aunque los depósitos son menores que en los ratones WT, indicando una elevada dependencia a la glucosa suplementada en ausencia de AnxA6.

5. Los ratones $AnxA6^{-/-}$ tienen un defecto en la homeostasis hepática de glucosa.

Llegados a este punto se hace evidente la implicación de AnxA6 en la homeostasis de glucosa. Existen múltiples causas que pueden provocar una situación de hipoglucemia como por ejemplo el ayuno prolongado, el ejercicio intenso o una hiperinsulinemia provocada por un fallo en la administración exógena de insulina en pacientes diabéticos, entre muchas otras.

En condiciones control, la homeostasis de glucosa en ausencia de AnxA6 no se encuentra alterada. Los ratones son sensibles a glucosa e insulina tal como se observó al realizar los test de tolerancia. En cambio se detectó una acumulación significativa de glucógeno en el hígado de los ratones $AnxA6^{-/-}$ en comparación con los ratones WT.

Durante el estadio postprandial, el hígado capta glucosa de la sangre que se almacena en forma de glucógeno, se deriva a la glucólisis donde se oxida completamente para la producción de ATP, o se convierte a AG o aminoácidos. Durante el ayuno, el glucógeno es degradado para secretar glucosa al torrente sanguíneo y proveer así a todo el organismo [128].

Una explicación para que en condiciones estándar de estabulación los ratones $AnxA6^{-/-}$ almacenen más glucógeno sería que, en ausencia de AnxA6 los ratones tengan una ingesta más elevada. Esta hipótesis fue descartada al realizar el estudio de la ingesta con cámaras metabólicas, donde se demostró que la ingesta era equivalente para ambos genotipos.

Con el fin de forzar una situación de hipoglucemia, los ratones fueron privados de la dieta de mantenimiento para realizar un estudio del metabolismo en una situación de ayuno. De nuevo, como se observó tras la HP, los ratones $AnxA6^{-/-}$ no son capaces de mantener la euglucemia durante el mismo tiempo que los ratones WT.

Las hormonas insulina/glucagón regulan de forma antagónica los niveles de glucosa en sangre, activando e inhibiendo diferentes vías de degradación de glucógeno, glucólisis y gluconeogénesis (GNG). Durante el ayuno, los niveles de insulina decrecen y aumentan los de glucagón y catecolaminas, de manera que se inhibe la síntesis de glucógeno induciéndose su degradación y se activa la GNG, al tiempo que se suprime la glucólisis [128, 397].

En ausencia de AnxA6 se ha demostrado que el hígado es capaz de almacenar glucógeno y degradarlo cuando la situación metabólica lo requiere. En las condiciones estudiadas en esta tesis, HP y ayuno, los ratones AnxA6^{-/-} son capaces de degradar el glucógeno de manera que se descarta la incapacidad para mantener la homeostasis de glucosa como consecuencia de un problema en el almacenaje y degradación de glucógeno. Así, a las 10 horas de ayuno los depósitos de glucógeno se han agotado, aunque esta disminución durante las 3 primeras horas es más rápida en ausencia de AnxA6. La mayor degradación en ausencia de AnxA6 claramente indica una elevada tasa de glucogenólisis para hacer frente a la rápida disminución de la concentración de glucosa en sangre.

Inmediatamente después de la HP, los niveles de insulina decrecen significativamente más rápido en los ratones AnxA6^{-/-}, correlacionando con la dramática bajada de glucosa en sangre. Curiosamente los niveles de glucagón en sangre también decrecen a estos mismos tiempos para ambos genotipos manteniéndose bajos hasta las 12 horas post-HP, momento en que los niveles de glucagón en plasma aumentan en relación a la hipoglucemia. La implicación de las hormonas insulina/glucagón durante la HP fue muy estudiada en la década de los 70. Se describió un efecto supresor del glucagón sobre la síntesis de DNA, que era estimulada por insulina en hepatocitos aislados de rata [398]. Ésta puede ser la razón por la cual durante las primeras horas el glucagón, que debería estar respondiendo a los bajos niveles de glucosa en sangre, no aumenta. A tiempos más prolongados, a partir de las 12 horas, el glucagón se encargaría de mantener los niveles de glucosa en sangre en respuesta a la hipoglucemia y compensar los niveles altos de insulina que se observan en este tiempo post-HP. La insulina es imprescindible durante la regeneración hepática, siendo su señalización necesaria para que se dé la activación mitogénica propia de la respuesta regenerativa [241].

Además, numerosos estudios remarcan la implicación de la insulina en la proliferación hepática, tanto en un proceso de regeneración como en el cultivo *in vitro* de hepatocitos [280, 318, 354, 399]. El aumento de los niveles de insulina a las 12 horas puede deberse a la necesidad de esta hormona en la activación de la fase de replicación del DNA. Así, se ha propuesto que a pesar de las acciones opuestas de estas hormonas en el hígado, por lo que respecta al metabolismo de carbohidratos y lípidos, durante la regeneración hepática ambas hormonas estarían actuando sinérgicamente [282, 354].

Durante el ayuno, los niveles de ambas hormonas se encuentran en concentraciones que correlacionan con los niveles de glucosa en sangre, demostrando una normalidad en dicha regulación hormonal. De nuevo, los niveles de insulina decrecen significativamente más rápido en ausencia de AnxA6 como lo hacen los niveles de glucosa en sangre.

Durante el ayuno, el glucagón, así como las catecolaminas y el péptido natriurético, promueven la lipólisis en el tejido adiposo para liberar NEFA al torrente sanguíneo, siendo la principal fuente de AG en el hígado, que los almacena en CL [134, 400]. Curiosamente los niveles de AG en plasma sanguíneo en los ratones AnxA6^{-/-} tras 24 horas de ayuno son mayores que en los ratones WT. Además se cuantificaron CL de mayor tamaño en los ratones AnxA6^{-/-} indicando la capacidad de estos hepatocitos para almacenar gran cantidad de lípidos. Durante el ayuno, el hígado aparte de secretar la glucosa que proviene de la glucogenólisis y la GNG, también secreta TAG para su utilización por parte de los tejidos extrahepáticos en forma de VLDL [127, 128]. En este sentido, la concentración de TAG en plasma es más del doble en ausencia de AnxA6, indicando posiblemente una mayor secreción hepática.

A diferencia de lo que ocurre durante el ayuno, tras una HP no se observan diferencias en el aumento de la concentración de AG y TAG en plasma entre ambos genotipos. Además, en esta condición los ratones AnxA6^{-/-} no presentan una mayor acumulación de CL en el hígado; de hecho ésta es ligeramente menor. De acuerdo con esto, al tratar hepatocitos aislados de ratones AnxA6^{-/-} con ácido oleico se detecta también una menor acumulación de CL. Estos resultados

Los ratones AnxA6^{-/-} tienen un defecto en la homeostasis hepática de glucosa ———

sugieren que, en condiciones en que la concentración de AG externa es similar, los hepatocitos deficientes en AnxA6 acumulan menos CL, hecho que podría sugerir una mayor lipólisis y posiblemente más β -oxidación para la producción de ATP y cuerpos cetónicos.

Los resultados discutidos hasta el momento sugieren que en ausencia de AnxA6, y ante una situación metabólica de privación de nutrientes, los ratones no son capaces de mantener la homeostasis de glucosa y posiblemente compensan la demanda energética del propio hígado y de todo el organismo mediante el catabolismo lipídico.

6. Papel de Annexina A6 en la gluconeogénesis hepática.

Como ya ha comentado, el hígado juega un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis de glucosa en sangre. Para ello, capta glucosa y la almacena tras la ingesta, y la secreta durante una situación de ayuno. De esta manera, el hígado provee de glucosa a todos los tejidos extrahepáticos, principalmente al cerebro. La glucosa secretada por el hígado proviene de la degradación de los depósitos de glucógeno y de la producción de glucosa a través de la GNG a partir de diferentes sustratos como lactato, aminoácidos y glicerol [128].

Con los resultados descritos hasta el momento, se pueden descartar problemas en la síntesis y degradación de glucógeno, y en la regulación de las hormonas insulina/glucagón como causas de la hipoglucemia detectada en los ratones deficientes en AnxA6, sugiriendo una implicación de AnxA6 en la GNG.

La GNG es un proceso mediante el cual se produce glucosa a partir de precursores no glucídicos. La tasa de GNG está determinada por la disponibilidad de los sustratos y la activación de enzimas gluconeogénicas, reguladoras esenciales del proceso como la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la fructosa-1,6-bisfosfatasa (F1,6Pasa). Estas enzimas son esenciales y su depleción o inhibición de la actividad provoca deficiencias en la GNG [194, 195, 365]. La expresión relativa de estas enzimas durante la privación de nutrientes muestra un aumento a medida que el ayuno es más prolongado, pero sin diferencias entre ambos genotipos, indicando una activación normal de estas vías [128, 179].

A pesar de no detectarse cambios en la expresión de estas enzimas, la ausencia de AnxA6 podría estar afectando a su actividad. En el caso de la deficiencia de G6Pasa, los ratones presentan un fenotipo que mimetiza la enfermedad de *Von Gierke* o glucogenosis tipo I (GSD-I) [193]. La GSD-I es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva poco frecuente que consiste en una deficiencia en la G6Pasa que provoca una acumulación anormal de glucógeno, impidiendo la secreción de glucosa a la sangre y por lo tanto hipoglucemia [401]. Aunque los

ratones AnxA6^{-/-} acumulan más glucógeno, la degradación en condiciones de ayuno y tras una HP se lleva a cabo, descartándose un problema en la actividad de la enzima G6Pasa.

El análisis *in vivo* de la GNG a partir de diferentes sustratos mostró resultados muy relevantes. En ausencia de AnxA6 los ratones hipoglucémicos tras 24 horas de ayuno, en que las reservas de glucógeno se han agotado, son incapaces de producir glucosa mediante GNG a partir de alanina.

Por otra parte, la administración de otros sustratos gluconeogénicos demostró que los ratones AnxA6^{-/-} pueden producir glucosa a partir de piruvato, primer intermediario de la GNG [179]. También producen glucosa a partir de glicerol, sustrato que normalmente deriva de la lipólisis de TAG. Sin embargo, la GNG a partir de lactato es menor y a partir de glutamina aumenta a los 30 minutos tras la administración, pero disminuía rápidamente.

Desde los estudios pioneros del fisiólogo francés Claude Bernard, la comunidad científica considera el hígado como la mayor fuente de producción endógena de glucosa en cualquier situación postabsortiva [366]. De todas formas, la GNG también puede llevarse a cabo en el riñón y el intestino, particularmente durante el ayuno [184, 186]. Solo estos órganos pueden realizar GNG por ser los únicos que expresan la enzima G6Pasa, de manera que solo estos pueden defosforilar la G6P a glucosa para poder ser secretada [179].

Existen diferentes sustratos específicos para la producción de glucosa en cada órgano. Por ejemplo, la alanina y el lactato se consideran específicos del hígado, mientras que existen otros sustratos generales como la glutamina y el glicerol que también lo son del riñón y el intestino [402]. En el riñón, el principal sustrato gluconeogénico es la glutamina [403, 404] representando el 25% de la glucosa producida *in vivo* [368], pudiendo llegar a ser del 50% en condiciones de ayuno prolongado [185].

Para descartar que la producción de glucosa *in vivo* sea el reflejo de la GNG en otros tejidos a parte del hígado, se analizó la producción de glucosa en hepatocitos aislados en cultivo primario. Con estos experimentos se demostró que

efectivamente, los hepatocitos AnxA6^{-/-} no son capaces de producir glucosa a partir de alanina.

Las posibles causas de esta reducción podrían deberse a un problema en el transporte o a un problema en el metabolismo del sustrato. Al realizar el ensayo de captación de [¹⁴C]-L-alanina en hepatocitos aislados, se observó una drástica inhibición de la captación de alanina en ausencia de AnxA6. Esto sugiere que la ausencia de AnxA6 podría estar alterando el transporte de alanina.

Existen diversos transportadores de aminoácidos en el hígado, algunos de ellos pueden transportar diferentes aminoácidos neutros. De esta manera, las diferencias observadas en la producción de glucosa a partir de glutamina observada *in vivo* y muy ligeramente en los hepatocitos aislados de los ratones AnxA6^{-/-}, puede estar relacionada con un problema en la captación de aminoácidos como ocurre con alanina. Por otra parte, la producción de glucosa *in vivo* que observamos a partir de glutamina puede deberse a la GNG renal, ya que, como se ha mencionado, este es el principal sustrato en este órgano [179].

Por otra parte, la concentración de alanina en plasma e hígado decrece significativamente en los ratones WT a las 24 horas de ayuno a diferencia de los ratones AnxA6^{-/-} que se mantiene como en la situación control. Los niveles elevados de alanina en plasma, que no decrecen tras el ayuno en ausencia de AnxA6, podrían ser indicativos de la inhibición de la captación de alanina en los hepatocitos. Además, los niveles de alanina en hígado que se observan en los ratones AnxA6^{-/-} podrían ser fruto de una mayor proteólisis.

Si tenemos en cuenta que el transportador monocarboxilado (MCT) de lactato es el mismo que el de piruvato [405], y que la producción de glucosa frente a piruvato no se encuentra alterada, se descartaría un problema en el transporte de lactato como causa de la reducción en la GNG observada a partir de este sustrato. Asimismo, la expresión relativa de la enzima lactato deshidrogenasa, encargada del paso de lactato a piruvato, no se encuentra afectada.

Por otro lado el glicerol entra en los hepatocitos por transporte pasivo facilitado y se ha descrito la aquoporina-9 como proteína implicada en este transporte en

condiciones de elevado requerimiento gluconeogénico [190, 191]. Aun así, la administración de glicerol en ratones genoanulados para aquaporina-9 provoca un aumento en la producción de glucosa sugiriendo la presencia de otros transportadores de glicerol [190].

Una hipótesis que podría explicar la menor producción de glucosa a partir de lactato y glicerol, asumiendo que el transporte de estos sustratos no está afectado, sería, que la ausencia de AnxA6 provocase un desequilibrio *redox* que podría afectar a las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (Figura 1). En una situación celular en que la ratio NADH/NAD^+ fuera muy elevada, el sentido de la reacción enzimática de LDH y G3PDH se vería equilibrado hacia la producción de lactato y glicerol-3-fosfato, respectivamente, produciéndose menos glucosa. Una mayor tasa de β -oxidación, de ciclo de Krebs o de glucólisis, son las posibles causas de este desequilibrio que llevarían a una mayor concentración de NADH intracelular [175].

Además, la alanina inhibe la glucólisis a través de la piruvato quinasa del hígado (PK-L), de la misma manera que el glucagón o el ATP. De esta forma, la alanina inactiva la oxidación de glucosa promoviendo la GNG. En ausencia de AnxA6, la alanina no es captada por los hepatocitos de forma que la inhibición de la glucólisis sería menor. La mayor actividad de la PK-L podría producir una reducción de los niveles de fosfoenolpiruvato aumentando el flujo glucolítico y como consecuencia la mayor producción de NADH. Esto podría producir el aumento de la ratio de NADH/NAD^+ y consecuentemente la reducción en la actividad de las enzimas LDH y G3PDH, de nuevo provocando una menor producción de glucosa en ausencia de AnxA6.

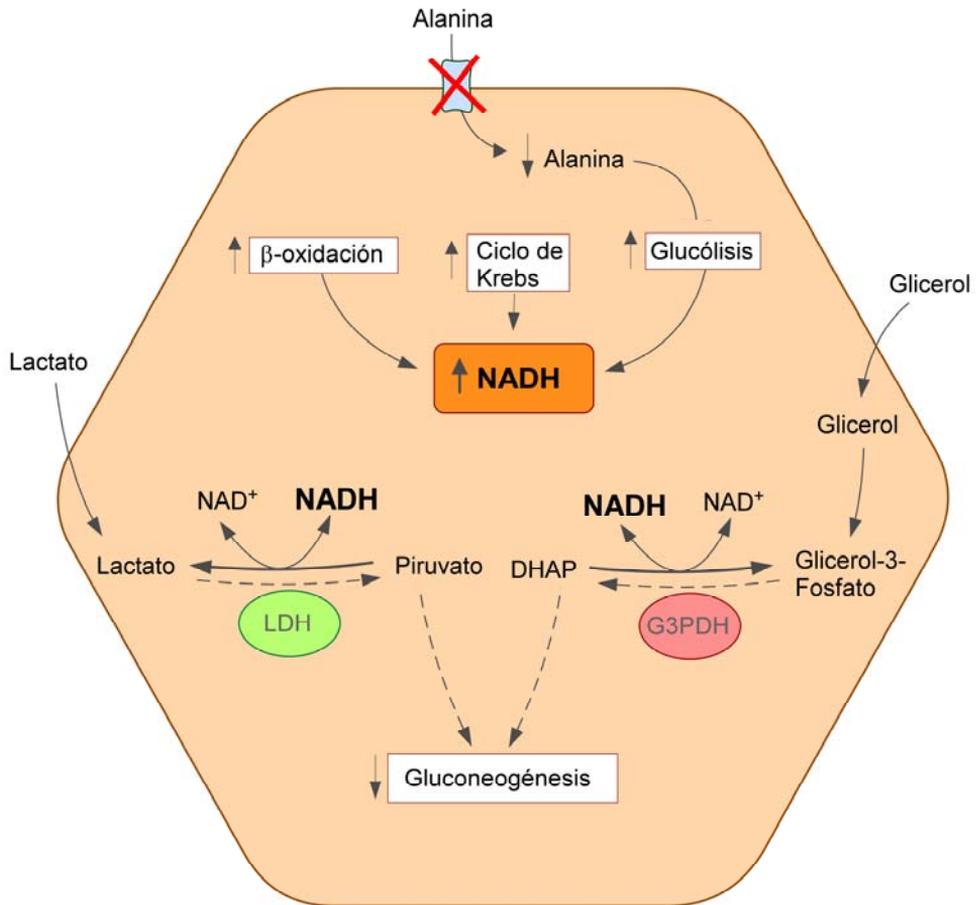


Figura 1. Esquema de las diferentes vías que aumentan la producción de NADH en los hepatocitos. El aumento de la glucólisis, ciclo de Krebs y glucólisis producen NADH provocando un desequilibrio *redox*. Las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) estarían alteradas produciéndose menos piruvato y dihidroxiacetona fosfato (DHAP), respectivamente. En ausencia de alanina no se inhibe la piruvato quinasa (PK) y por tanto la glucólisis no se suprime acumulándose más NADH.

Teniendo en cuenta que en ausencia de AnxA6, ante una situación de ayuno o tras la HP, los ratones son incapaces de mantener la homeostasis de glucosa, es muy posible que el hígado esté compensando el déficit energético mediante la sobreactivación de la β -oxidación. Evidencias de ello se muestran durante el ayuno en que los niveles de AG en sangre son ligeramente mayores en los ratones AnxA6^{-/-}, indicando un mayor requerimiento lipídico general del organismo que

compensaría la incapacidad para mantener la homeostasis de glucosa. El área de los CL en los hepatocitos de ratones *AnxA6^{-/-}* ayunados es mucho mayor, indicando que estarían acumulando muchos más lípidos, probablemente como consecuencia de la mayor presencia de AG en sangre. En cambio, cuando la cantidad de AG que llega a los hepatocitos es la misma, como ocurre tras la HP o en el caso de hepatocitos aislados incubados con ácido oleico, la acumulación de CL es menor sugiriendo una mayor lipólisis y posiblemente más β -oxidación para la producción de ATP y cuerpos cetónicos. Todo ello podría explicar un mayor aumento de NADH y por lo tanto una alteración en la producción de glucosa a partir de lactato y glicerol. Por otro lado, el glicerol captado por los hepatocitos en ausencia de *AnxA6* podría estar destinado a la síntesis de TAG.

Así, el hígado de los ratones *AnxA6^{-/-}* es incapaz de producir glucosa mediante la GNG a partir de alanina. Esto es muy relevante en el contexto de regeneración hepática, teniendo en cuenta que se ha descrito una elevada demanda de alanina tras la HP, y partiendo de que este aminoácido es el principal sustrato gluconeogénico durante la regeneración hepática [182]. Cabe destacar, además, que la administración de alanina *in vivo* en ratones *AnxA6^{-/-}* a las 24 horas post-HP, tampoco revertía la glucemia a diferencia de los ratones WT, probablemente como consecuencia de la menor captación de alanina. Además, postulamos que esta menor captación de alanina, o la adaptación del organismo a un posible aumento del consumo de lípidos, podrían causar la menor GNG observada a partir de lactato y glicerol.

7. Implicación de Annexina A6 en el transporte de alanina.

El transporte de alanina en ausencia de AnxA6 en hepatocitos aislados de ratón, como ya se ha discutido, se encuentra inhibido. La alanina es el principal sustrato gluconeogénico y fuente de la mayor parte de piruvato citoplasmático en el hígado [181]. El primer paso en su metabolismo consiste en su transporte a través de la membrana plasmática que depende de factores hormonales, como la insulina y el glucagón según el tipo celular, [406-408] o de la dieta [409]. Así el contenido de alanina en sangre tras la ingesta o el ayuno regula la enzima alanina aminotransferasa (ALAT). Esta enzima presenta dos isoformas, ALAT1 y ALAT2 [370]. En el hígado de ratones *AnxA6^{-/-}*, la expresión relativa de ALAT1 es normal, mientras que ALAT2 presenta una menor expresión, hecho que podría ser una consecuencia de la menor captación de alanina.

Los principales transportadores encargados de la captación de aminoácidos gluconeogénicos en el hígado son los transportadores del Sistema A y N de la familia de proteínas SLC38 [217]. Estos transportadores se encargan del paso a través de la membrana plasmática de pequeños aminoácidos neutros como la alanina, la glutamina, la histidina, la treonina entre otros. En el Sistema A el aminoácido es cotransportado con Na^+ mientras el Sistema N, aparte de cotransportar Na^+ , también se intercambian H^+ [217].

En el hígado se expresan los transportadores SNAT2 y SNAT4 del Sistema A, y SNAT3, SNAT5 y SNAT7 del Sistema N [217]. Se ha descrito que la mayoría de alanina captada se da a través de los transportadores SNAT2, SNAT3 y SNAT4 [410]. Además se ha visto como tras una HP o durante el ayuno hay una sobreactivación de los transportadores de Sistema A en el hígado, principalmente de SNAT2 [182, 330, 372, 411]. SNAT4 se encuentra en los sinusoides hepáticos y es importante durante el desarrollo hepático. Su expresión se ha visto inalterada durante la regeneración hepática mientras que aumenta en respuesta a glucagón [410, 412].

En el hígado, es el glucagón el que estimula el Sistema A durante el ayuno. En concreto, el glucagón activa el transportador SNAT2 para mediar la captación de aminoácidos precursores de la GNG [220]. Esta hormona aumenta los niveles cAMP y el elemento de unión en respuesta a cAMP, CREB, promoviendo la transcripción de SNAT2 [413]. Por otro lado, se ha visto que IL-6 y TNF α también estimulan el Sistema A de transporte de aminoácidos en trofoblastos a través de STAT3 que también incrementa la expresión de SNAT2 [414, 415].

Tras la HP habíamos detectado menores niveles de IL-6 y TNF α en los ratones AnxA6^{-/-} que podía deberse al hecho que AnxA6 interacciona con NF- κ B y promueve su translocación al núcleo aumentando la transcripción de IL-6 y TNF α [101], con lo que en ausencia de AnxA6 esto podría estar reducido. Al mismo tiempo esta reducción en la transcripción de dichas citoquinas provocaría una menor activación de la expresión de SNAT2.

Se ha observado una mayor expresión de SNAT2 en hígado de ratones AnxA6^{-/-} en condiciones estándar, hecho que correlaciona con la mayor concentración basal de glucagón detectada en estos ratones. Sin embargo, mientras que la expresión de SNAT2 tras el ayuno aumenta en 2 veces en los ratones WT, el incremento se da en menor medida en los ratones AnxA6^{-/-}. Por otra parte, en ausencia de AnxA6 no se observa un aumento en la expresión relativa tras el ayuno de SNAT4 y SNAT3 a diferencia de los ratones WT. Durante la regeneración hepática la expresión de SNAT4 no se ve alterada [410], aunque debería hacerlo en respuesta a glucagón como SNAT2 [220] indicando que la ausencia de AnxA6 estaría afectando a la expresión de estos transportadores.

La regulación de la actividad de los transportadores a menudo viene mediada por su tráfico y localización. Muchos transportadores pueden residir en vesículas y tras el estímulo pertinente ser dirigidas a la membrana plasmática de manera que aumenta su actividad [416-418]. Otros estímulos pueden impedir este tráfico. En el caso de SNAT2 existe una rápida regulación de su actividad mediante este transporte vesicular. En este sentido, se ha sugerido la señalización de mTOR como necesaria para mantener SNAT2 en la membrana plasmática [419]. Por último, en adipocitos se ha detectado un aumento de la captación de aminoácidos

neutros por parte de SNAT2 ante el estímulo de insulina, provocando la translocación del transportador desde el Golgi a la membrana plasmática [336].

Para el estudio del tráfico del transportador SNAT2 se realizaron aislamientos de membrana plasmática sinusoidal de hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-} en condiciones estándar y tras 24 horas de ayuno. Los resultados obtenidos muestran una menor expresión del transportador SNAT2 tras el ayuno en esta fracción de membrana de los ratones AnxA6^{-/-}. Este hecho sugiere un mecanismo mediante el cual AnxA6 estaría facilitando el transporte de SNAT2 a la membrana, estando inhibido en ausencia de AnxA6.

AnxA6 ha sido descrita como una proteína de andamiaje que además direcciona diversas proteínas, como p120GAP y PKC α , a la membrana plasmática para inhibir HRas o el receptor de EGF, respectivamente [70]. Al realizar estudios de *pull down* de AnxA6 con homogenados de hígado de ratón se detectó la interacción entre AnxA6 y el transportador SNAT2. Así, la interacción con AnxA6 podría ser necesaria para la translocación de SNAT2 a la membrana plasmática.

Como conclusión, proponemos un modelo en que, en ausencia de AnxA6, los hepatocitos serían incapaces de captar alanina en una situación de hipoglucemia debido a la imposibilidad del tráfico de SNAT2 a la membrana plasmática. El transportador podría quedar retenido en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi u otro compartimento vesicular como está descrito que sucede en adipocitos en condiciones fisiológicas hasta que el estímulo de insulina provoca su translocación [336].

Aparte de la implicación de AnxA6 como proteína de andamiaje, se ha descrito AnxA6 interaccionando con el citoesqueleto de actina [92] y con alta afinidad por el colesterol y las zonas ricas en colesterol de la membrana plasmática [420]. Recientemente, hemos descrito que AnxA6 induce la remodelación de la membrana plasmática a través de la homeostasis intracelular de colesterol y del citoesqueleto de actina. De esta forma, en ausencia de AnxA6, el colesterol aumenta en la membrana plasmática incrementando el orden de membrana y pudiendo afectar al reclutamiento de ciertas proteínas a la membrana [90], una de estas proteínas podría ser SNAT2.

A partir de los datos obtenidos, sugerimos un modelo por el cual en ausencia de AnxA6 el transportador SNAT2 quedaría bloqueado en compartimentos intracelulares y por lo tanto no sería direccionado a la membrana plasmática (Figura 2). De esta forma, se reduce la entrada de alanina y el hígado no podría producir glucosa mediante la GNG del principal sustrato gluconeogénico tras la HP y durante el ayuno, siendo la causa de la drástica hipoglucemia que lleva a la muerte del animal.

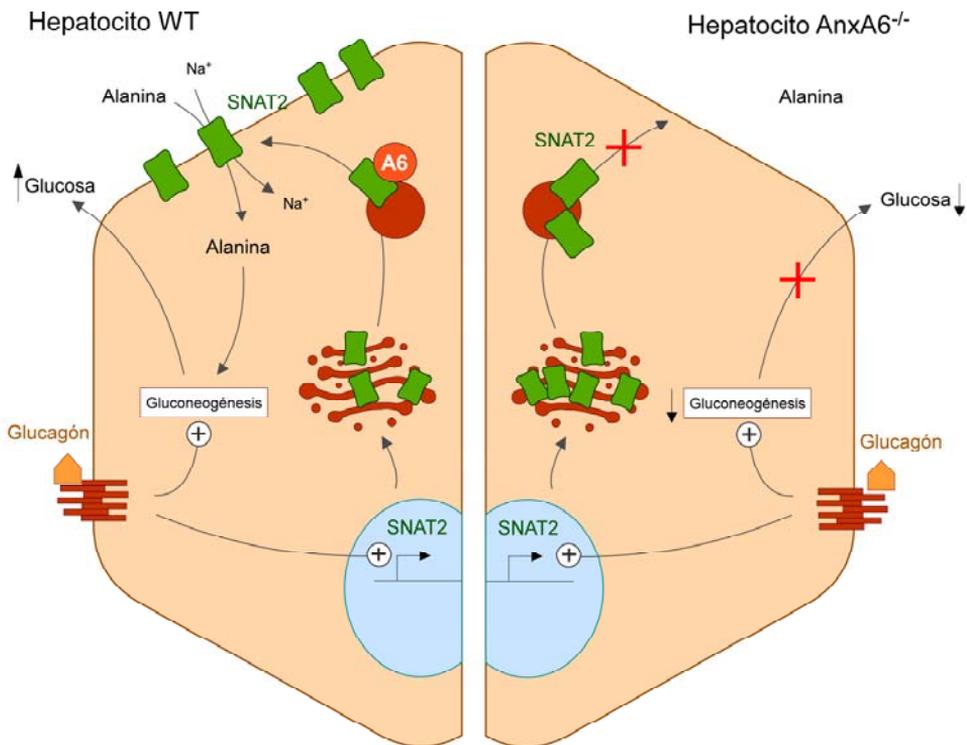


Figura 2. Modelo resumen de la implicación de AnxA6 en la localización del transportador SNAT2. Tras la activación por glucagón en el hepatocito se promueve la transcripción de SNAT2. En el panel izquierdo se muestra un hepatocito WT en el que se representa la interacción de AnxA6 con SNAT2 y como esto conlleva la translocación del transportador a la membrana plasmática. Esto permite la entrada de alanina y la producción de glucosa mediante la GNG. En el hepatocito AnxA6^{-/-}, panel derecho, SNAT2 no se dirige a la membrana de manera que la entrada de alanina queda inhibida así como la GNG.

Cabe mencionar que SNAT2 no es el único transportador de alanina en el hígado y que además éste no es específico de este órgano [220]. Por ello, postulamos que

AnxA6 podría también estar interaccionando con el transportador SNAT4 con el que SNAT2 comparte casi un 50% de homología de secuencia (Figura 3). Por otra parte, SNAT2 también comparte una elevada homología de secuencia con los demás transportadores SNAT, tanto del Sistema N, como del A.

En relación con esto, se observó un aumento de más de un 300% de glucosa en orina en los ratones *AnxA6^{-/-}* respecto los ratones WT. El transportador encargado de la reabsorción de glucosa en orina, SGLT2, también forma parte de la familia de transportadores de solutos SLC, como SNAT2. Este transportador se encuentra en el túbulo proximal del riñón y su deficiencia se ha relacionado con glucosuria renal [421]. Al realizar el alineamiento de SGLT2 con los transportadores SNAT2 y SNAT4 obtuvimos de nuevo una elevada homología (Figura 3).

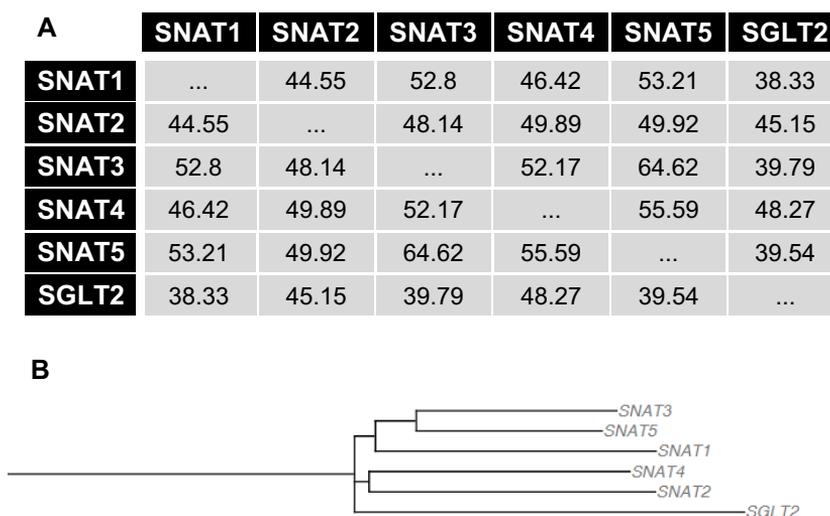


Figura 3. (A) Porcentaje de homología de secuencia de los transportadores de aminoácidos neutros SNAT1, SNAT2, SNAT3, SNAT4, SNAT5 y el transportador de glucosa renal SGLT2. (B) Árbol filogenético de la relación evolutiva de los transportadores.

Así la ausencia de *AnxA6* podría estar afectando a la captación de otros aminoácidos o solutos en otros tipos celulares como el riñón o incluso el intestino

afectando al tráfico de algunos transportadores de la familia de SLC a la membrana plasmática.

Los objetivos que se plantearon en esta tesis consistían en el estudio del papel de la AnxA6 en hígado. Los resultados obtenidos dan respuesta a la importancia de AnxA6, no solo en el hígado sino a nivel de todo el organismo con un papel en la captación de aminoácidos y la homeostasis de glucosa. Cabe destacar que por primera vez que se relaciona AnxA6 con un proceso metabólico abriendo las puertas a todo un nuevo campo de estudio para esta proteína.

CONCLUSIONES



1. El hígado de ratones AnxA6^{-/-} no presenta alteraciones significativas en su estructura histológica ni en los marcadores de función hepática.
2. Después de una hepatectomía parcial los ratones AnxA6^{-/-} presentan una elevada tasa de mortalidad y se inhibe el proceso de regeneración hepática. Sin embargo, este proceso regenerativo puede ser revertido con el aporte de glucosa.
3. En condiciones de elevado requerimiento energético, como la regeneración hepática y el ayuno, los ratones AnxA6^{-/-} experimentan una rápida y prolongada hipoglucemia.
4. El análisis detallado de la gluconeogénesis hepática demuestra que la captación de alanina en el hígado de los ratones AnxA6^{-/-} se encuentra inhibida debido al bloqueo intracelular del transportador de aminoácidos SNAT2
5. AnxA6 interacciona con SNAT2 sugiriendo un papel de AnxA6 en su tráfico y función en la membrana plasmática de la región sinusoidal de los hepatocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelo animal para el estudio *in vivo*.

Los estudios *in vivo* llevados a cabo en esta tesis se realizaron en ratones WT y ratones genoanulados para la proteína AnxA6 (AnxA6^{-/-}) de la cepa Black6/C57 (Bl6/C57), que proviene del laboratorio de Dr. Steven E. Moss en la *University Collage of London* en Londres. Para la generación del ratón mutado se procedió a la inserción de un gen de resistencia a la Neomicina en el exón 3 mediante la técnica de PCR [106].

Todos los ratones utilizados en los procesos experimentales son machos de entre 8-12 semanas de edad, con un peso comprendido entre 20-27 g.

La colonia de ambos genotipos es mantenida y controlada con la cantidad de cruces adecuado para obtener el número de animales necesarios. Las crías se destetaron a las 4 semanas de edad.

Los ratones se encuentran estabulados, en el estabulario de la *Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona*, bajo ciclos controlados de 12 horas de luz/oscuridad y en condiciones de dieta de mantenimiento estándar (dieta de mantenimiento de roedor, Harlan, 2014) y agua *ad libitum*.

Para todos los estudios de ayuno, los ratones fueron privados de la dieta de mantenimiento al inicio del ciclo de luz del estabulario, exactamente a las 8.00 horas. Los ratones se mantuvieron en ayunas hasta un máximo de 24 horas.

Se han realizado todos los esfuerzos necesarios para minimizar el sufrimiento animal y usar el menor número posible de animales por ensayo. Los procedimientos experimentales han sido aprobados por el Comité Ético Local (CEEA) de la *Universitat de Barcelona*, siguiendo las regulaciones europeas y españolas (RD 53/2013) para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

1.1 Genotipaje de los ratones AnxA6^{-/-}.

1.1.1 Extracción de DNA genómico:

El genotipaje se realiza a partir de una pequeña muestra de tejido de ratón (en este caso de la cola). La extracción de DNA se lleva a cabo mediante un kit comercial (Maxwell 16 Mouse Tail DNA Purification Kit, AS1120, Promega) tal como se indica en las instrucciones.

1.1.2 PCR para el genotipaje de los ratones AnxA6^{-/-}:

La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) se realiza a partir del DNA genómico extraído previamente. El genotipaje consiste en la amplificación de los exones 3 a 4 de la AnxA6 resultando en un producto único de 250 pb en el caso de la muestra WT y un producto de 500 pb para la muestra AnxA6^{-/-}, debida a la inserción de un casete de Neomicina que provoca la disrupción del gen de interés. Estas bandas

únicas de diferente tamaño para WT y *AnxA6*^{-/-} se obtienen en el caso de ratones homocigotos. En el caso de heterocigosis se identifican ambas bandas (Figura 1).

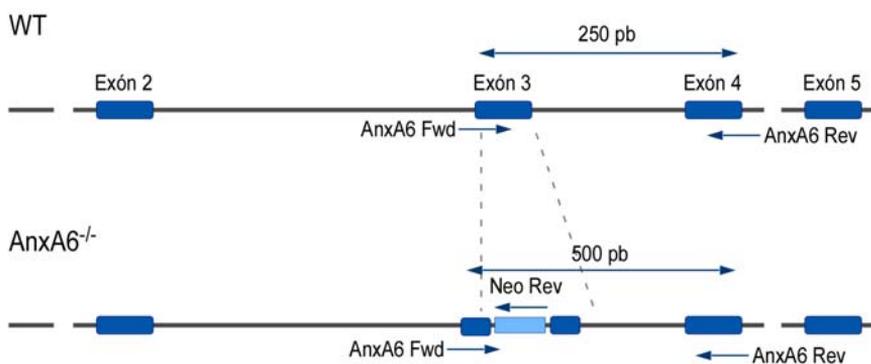


Figura 1. Producción de los ratones *AnxA6*^{-/-}. Para la generación del ratón genoanulado se insertó un gen de resistencia a Neomicina en el exón 3 de *AnxA6*. Se indican los oligonucleótidos utilizados para el genotipaje. Fwd: *Forward*; Rev: *Reverse*.

Los oligonucleótidos, la mix de PCR y el protocolo utilizado para el genotipaje a partir del DNA genómico se muestran en las Tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el genotipaje de los ratones de la colonia WT y *AnxA6*^{-/-}.

Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>Anx6 Forward (Fwd)</i>	GAGGCTCTGTCCACGACTT
<i>Anx6 Reverse (Rev)</i>	CCAATAAAGTCACTGGTTCATC
<i>Neomicina Reverse (Rev)</i>	TCTGGACGAAGAGCATCA

Tabla 2. Mix de PCR.

Producto	Concentración del stock	Concentración final
DNA	-	3 µl
PCR buffer	10X	1X
MgCl ₂ 50mM	50 mM	2 mM
dNTPs: Adenina, Citosina, Guanina, Timidina	10 mM (cada uno)	300 µM (cada uno)

Oligonucleótido AnxA6 Fwd	10 μ M	0.8 μ M
Oligonucleótido AnxA6 Rev	10 μ M	0.8 μ M
Oligonucleótido Neo Rev	10 μ M	0.8 μ M
Bio Taq DNA polimerasa (Bioline, BIO21040)	5 U/ μ l	2 U/ μ l
H ₂ O	Hasta 25 μ l	Hasta 25 μ l

Tabla 3. Protocolo de PCR.

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5'	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	30"	35 ciclos
Annealing	60°C	30"	
Extensión	68°C	1'	
Extensión Final	68°C	10'	1 ciclo
Mantenimiento	4°C		1 ciclo

Una vez obtenido el producto de PCR, el DNA amplificado se corre en un gel de agarosa al 1% y el genotipo de los ratones es identificado.

2. Hepatectomía parcial de 2/3 (HP).

Se realizan hepatectomías parciales de 2/3 según el método descrito en rata por Higgins y Anderson en 1931 [250]. Las hepatectomías se realizaron en ratones estabulados en condiciones estándar, con dieta de mantenimiento y agua *ad libitum* y, en ratones a los que se les suplementa el agua de bebida con 10% de glucosa durante 72 horas antes de la cirugía y durante el tiempo de recuperación.

Los animales fueron anestesiados por vía inhalatoria con isoflurano (AbbVie Farmacéutica, S.L.U., 880393.4) a una dosis de inducción de 3-4% y mantenidos durante el procedimiento quirúrgico a una dosis del 1.5-2% a 2 l/min de oxígeno. La cirugía se realiza sobre una manta térmica para evitar la hipotermia. Todo el instrumental, la zona de trabajo y el área quirúrgica en el ratón se mantiene en condiciones asépticas mediante el uso de etanol al 70%.

PROTOCOLO:

- Una vez el ratón está anestesiado se limpia con etanol al 70% la parte abdominal con la intención de mantener las condiciones asépticas mínimas.
 - Con unas tijeras quirúrgicas se realiza una pequeña incisión (lo suficiente para poder extraer los lóbulos hepáticos correspondientes) cutánea en la línea alba justo debajo del cartílago xifoideo. Posteriormente en la misma localización se realiza con cuidado una incisión en la musculatura abdominal.
 - Mediante un suave movimiento con los dedos en el abdomen se facilita la salida de los lóbulos mediales y lateral izquierdo, que corresponden al 60% de la masa total del hígado.
 - Una vez los lóbulos a extirpar se encuentran en el exterior del ratón se pinzan con fórceps y se realiza un nudo justo por debajo con seda trenzada (Suturas Aragón, 6284) para bloquear la hemorragia que se daría al cortar los lóbulos.
- NOTA: Todo este procedimiento se realiza con mucho cuidado de no estirar los lóbulos hepáticos para evitar dañar la parte remanente del órgano.
- Con unas tijeras curvadas se cortan los lóbulos y se retira el fórceps. Se recorta el hilo que sobra de la ligación.
 - Con hilo de sutura (Suturas Aragón, 6100) se cierra la herida con aproximadamente 3 puntos de sutura uniendo la capa muscular y posteriormente la cutánea.

Como paliativo del dolor derivado de la cirugía se administra a los ratones una dosis de 0.1mg/kg de buprenorfina 0.3 mg (Buprex®, RB Pharmaceuticals, 679588) por vía subcutánea tras la HP. Este tratamiento analgésico se mantiene cada 12 horas hasta el final del experimento en que se sacrifica el animal, al menos hasta las 48 horas. Además, se administra también por vía subcutánea 0.5 ml de Suero

Fisiológico 0.9% (Braun, 5/0101) para reestablecer la volemia sanguínea que ha disminuido con la resección del 60% de masa hepática [422].

Tras la realización de la HP de 2/3, se lleva a cabo el seguimiento de los ratones atendiendo a su evolución. De esta forma se anota diariamente el estado y el peso corporal de cada uno de los ratones sometidos a la HP.

3. Estudio de la conducta alimentaria.

Para el estudio de la conducta alimentaria, los ratones se estabulan de forma individual, y con dieta de mantenimiento y bebida *ad libitum*, en cámaras metabólicas adaptadas para ratón durante 7 días.

Los 3 primeros sirven de habituación de los animales a las nuevas condiciones de estabulación. Durante los 4 días posteriores a la habituación se registran los parámetros de peso corporal, ingesta de dieta de mantenimiento y consumo de agua. Por otro lado, se anota la excreción de orina y heces.

4. Obtención y preparación de muestras de ratón para el análisis hepático.

4.1 Extracción de hígado de ratón.

Para la extracción de hígado de ratón los animales son anestesiados con isoflurano y sacrificados mediante dislocación cervical. A continuación se realiza una incisión en las capas cutánea y muscular del ratón por la línea alba y se procede a la disección del hígado con cuidado de no realizar inserciones en el órgano (ya sea el hígado entero o la parte remanente tras la HP).

Una vez extraído el hígado del ratón es importante eliminar todo el tejido conectivo y vasos sanguíneos que quedan adheridos a la superficie del tejido, así como la vesícula biliar. El exceso de sangre se elimina con el lavado del tejido en suero fisiológico o con la perfusión de este, según el requerimiento de la muestra. A partir de aquí la muestra se mantiene a 4°C, se congela a -80°C para su posterior procesamiento o se sumerge en fijador para las técnicas de inmunohistoquímica.

4.2 Preparación del homogenado de hígado.

El hígado extraído se guarda en tubos que contienen pequeñas bolas de cerámica, denominados *Lysing Matrix D Tubes* (MP Biomedicals, 6913-100) con 1 ml de tampón de homogenización:

Tampón de homogenización

50 mM Tris pH7.5
150 mM NaCl
5 mM EDTA
Inhibidores de proteasas y
fosfatasas*

*Inhibidores de proteasas: 10µg/ml Aprotinina (Sigma, A1153), 10µg/ml Leupeptina (Sigma, L2884) y 1mM PMSF (Sigma, P7626); Inhibidores de fosfatasas: 10mM NaF (Sigma, S6508) y 1mM ortovanadato sódico (Sigma, 36508).

Los tubos que contienen bolas de cerámica se introducen en el homogeneizador de tejido (Bullet Blender, Next Advance) a una velocidad de 6 m/s durante un ciclo de 5 minutos. Las muestras de homogenado de hígado pueden conservarse a -20°C hasta su utilización.

4.3 Fijación del hígado e inclusión en parafina.

El tejido hepático extraído también puede destinarse al análisis por inmunohistodetección con diferentes tinciones. Para ello, el hígado debe ser procesado de la siguiente manera:

PROTOCOLO:

- Sumergir el hígado extraído en formol para fijar el tejido. Mantener la muestra a 4°C, durante al menos 24 horas, hasta el momento del procesamiento.
- Deshidratar la muestra fijada mediante incubaciones en soluciones de etanol de concentración creciente hasta substituir todo el H₂O de la muestra.
- Incubar la muestra en xileno, detergente orgánico que permitirá la inclusión del tejido en la parafina.
- Incluir el tejido en parafina líquida a 60°C.
- Realizar el bloque de parafina.
- Dejar enfriar el bloque de parafina.
- Realizar secciones de aproximadamente 5-10 µm con un micrótopo y colocarlas en portaobjetos.

La inclusión en parafina del tejido hepático para la realización de los bloques y las secciones de cada muestra se llevó a cabo en la unidad de Anatomía Patológica del *Hospital Clínic i Provincial de Barcelona*.

4.5 Extracción de sangre.

Para la obtención de plasma sanguíneo, los ratones son anestesiados con un cóctel anestésico administrado intraperitonealmente (i.p) de 100mg/kg ketamina (Imalgene® 100, Merial, 2525ESP) y 200mg/kg hidrocloreuro de xilacina (Rompun, Bayer, 1977ESP) en suero fisiológico.

La extracción se realiza mediante punción cardíaca con una jeringa estéril de 1ml (1 ml ICO/plus3, 014360) y agujas 25G. La sangre se colecta en una tubo microtainer (PSTTM LH Tubes, BD, 365986) que contiene heparina para evitar la coagulación. Las muestras se mantienen en todo momento a 4°C y se centrifugan a 6000 g durante 1 minuto. Posteriormente se recoge el plasma y se transfiere a un nuevo tubo. Las muestras se guardan a -20°C hasta el posterior uso.

5. Aislamiento de hepatocitos de ratón.

Los hepatocitos aislados utilizados en los diferentes experimentos se obtuvieron mediante la perfusión de colagenasa tipo IV.

Las soluciones necesarias para el aislamiento son Hanks I, Hanks II y Krebs que deben ser preparadas justo antes del aislamiento. A continuación se detalla su contenido y preparación. Todas las soluciones se filtran para mantenerlas en condiciones de esterilidad.

Hanks I	Hanks II	Krebs
8 g/l NaCl	8 g/l NaCl	9.6 g/l Krebs preparado
0.4g/l KCl	0.4g/l KCl	(Sigma, K3753)
0.2g/l MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g/l MgSO ₄ ·7H ₂ O	4g /l Hepes
0.12g/l Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.12g/l Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Burbujear 20 minutos
0.12g/l KH ₂ PO ₄	0.12g/l KH ₂ PO ₄	Ajustar pH a 7.4
0.342 g/l EGTA	Colagenasa tipo IV	
3 g/l Hepes	(Sigma, C5138)	0.356 g/l CaCl ₂ ·H ₂ O
0.05 g/l BSA	0.585 g/l CaCl ₂ ·2H ₂ O	
pH 7.4	pH 7.4	
Burbujear con	Burbujear con	
CO ₂ 20 minutos	CO ₂ 20 minutos	

PROTOCOLO:

- Anestesiarse al ratón con 100mg/kg ketamina y 200mg/kg xilacina.
- Abrir la capa cutánea y subcutánea por la línea de alba y posteriormente por ambos extremos hacia los lados para dejar todo el abdomen expuesto, inmovilizando las capas cutánea y subcutánea con fórceps.

- Canular la vena porta con un catéter intravascular 24G (BD Insyte, 381212).
- Perfundir (a una velocidad de 3 m/s) el hígado con la solución Hanks I, para lavar y eliminar la sangre del tejido hepático hasta que este se torna color marrón claro.
- Perfundir 100 ml de la solución Hanks II, hasta que se observa como el tejido hepático se disgrega.

NOTA: La colagenasa se mantiene a 4°C y se disuelve en Hanks II justo en el momento de perfundir.

- Extraer el hígado del ratón con mucho cuidado de no romperlo, ya que el tejido se encuentra muy disgregado.
- Colocar el hígado en una placa de Petri con 10 ml de solución Krebs de forma que el tejido siempre esté sumergido.
- Con la ayuda de pinzas de precisión, se realizan pequeñas incisiones en el hígado para facilitar la disgregación de los hepatocitos.
- Recoger los hepatocitos muy lentamente y con suavidad mediante una pipeta de 10 ml y filtrar con una gasa (Gaspunt, S.A) para pasar los hepatocitos disgregados en solución Krebs a un tubo de 50 ml con 15 ml de Krebs. Los hepatocitos restantes en la placa de Petri se recogen de nuevo con otros 5 ml de Krebs. De esta forma se obtiene un volumen aproximado de 30 ml de hepatocitos en solución Krebs.

NOTA: Muy importante utilizar siempre pipetas de 10 ml y nunca menores porque el calibre de la punta podría romper las paredes de los hepatocitos.

- Centrifugar a 60 g durante 4' a 4°C.
- Resuspender el pellet en unos 3-5 ml de medio de cultivo DMEM:Ham F12 (1:1) + 10% FCS y contar los hepatocitos viables mediante tinción Azul Tripano (1:1).

NOTA: Si la viabilidad es menor al 70%, se debe descartar el aislamiento. Es muy posible que para contar sea necesario diluir la muestra de hepatocitos en suspensión.

En esta tesis los hepatocitos aislados se usaron en ensayos que requerían hepatocitos adheridos a una placa, se fijados y en suspensión para experimentos de citometría de flujo o en suspensión para ensayos de captación de sustratos.

NOTA: En el aislamiento de hepatocitos de ratones a los que se les ha realizado una hepatectomía parcial no se realiza una perfusión localizada del hígado, ya que tras la HP, la anatomía hepática se encuentra afectada y no es posible la canulación de la vena porta. Así, la perfusión realizada es intracardial. Para la perfusión intracardial se canula el ventrículo derecho por donde entran las soluciones y se realiza una pequeña incisión en la aurícula izquierda por donde sale el exceso de soluciones de perfusión.

5.1 Cultivo primario de hepatocitos.

Las placas utilizadas para la adhesión de los hepatocitos deben estar previamente tratadas con colágeno. Las placas pueden estar preparadas el día antes de la extracción de hepatocitos y guardadas a 4°C. Todo se realiza en campana de flujo laminar para mantener la esterilidad.

PROTOCOLO:

Extracción de colágeno de cola de rata:

- Con la ayuda de pinzas y bisturí se disecciona la cola de rata hasta extraer los hilos de color blanco correspondientes a las fibras de colágeno.
- Sumergir las fibras de colágeno en etanol al 70% a temperatura ambiente durante 24 horas.
- Pesar las fibras de colágeno en seco e incubarlas en 0.1% de ácido acético (Panreac, 211008.1211). Por cada gramo de colágeno, 300 ml de 0.1% de ácido acético.
- Agitar durante 48 horas a 4°C (en un erlenmeyer con una mosca) para disolver las fibras de colágeno.
- Centrifugar a 1400 g durante 20 minutos para eliminar los restos de fibras que no se han disuelto.
- Recoger el SN e irradiar con ultravioleta el colágeno para esterilizarlo

NOTA: Con 4 colas de rata se obtienen unos 500 ml de colágeno.

Preparación de las placas con recubrimiento de colágeno:

- Cubrir la superficie de la placa con la solución de colágeno e incubar durante 30 minutos. También se pueden tratar cubres con colágeno para realizar microscopía.
- Aspirar el colágeno sobrante y dejar la placa abierta dentro de la campana de flujo laminar hasta que quede completamente seca.
- Guardar la placa, bien sellada a 4°C, hasta el momento del aislamiento.

Cultivo de hepatocitos:

Los medios de cultivo para hepatocitos, DMEM (Biological Industries, 01-055-1A) y HAM F12 (Biological Industries, 01-095-1A), se detallan a continuación:

Medio de estabilización	Medio de mantenimiento
DMEM:HAM F12 (1:1)	DMEM:HAM F12 (1:1)
2 mM Glutamina	2 mM Glutamina
50U/ml Penicilina	50U/ml Penicilina
50µg/ml Estreptomicina	50µg/ml Estreptomicina
15 mM Hepes	15 mM Hepes
30 mg/ml Metionina	30 mg/ml Metionina
10% FCS	0% FCS

FCS: Suero bovino fetal (Biological Industries 04-001-1A)

- Plantar los hepatocitos en la placa pre-tratada con colágeno (por ejemplo 2×10^5 células por placa de 9 cm^2).
- Incubar los hepatocitos a 37°C y 5% CO_2 en el medio de estabilización (10% FCS) durante 1 hora y 30 minutos hasta que los hepatocitos estén adheridos a la placa.
- Cambiar el medio de estabilización por medio de mantenimiento 0% FCS. El FCS contiene diversos factores de crecimiento que provoca la desdiferenciación de los hepatocitos primarios. Los hepatocitos se mantienen en un incubador a 37°C y 5% de CO_2 o/n (unas 16 horas).
- Al día siguiente los hepatocitos en cultivo son utilizados para los diferentes experimentos.

5.2 Tratamiento de hepatocitos en cultivo primario con HGF y EGF:

Los hepatocitos aislados de ratones WT y $\text{AnxA6}^{-/-}$ se siembran en placas de 6 pocillos con 2×10^5 células. Los tratamientos se realizan al día siguiente del aislamiento.

PROTOCOLO:

- Administrar 20 ng/ml de EGF (Sigma, E4127) o 30 ng/ml de HGF (SIGMA, H5791) a los hepatocitos en cultivo en medio de mantenimiento.
- Incubar los hepatocitos con EGF y HGF a tiempos de 0, 10, 30 y 60 minutos en un incubador a 37°C y 5% de CO_2 .
- Aspirar el medio y a partir de aquí mantener las placas siempre a 4°C .
- Realizar 2 lavados con PBS a 4°C .
- Añadir 100 μl de tampón de lisis y rascar los hepatocitos.

Tampón de lisis
50mM Tris-HCl, pH: 7.5, 1
50mM NaCl
5mM EDTA
*Inhibidores de proteasas y fosfatasas

*Inhibidores de proteasas: 10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinina, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptina y 1mM PMSF;
Inhibidores de fosfatasas: 10mM NaF y 1mM ortovanadato sódico.

- Recoger en un tubo de 1.5 ml las muestras de los hepatocitos para los diferentes tiempos de tratamiento.

Posteriormente estas muestras son analizadas mediante gel de acrilamida e inmunodetección.

6. Análisis de expresión.

6.1 Análisis de expresión génica

6.1.1 Obtención de RNA de hígado de ratón:

En el momento de la extracción del hígado, se congelan 30 mg con nieve carbónica inmediatamente y se guarda a -80°C . La extracción de RNA de estas muestras se realiza mediante el kit comercial Rneasy® Lipid Tissue Mini Kit (Quiagen, 74804) según las instrucciones del fabricante.

Se cuantifica la concentración de RNA mediante un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific). La muestra se guarda a -80°C hasta que se realiza la retrotranscripción para la obtención de cDNA. Todo el procedimiento se realiza con material doblemente autoclavado y agua libre de RNAsas.

6.1.2 Retrotranscripción para obtener DNA complementario:

La transcripción reversa (RT-PCR) es una técnica que permite sintetizar cDNA a partir de RNA utilizando la enzima transcriptasa reversa.

Se realiza la transcripción de 1 μg de RNA según las instrucciones del kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Bioscience, 4368814). El programa de PCR utilizado se detalla a continuación (Tabla 4). Todo el procedimiento se lleva a cabo con material doblemente autoclavado y agua libre de RNAsas.

Tabla 4. Protocolo de RT-PCR.

	Temperatura	Tiempo
<i>Annealing</i>	25°C	10'
Retrotranscripción	37°C	120'
Inactivación térmica	85°C	5'
Mantenimiento	4°C	...

6.1.3 PCR cuantitativa:

La PCR cuantitativa se lleva a cabo mediante el kit *Brilliant SYBRGreen QPCR Master Mix* (Agilent Technologies, 600828), según las instrucciones del fabricante con el protocolo de PCR de la tabla siguiente (Tabla 5).

Tabla 5. Protocolo de qPCR.

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10'	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	30"	40 ciclos
<i>Annealing</i>	60°C	15"	
Extensión	72°C	30"	
Desnaturalización	95°C	10"	1 ciclo
<i>Annealing</i>	65°C	60"	
Desnaturalización	95°C	1"	

Los oligonucleótidos utilizados para la PCR cuantitativa se encuentran detallados en la tabla siguiente (Tabla 6). El gen control de referencia utilizado es, RPL13:

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la qPCR.

Gen	Secuencia <i>forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>reverse</i> (5'-3')
TNF α	GTCCCCAAAGGGATGAGAAGT	ACAAGGTACAACCCATCGGC
IL-6	TCCTCTCTGCAAGAGACTTCC	CTGCAAGTGCATCATCGTTGT
c-Met	TTACGGACCCAACCATGAGC	GTGAGGTGTGCTGTTGCGAGA
cMyc	CATTACAAAGCCGCCGACTC	TGCCAATTCTAGGCGAAGCA
cFos	GGAATGGTGAAGAAGACCGTGT	GCAATCTCAGTCTGCAACGC
cJun	CGGACTCCGGACTTGTTTCATC	TTTGCAAAAGTTCGCTCCCG
PEPCK	GTCTGGCTAAGGAGGAAGGG	GCCAGGAGCAATCCAAAAA
G6Pasa	CACGCCTTTTGCTGGACTCG	AGGGGGATGGACGCACTTTTACA
F1,6Pasa	ACCTGCCTGCACCTTTAGTC	TTGGTTGAGCCAGCGATACC
ALAT1	TCCAGGCTTCAAGGAATGGAC	CAAGGCACGTTGCACGATG
ALAT2	CAGACCCAGACAACATTTACCTG	CGCGGAGTACAAGGGATACTG
LDH	AGTTGTTGGGGTTGGTGCTGTTGG	GGGCCCGCGGTGATAAT
SLC38A2	TGAAAAGCCATTATGCCGACG	CCCACAATCGCATTGCTCAG
SLC38A3	TACCTCCCCAGTGCATAGT	TGACAGTCAGGTATCTGTGCTC
SLC38A4	CAGAAAGGCGGGAAAGGGCT	TGTTTCATGGCGTCTTTGTGCG
RPL13	ATGGCGGAGGGGCAGGTTCT	CTCGGGAGGGGTTGGTATTCATC

6.2 Análisis de expresión de proteica.

6.2.1 Cuantificación proteica mediante la técnica de Bradford:

La cuantificación de la proteína de las muestras se ha realizado siguiendo el método de Bradford [423] usando el reactivo *BioRad Protein Assay* (BioRad 500-

0006). Este sistema se basa en la cuantificación de la absorbancia a una determinada longitud de onda. Para ello, se compara la ratio de la Abs_{595nm}/Abs_{450nm} de las muestras con una recta patrón de concentración conocida de BSA (Albumina sérica bovina, Sigma, A7906) [424]. A partir de la recta patrón se calcula los μg de proteína de cada muestra.

6.2.2 Preparación de la muestra para electroforesis:

Tras la cuantificación del extracto proteico, se corren entre 30-50 μg de proteína, diluyendo la muestra en tampón de homogenización. La preparación de las muestras se detalla a continuación.

PROTOCOLO:

- Añadir el tampón de carga 4X a las muestras diluidas a concentración final de 30-50 $\mu g/\mu l$.

Tampón de carga
30 mM tampón fosfato pH7 (0.5M $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 0.5M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)
30% glicerol
7.5% SDS
0.15% DTT
0.05% Azul de Bromofenol

- Hervir las muestras durante 5 minutos a 100°C en un baño seco.

6.2.3 Gel de acrilamida (SDS-PAGE) y Electroforesis:

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes consiste en la separación de proteínas de una muestra en función de su peso molecular. Para ello se utilizan geles de acrilamida discontinuos que constan de dos partes:

- *Concentrador*, en el que se concentran las muestras para que todo el contenido proteico avance en el gel al mismo tiempo. En este caso el porcentaje de acrilamida es bajo (3.6%) y el pH de 6.8.
- *Resolutivo*, en el que se separan las proteínas según el peso molecular. El porcentaje de acrilamida puede variar en rangos de 5-15% según la separación proteica que se requiera y el pH es de 8.8.

PROTOCOLO:

Para la preparación de los geles se requieren las siguientes soluciones y reactivos:

Solución 1: 0.75 M TrisHCl-0.2% SDS, pH8.8.

Solución 2: Proteogel Ultra Acrilamida (30% acrilamida-0.8% bis-acrilamida) (Pronadisa-LaboratoriosCondal. 8532-1L).

Solución 3: 0.25 M Tris-HCl, 0.2% SDS y pH6.8.

APS (Sigma, 215589): persulfato amónico. Agente indicador de la polimerización de la acrilamida.

TEMED: tetrametiletilendiamina (BioRad, 1610801). Catalizador de la polimerización.

Los volúmenes necesarios para la preparación de los geles de acrilamida (SDS-PAGE) con el sistema *Mini-Protean* (Bio-Rad) y pocillos de 1.5 mm se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Composición de los geles de electroforesis.

Gel separador pH8.8	6%	7%	8%	10%	12%	15%	Gel concentrados pH 6.8
Solución 1 (ml)	5	5	5	5	5	5	-
Solución 2 (ml)	2	2.4	2.8	3.4	4	5	0.36
Solución 3 (ml)	-	-	-	-	-	-	1.5
H2O (ml)	3	2.6	2.2	1.6	1	0	1.2
TEMED (µl)	14	14	14	14	14	14	7.5
APS (µl)	50	50	50	50	50	50	30

- Colocar los geles en la cubeta con el sistema de Mini-Protean (Bio-Rad) en tampón de electroforesis compuesto por:

Tampón de electroforesis
25 mM Tris-HCl, pH8.3 192 mM glicina 0.2% SDS

- Cargar las muestras en el gel de acrilamida en cada uno de los pocillos y añadir en uno de los carriles un marcador de peso molecular (Dual color, BioRad, 161-03745P).

- Correr el gel a un amperaje constante de 30 mA.

6.2.4 Transferencia a membrana:

Tras la electroforesis las proteínas se encuentran cargadas negativamente y distribuidas a lo largo del gel de acrilamida según su peso molecular. A partir de aquí se hace una transferencia de estas proteínas, que pasaran del polo negativo al positivo, donde se encuentra una membrana mixta (Millipore, HATF00010). El sistema utilizado es el *Mini-Transblot Gel* (Bio-Rad).

PROTOCOLO:

- Preparar el sándwich de transferencia en el siguiente orden:
 1. Parte negra del soporte de sándwich
 2. Esponja
 3. Papel *Whatman*
 4. Gel de acrilamida
 5. Membrana
 6. Papel *Whatman*
 7. Esponja
 8. Parte blanca del soporte de sándwich
- Cerrar el sándwich asegurando que no queden burbujas entre el gel de acrilamida y la membrana.
- Colocar el sándwich en la cubeta con tampón de transferencia en la disposición correcta, el gel de acrilamida cercano al polo negativo y tras él la membrana. La composición del tampón de transferencia es la siguiente:

Tampón de transferencia
25 mM Tris-HCl, pH8.3
192 mM glicina
0.02% SDS
20% etanol o metanol

- Aplicar una corriente eléctrica de 70 voltios a 4°C durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos, pudiendo variar según el peso molecular de la proteína que se desea detectar.

6.2.5 Western blot (WB):

El WB permite la detección de las proteínas mediante el uso de anticuerpos específicos en las membranas transferidas.

PROTOCOLO:

- Bloquear la membrana en TBST-5% de leche desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente.

- Lavar con TBST; 3 veces durante 5 minutos.
- Incubar con anticuerpo primario (diluido en TBST) durante 1-2 horas (según el anticuerpo) a temperatura ambiente o o/n a 4°C.
- Lavar con TBST; 3 veces durante 10 minutos.
- Incubar con anticuerpo secundario-HRP (diluido en TBST) durante 30 minutos para proteína A-HRP o 1 hora para anti-IgG de ratón-HRP.
- Lavar con TBST; 3 veces durante 10 minutos.
- Lavar con TBS antes de revelar.

TBS	TBST
20 mM Tris-HCl, pH 7.5 150 mM NaCl	20 mM Tris-HCl, pH 7.5 150 mM NaCl 0.05% de Tween 20

- Revelar con EZ-ECL (Biological Industries, 20-500-120) a una dilución 1:1. En presencia de H₂O₂ el luminol presente en el kit de revelado es oxidado por la HRP, emitiendo luz. La señal lumínica se detecta mediante un film fotográfico (SuperRX Fuji Medical X-Ray film, Fujifilm, 47410-08389).

A continuación se muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para WB (Tabla 8 y 9, respectivamente).

Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados para WB.

Anticuerpo	Especie	Peso molecular	Concentración WB	Casa comercial
Annexina A6	Conejo	68 kDa	1:3000	Propio del grupo del Dr. Carles Enrich
PCNA	Ratón	36 kDa	1:500	Santa Cruz sc-25280
Erk1/2 total	Conejo	42 kDa	1:1000	Cell Signaling 9102
Erk1/2 fosforilado	Conejo	42 kDa	1:1000	Cell Signaling 9101
Adipofilina (ADRP)	Conejo	48 kDa	1:1000	Abcam ab52355
SNAT2	Conejo	60 kDa	1:500	Santa Cruz sc-67081
Na/K ⁺ ATPasa	Ratón	100 kDa	1:1000	Upstate 05-369
Sec61	Conejo	40 kDa	1:2500	Upstate 07-204

Tabla 9. Anticuerpo secundarios y proteína utilizados para WB.

Anticuerpo/proteína	Especie inmunizada	Concentración WB	Casa comercial
anti-ratón-HRP	Cabra	1:3000	Bio-Rad. 170-6516
Proteína A-HRP	Staphylococcus aureus	1:10000	Zymed. 10-1023

6.3 Análisis de los marcadores en sangre y orina.

El plasma obtenido a los diferentes tiempos post-HP y la glucosa en orina se cuantificaron en el laboratorio de análisis clínicos del *Hospital Clínic i Provincial de Barcelona* para diversos marcadores en sangre y orina usando las técnicas enzimáticas colorimétricas que se muestran a continuación. Se analizaron 200 μ l de muestra en todos los casos. Algunos de ellos fueron diluidos en suero fisiológico y posteriormente la concentración obtenida se corrigió para esta dilución (Tabla 10 y 11).

Tabla 10. Marcadores en plasma sanguíneo.

Marcador	Técnica	Casa comercial
Alanina aminotransferasa	IFCC, 37°C	Bayer
Aspartato aminotransferasa	IFCC, 37°C	Bayer
Lactato dehidrogenasa	Piruvato-lactato	Bayer
Albúmina	Verde Bromocresol	Bayer
Bilirrubina	Jendrassik-Grof	Bayer
Proteína total	Biuret	Bayer
Colesterol libre	Trinder colesterol esterasa-colesterol oxidasa	Bayer
Triacilglicéridos	Trinder lipasa-GK-GPO-POD	Bayer
Ácidos grasos libres	Espectrometría de absorción molecular	-

Tabla 11. Marcador en orina.

Marcador	Técnica	Casa comercial
Glucosa	Trinder glucosa oxidasa-peroxidasa	Bayer

7. Estudio de la proliferación celular.

7.1 Inmunohistoquímica de PCNA:

La inmunohistoquímica de tejido hepático se llevó a cabo a partir de los cortes histológicos de las muestras de hígado incluidas en parafina. Las secciones de 5-10 μm de grosor se encuentran en portaobjetos.

PROTOCOLO:

- Mantener las secciones de hígado de ratón en una estufa a 37°C o/n.
- Desparafinar la muestra: 10 minutos en xileno, 3 veces.
- Rehidratar la muestra sumergiéndola en concentraciones decrecientes de etanol (Absoluto, 96, 70, 50%): 2 ciclos de 10 minutos para etanol absoluto y un ciclo para el resto.
- Lavar 5 minutos en H₂O miliQ.
- Recuperar el antígeno (*antigen retrieval*).
 - Hervir durante 20 minutos en citrato de sodio a pH6 en una olla a presión.
 - Abrir la olla a presión y dejar que se enfríe durante 15-20 minutos.
- Lavar con PBS 1X durante 5 minutos, 2 veces.
- Desactivar la peroxidasa endógena incubando las secciones durante 15 minutos en 3% H₂O₂ en PBS 1X.
- Lavar con PBS 1X durante 5 minutos, 2 veces.

Para la inmunodetección de PCNA se utilizó un kit comercial (*ImmunoCruz Mouse ABC Staining System*, Santa Cruz, sc-2017) siguiendo las instrucciones del kit.

- Lavar en PBS 1X y 0.1% Tween 20 durante 10 minutos.
- Bloquear las secciones con 150 μl de la solución de bloqueo.
- Incubar durante 30 minutos con el anticuerpo primario anti-PCNA (Santa Cruz, sc-25280) 1:50 en solución de bloqueo.
- Lavar con PBS 1X durante 5 minutos, 3 veces.
- Incubar las secciones durante 30 minutos con el anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado 1:200 en solución de bloqueo.
- Lavar con PBS 1X durante 5 minutos, 3 veces.

- Incubar las secciones durante 30 minutos con avidina-HRP 1:50 en solución de bloqueo.
- Lavar con PBS 1X durante 5 minutos, 3 veces.
- Incubar las secciones con 1-3 gotas de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) el sustrato de la peroxidasa hasta que la tinción sea la requerida.
- Lavar varias veces con H₂O deionizada.
- Teñir las secciones con hematoxilina durante 20 segundos.
- Lavar varias veces con H₂O deionizada.
- Deshidratar la muestra con concentraciones crecientes de etanol (70, 96% y absoluto) en ciclos de 10 segundos, 2 veces.
- Añadir una gota de xileno sobre la muestra durante 10 segundos, 3 veces
- Montar las secciones con un cubreobjetos con el medio de montaje DPX y dejar secar la preparación.

La inmunohistoquímica de PCNA se llevó a cabo en secciones de hígado de ratón WT y AnxA6^{-/-} del punto de 48 horas post-HP. Se cuantificaron los núcleos positivos para PCNA de 4 áreas por muestra con el objetivo de 20x.

7.2 [³H]-timidina en ratones tras la HP:

Esta técnica consiste en la incorporación de [³H]-timidina al DNA durante la síntesis. De esta forma es un marcador de la replicación de DNA durante la fase S del ciclo celular. El protocolo se adaptó de Russell W.E, y Bucher, L.R., 1983 [425].

PROTOCOLO:

- Administrar i.p [³H]-timidina (PerkinElmer, NET027001MC) a una concentración de 1μCi/g en suero fisiológico a los ratones 2 horas antes de sacrificar el animal para el punto de estudio.
- Sacrificar al animal por dislocación cervical tras anestesiarse con isoflurano.
- Extraer 300 mg de tejido hepático y homogenizar el hígado (Apartado 4.2), pero esta vez con 1 ml de H₂O.
- Cuantificar la proteína por Bradford.
- Añadir 650 μl de H₂O miliQ y 50 μl de 100% de ácido tricloroacético (TCA) a 4°C.
- Centrifugar a 16800 g durante 5 minutos a 4°C y descartar el SN.
- Resuspender el pellet con 1 ml de 5% TCA a 4°C para lavar y centrifugar a 16800 g durante 5 minutos a 4°C y descartar el SN. Realizar este proceso 3 veces para lavar.

NOTA: Solo se resuspende el pellet de la centrifugación la primera vez y en los lavados consecutivos solo se reemplaza el 5% TCA.

- Resuspender el pellet en la solución de 5% TCA y 1.5 N de ácido perclórico.
- Incubar 15 minutos a 90°C en un baño seco dentro de una campana de extracción.

- Centrifugar a 16800 g durante 5 minutos a 4°C y recoger el SN.
- Añadir el SN en viales con 9 ml de líquido de centelleo.
- Contar la incorporación de [³H]-timidina en un contador de centelleo (protocolo para [³H] 3 minutos por muestra).

8. Citometría de flujo para la determinación de CL en hepatocitos aislados.

Nile red (NR) (Invitrogen, N1142) es un colorante lipofílico que emite fluorescencia entre 600-700nm cuando se une a lípidos polares y entre 550-650nm cuando se une a lípidos neutros (CL). Se usó como stock de NR una dilución de 2.5 mg/ml en DMSO del stock que se mantiene a -20°C.

Inicialmente se seleccionan los hepatocitos separándolos del *debrís* celular y de los agregados de células, usando los parámetros de tamaño (*Forward scatter*, FSC) y complejidad o refringencia intracelular (*Side scatter*, SSC). Para ello se representa un diagrama de puntos de FSC-A y SSC-A, en el que se selecciona la población correspondiente a las células. Seguidamente, se representan FSC-A y FSC-H. Estos parámetros deben ser proporcionales si se trata de una sola célula, mientras que no lo serán si la partícula analizada es un agregado de células (con un mismo valor de FSC-H pero un valor de FSC-A mayor). Así, se seleccionan las partículas que se encuentran en la diagonal, que corresponderán a células individuales. Dado que muchas de las células hepáticas son binucleadas, se utilizó el Hoechst-33258 (Invitrogen, H3569), una tinción de ácidos nucleicos que emite fluorescencia a 461 nm cuando se une al DNA, para discernir dos poblaciones de células: mononucleadas y binucleadas.

Para esta técnica se ha usado el citómetro BD FACS Canto II (BD Bioscience) con láseres 405nm, 488nm y 633nm. La fluorescencia de la tinción de NR correspondiente se analizó en hepatocitos individualizados para cada una de las poblaciones de células mononucleadas y binucleadas.

PROTOCOLO:

Para este ensayo partimos de hepatocitos primarios que se encuentran en suspensión o adheridos en cultivo primario.

Fijación

- Hepatocitos adheridos:
 - Lavar la placa con PBS, 2 veces.
 - Añadir 300 µl en un pocillo de 9 cm² de 0.5 mM EDTA y dejar durante 5 minutos a 37°C.

- Añadir 1 ml de medio de mantenimiento y raspar con mucho cuidado de no romper las células.
- Pipetear con una pipeta de 10 ml para disgregar las células
- Hepatocitos en suspensión:
 - Tras el aislamiento los hepatocitos se mantienen en medio de estabilización en tubos de 15 ml.
- Centrifugar a 700 g durante 4 minutos.
- Descartar el SN y lavar los hepatocitos con PBS.
- Centrifugar a 700 g durante 4 minutos.
- Descartar el SN y resuspender el pellet en 900 µl de PBS.
- Añadir 2.1 ml de etanol al 70% gota a gota a 4°C mientras se agita muy suavemente para no dañar las células.
- Los hepatocitos fijados se mantienen a 4°C hasta el momento de la tinción.

Tinción:

- Centrifugar los hepatocitos fijados a 700 g durante 4 minutos y aspirar el SN.
- Resuspender en 2 ml de PBS.
- Centrifugar a 700 g durante 4 minutos y aspirar el SN
- Resuspender el pellet de hepatocitos en 500 µl de solución de 5 µg/ml de NR y 10 µg/ml Hoechst en PBS.
- Mantener las muestras a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo.
- Filtrar las muestras con filtros de 100 µm (PARTEC, 04-0042-2318) antes de pasar por el citómetro.

Para detectar la fluorescencia de NR se usó el láser 488 nm y el filtro 585/42. Para la fluorescencia de *Hoechst* se usó el láser 405 nm y el filtro 450/50.

9. Pull down de AnxA6 en hígado de ratón.

Para realizar un *pull down* de AnxA6 se utilizaron bolas de AnxA6-GST.

PROTOCOLO:

- Extracción del hígado y homogenización con tampón *pull down* para AnxA6.

Tampón de pull down para AnxA6

50 mM Tris 150 mM NaCl 1% Triton X-100 0.1 mM CaCl ₂ *Inhibidores de proteasas y fosfatasas
--

*Inhibidores de proteasas: 10µg/ml Aprotinina, 10µg/ml Leupeptina y 1mM PMSF;
Inhibidores de fosfatasas: 10mM NaF y 1mM ortovanadato sódico.

- Cuantificar la proteína por Bradford.
- Incubar 2g de homogenado en 1 ml de tampón de *pull down* con bolas de agarosa recubiertas de Proteína A (Termo Scientific, 20333), para hacer un prelavado, durante 1 hora en la noria a 4°C.
- Centrifugar a 6000 g durante 5 minutos a 4°C.
- Transferir el SN a un nuevo tubo de 1.5 ml e incubar en la noria con los 100 µg de bolas AnxA6-GST o/n a 4°C.
- Centrifugar a 6000 g durante 5 minutos a 4°C. Descartar el SN y añadir 1 ml de tampón de *pull down*. Repetir éste paso dos veces.
- Descartar el SN al máximo posible y añadir 30 µl de tampón de carga 2X.
- Hervir las muestras durante 5 minutos a 100°C en un baño seco.

Estas muestras se analizan por inmunodetección de determinadas proteínas.

10. Estudio lipídomico del hígado de ratón.

Para el estudio lipídomico del hígado se analizaron los niveles de colesterol libre y ésteres de colesterol mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*) y la concentración de esfingomielina y fosfolípidos mediante espectrometría de masas (MS, *Mass Spectrometry*). Estos experimentos se llevaron a cabo durante la estancia de 3 meses en el laboratorio de la Prof. Katharina Gaus en el *Center of Vascular Research*, de la *University of New South Wales*, Sídney, Australia). Para cada muestra se realizan triplicados.

Los niveles de triacilglicéridos en el tejido hepático se cuantificaron a partir de homogenado de hígado de ratón con un kit de detección (Bio Systems, 11528) siguiendo las instrucciones del fabricante.

10.1 Extracción de lípidos del hígado.

Inicialmente se realizó una extracción de lípidos mediante metanol/cloroformo de las muestras de hígado de ratones WT y AnxA6^{-/-} de ratones estabulados bajo condiciones estándar y con comida *ad libitum*.

PROTOCOLO:

- Extraer ente 50-100 mg de hígado de ratón.
- Introducir el tejido en los tubos *Lysing Matrix D Tubes* (MP Biomedicals, 6913-100). En paralelo se prepara un control negativo que se someterá al mismo procedimiento que la muestra pero sin ella, que será utilizado como blanco.
- Añadir 1 ml de metanol y los estándares internos:

Estándares internos

100 µl de 0.5 mg/ml de estándar de colesterol:
colesterolpropil éter en 5% 2-propanol + 95% heptano.

50 µl de 20 µM de una mezcla estándar de fosfolípidos en cloroformo:
PC 19:0/19:0, PE 17:0/17:0, PG 17:0/17:0, PS 17:0/17:0, PA 17:0/17:0, Car
10:0/10:0/10:0/10:0

- Homogenizar utilizando un FastPrep 24 (Homogenizador de alta velocidad) a 6 m/s durante 30 segundos, dos veces.
- Transferir 800 µl a un tubo de cristal borosilicado de 10 ml.
- Añadir 800 µl de cloroformo y 0.01% butilhidroxitolueno (BHT). Tapar los tubos y realizar un vórtex durante 15 segundos, dos veces.
- Añadir 600 µl de H₂O miliQ. Tapar los tubos y realizar un vórtex durante 15 segundos.
- Centrifugar a 1800 rpm durante 10 minutos a 10°C, o bien dejar que sedimente durante unos 15 minutos.
- Con una pipeta de cristal retirar la fase inferior orgánica (unos 500 µl sin la interfase y la fase superior) y transferirla a un tubo *Kimble*.
- En paralelo se preparara 100 µl de 0.5 µg/ml de estándar de colesterol en un tubo *Kimble* como control positivo.
- Evaporar las muestras y el control positivo de estándar de colesterol en un *Speedvac* durante una 1-2 horas.
- Reconstituir la muestra evaporada en la soluciones que se requiere en función de si se realiza la HPLC o la MS.

NOTA: Las mismas muestras se usan para la detección de colesterol y sus ésteres y los fosfolípidos mediante las dos técnicas. Tras la HPLC, las muestras se vuelven a evaporar en el *Speedvac* y se reconstituyen con la solución de MS.

10.2 HPLC.

La técnica de HPLC consiste en la separación de los diferentes componentes en solución entre una fase móvil (solución de extracción lipídica) y una fase estacionaria (columna). En función de la fase móvil y estacionaria utilizada se pueden separar diferentes componentes.

Para la HPLC se necesitan dos soluciones diferentes de fase móvil (MP). Una vez preparados se sonicán durante 30 minutos y se dejan o/n. Se preparan siempre 2 l.

MP210	MP234
70% 2-propanolol	54% 2-propanolol
30% acetonitril	44% acetonitril
	2% H ₂ O miliQ

PROTOCOLO:

- Reconstituir la muestra, el control positivo y el negativo secos en 200 μ l de MP210 y transferir la muestra a viales de HPLC.
- Se realiza la HPLC con el *software* CLASS-VP 7.4 para las dos fases móviles, una después de la otra, a una longitud de onda de 210 nm. La MP234 permite detectar el colesterol libre mientras que los ésteres de colesterol se detectan con la MP210.
- El análisis se realiza calculando el área bajo la curva (AUC) para cada uno de los picos correspondientes al colesterol libre y a los ésteres de colesterol que se identifican en comparación con el control positivo. Los resultados se normalizan por los μ l inyectados en el cromatógrafo, el peso del hígado, y la recuperación del estándar interno.

10.3 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas se basa en el análisis de diferentes elementos químicos e isótopos separando los núcleos atómicos en función de su masa/carga (m/z).

Para el análisis de esfingomielina y fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina) se utiliza la técnica de espectrometría de masas de tiempo de vuelo cuadrúpolo (QTOF MS, *Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry*).

PROTOCOLO:

- Reconstituir la muestra seca en 50 μ l de 5.6 mM de acetato de amonio en metanol:cloroformo (2:1).
- Las muestras se inyectan y corren en el QStar, espectrómetro de masas.

El análisis de los datos se utiliza el *software* *Lipid Profiler*.

11. Técnicas de microscopía.

11.1 Microscopía óptica. Hematoxilina/Eosina (H/E) y técnica de PAS.

Las secciones de cortes de tejido hepático, incluido en parafina, son teñidas con H/E y PAS en la Unidad de Anatomía Patológica del *Hospital Clínic i Provincial de Barcelona*.

La hematoxilina es un colorante básico que tiñe los compuestos ácidos. Es ampliamente utilizada en histología para marcar el núcleo celular. La eosina es un colorante ácido y tiñe las estructuras básicas de una célula como el citoplasma [109].

La técnica de *Schiff* consiste en una reacción colorimétrica utilizando ácido peryódico de *Schiff* (PAS). La tinción de PAS permite la detección de componentes celulares que contienen hidratos de carbono y se utiliza para marcar el glucógeno [109].

A partir de las secciones de hígado de ratón teñidas para H/E se cuantificó el grado de esteatosis y el índice mitótico en ratón a diferentes tiempos post-HP. Para ello se obtuvieron imágenes mediante microscopía óptica de campo claro.

El grado de esteatosis se cuantificó de forma cualitativa a partir de 4 áreas (con el objetivo 20x) por cada corte histológico correspondiente a cada una de las muestras. Se puntuó de 0 a 5 de menor a mayor acumulación de CL.

El índice mitótico se cuantificó en las mismas muestras histológicas de H/E. Se contaron los cuerpos mitóticos para 4 áreas por muestra con el objetivo 40x.

11.2 Microscopía electrónica de hígado de ratón.

El procesamiento de la muestra de hígado de ratón para microscopía electrónica consistió en una perfusión intracardial de los ratones para una completa fijación del tejido con 50 ml de 2.5% glutaraldehído en PBS tras la perfusión de PBS para eliminar la sangre del tejido hepático hasta que el hígado adquiere un color marrón claro.

PROCOLO:

- Extraer el hígado perfundido en 2.5% glutaraldehído en PBS del ratón.
- Mantener el hígado en 2.5% glutaraldehído y 4% de paraformaldehído en PBS o/n a 4°C.
- Cortar el tejido hepático fijado con la ayuda de un bisturí en cuadrados de 3 mm³ aproximadamente.
- Mantener el hígado en 2.5% glutaraldehído y 4% de paraformaldehído en PBS hasta su procesamiento a 4°C.

A partir de aquí el procesamiento de las muestras se llevó a cabo en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la *Universitat de Barcelona*.

- Lavar durante 3 minutos en tampón fosfato 0.1M (0.5M Na₂HPO₄·2H₂O, 0.5M NaH₂PO₄·2H₂O) a 4°C, 3 veces.
- Incubar con 1% tetraóxido de osmio en tampón fosfato 0.1M durante 1-4 horas a 4°C.
- Lavar durante de 3 minutos en tampón fosfato 0.1M a 4°C, 3 veces.
- Deshidratar la muestra en acetona a concentraciones crecientes con 1 ciclo de 10 minutos para 25, 50 y 70% y 3 ciclos de 10 minutos para 90, 96 y 100% a 4°C
- Incluir en la resina Spurr [426].
- Polimerizar el bloque durante 48 horas a 60°C.

A partir de los bloques se realizaron cortes semifinos de 1 μm y se marcaron con la tinción azul de metileno. Tras comprobar que la muestra está bien conservada se realizaron cortes ultrafinos de 200 nm para el análisis por microscopía electrónica.

Las imágenes de los cortes ultrafinos se captaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM, Jeol1010, Izasa) y con una cámara Orius CCD (Gatan, 832).

11.3 Detección de Nile red por microscopía de fluorescencia.

El colorante fluorescente NR, ya utilizado en los ensayos de citometría de flujo (Apartado 8), se usó para marcar los CL presentes en hepatocitos aislados de ratón para su análisis por microscopía confocal de fluorescencia (Leica TCS-SL) con el objetivo de 63x. Para la detección de CL con la tinción de NR se excita con el láser a 514 nm y se recoge la emisión entre 550 y 600 nm.

PROTOCOLO:

- Aislar y sembrar hepatocitos primarios de ratón (Apartado 5).
- Lavar 3 veces con PBS las células en cultivo adheridas en cubres.
- Fijar las muestras durante un mínimo de 1h con 4% de paraformaldehído en PBS a temperatura ambiente.
- Lavar 3 veces con PBS.
- Preparar la solución de montaje 1:1000 de NR (saturado en acetona) en medio de montaje mowiol (Calbiochem, 475904).
- Lavar el cubre por inmersión en H_2O miliQ.
- Montar los cubres en un portaobjetos con la solución de montaje de NR (5 μl para cubres de 12 mm de diámetro).

12. Técnicas para el estudio del metabolismo de la glucosa.

12.1 Cuantificación de la concentración de glucosa en sangre de ratón.

Para la cuantificación de la concentración de glucosa en sangre de ratón se utiliza un glucómetro comercial (Glucocard G+ meter set, Arkray, 37852). Mediante una pequeña incisión en el extremo de la cola de ratón se procede a la obtención, ejerciendo una leve presión, de gotas de sangre que se depositan en tiras sensoras de glucosa (Glucocard G Sensor, Arkray, 34565).

12.2 Cuantificación de la concentración de insulina en plasma de ratón.

La cuantificación de los niveles de insulina en plasma de ratón se establece mediante una ELISA de insulina (US Mouse Insulin ELISA, Mercodia, 10-1249-01), según las instrucciones del fabricante.

12.3 Cuantificación de la concentración de glucagón en plasma de ratón.

La cuantificación de los niveles de glucagón en plasma de ratón se establece mediante una ELISA de glucagón (Glucagon EIA Kit, SIGMA, RAB0202), según las instrucciones del fabricante. Las muestras de plasma sanguíneo se diluyen 1:2 en suero fisiológico.

12.4 Extracción y cuantificación de la concentración de glucógeno en hígado de ratón.

Para establecer los niveles de glucógeno en hígado de ratón se procedió a la extracción y purificación de éste a partir del hígado. Posteriormente se determinó la concentración inferida a través de la concentración de glucosa mediante un kit comercial. Se partió de 200 mg aproximadamente de tejido hepático previamente extraído y congelado a -80°C .

PROTOCOLO:

- Introducir 200 mg de hígado en un tubo de cristal con capacidad para 10 ml y se añade 1 ml de 30% de hidróxido de potasio (KOH, Sigma, P1767-250G).
- Hervir en agua hasta que el tejido se disgregue (aproximadamente 10 minutos).
- Enfriar los tubos a temperatura ambiente y añadir 2 ml de etanol absoluto a 4°C e incubar a -20°C durante 24 horas.
- Centrifugar las muestras durante 15 min a $2000g$ a 4°C .
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de agua destilada y añadir 2 ml de etanol absoluto a 4°C .
- Centrifugar de nuevo durante 15 min a $2000g$ a 4°C .
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de 5N ácido sulfúrico (H_2SO_4).
- Hervir en agua durante 2 horas.
- Enfriar las muestras a temperatura ambiente.
- Aplicar 3 gotas (con el aplicador) del indicador de pH fenolftaleína (Fluka, 74760) y añadir óxido de sodio (NaOH) a la solución hasta que esta adquiere un tono ligeramente rosado para neutralizar el pH de la solución.
- Una vez neutralizado, añadir 250 μl de 0.2M de tampón fosfato a pH 7.4.
- Enrasar la solución a 3 ml con agua destilada.

NOTA: En este punto las muestras pueden guardarse a -20°C hasta su posterior análisis.

- Mediante el kit de cuantificación de glucosa (*Glucose (GO) assay kit*, Sigma, GAGO-20) se determina la concentración de esta para cada muestra.

12.5 Test de tolerancia a la glucosa.

Este test consiste en la administración i.p de D-glucosa (Sigma, G8270) al 10% en suero fisiológico para determinar la sensibilidad a la glucosa y su absorción por parte del hígado y los tejidos extrahepáticos. Tras la administración se mide la glucosa en sangre a partir de una gota de sangre de la cola con un glucómetro (Ver apartado 12.1).

PROTOCOLO:

- Ayunar los ratones durante 5 horas desde el inicio del ciclo de luz.
- Determinar la concentración de glucosa en sangre a tiempo 0.
- Administrar i.p D-glucosa al 10% en suero fisiológico.
- Determinar la concentración de glucosa en sangre a los 30, 60, 90 y 120 minutos.

12.6 Test de tolerancia a la insulina.

Este test consiste en la administración i.p de insulina a una concentración de 0.75 U/kg en suero fisiológico para determinar la resistencia a la insulina mediante la capacidad de los tejidos extrahepáticos para captar la glucosa en circulación. La concentración de glucosa en sangre se determina a partir de una gota de sangre de la cola de los ratones mediante un glucómetro (Ver apartado 12.1).

PROTOCOLO:

- Determinar la concentración de glucosa en sangre a tiempo 0.
- Administrar i.p 0.75U/kg de insulina (Sigma, I9278-5 ml) en suero fisiológico.
- Determinar la concentración de glucosa en sangre a los 15, 30, 60 y 120 minutos.

12.7 Producción de glucosa en sangre ante sustratos gluconeogénicos *in vivo*.

La concentración de glucosa se cuantifica a partir de una gota de sangre de la cola de ratones que han sido ayunados durante 24 horas, a partir del inicio del ciclo de luz del estabulario, tras la administración i.p de diferentes sustratos gluconeogénicos a las concentraciones que se indican en la Tabla 12, mediante un glucómetro (Ver apartado 12.1).

Tabla 12. Sustratos gluconeogénicos administrados i.p..

Sustrato	Concentración <i>in vivo</i>	Casa comercial	Referencia
Piruvato de sodio	2 g/kg	Sigma	P5280
L-glutamina	2 g/kg	Sigma	49419
L-lactato de sodio	2 g/kg	Sigma	L7022
L-alanina	2 g/kg	Sigma	A7469
Glicerol	2 g/kg	Sigma	G7893

PROTOCOLO:

- Ayunar los ratones durante 24 horas desde el inicio del ciclo de luz en el estabulario.
- Determinar la concentración de glucosa en sangre a tiempo 0.
- Administrar i.p el sustrato gluconeogénico a la concentración detallada en suero fisiológico.
- Determinar la concentración de glucosa en sangre a los 15, 30, 60 y 120 minutos.

12.8 Producción de glucosa en hepatocitos aislados ante sustratos gluconeogénicos.

La concentración de glucosa se cuantifica en el medio de los hepatocitos aislados que han sido ayunados y tratados con los diferentes sustratos gluconeogénicos a las concentraciones que se muestran en la Tabla 13.

PROTOCOLO:

- Aislar hepatocitos primarios (Apartado 5) y sembrar 1×10^5 células por pocillo (placa de 12 pocillos) y mantener en medio de mantenimiento con 2% de FCS y 200 nM de dexametasona (Sigma, D4902) o/n en el incubador a 37°C y 5% de CO₂.
- A las 16 horas, ayunar los hepatocitos en cultivo durante 6 horas, cambiando el medio de mantenimiento a DMEM básico sin glucosa.
- Incubar los hepatocitos con 1 ml de los sustratos gluconeogénicos diluidos en DMEM base durante 24 horas.

Tabla 13. Sustratos gluconeogénicos administrados en hepatocitos aislados en cultivo.

Sustrato	Concentración	Casa comercial	Referencia
Piruvato de sodio	2 mM	Sigma	P5280
L-glutamina	20 mM	Sigma	49419
L-lactato de sodio	20 mM	Sigma	L7022
L-alanina	20 mM	Sigma	A7469
Glicerol	20 mM	Sigma	G7893

- Recoger 1 ml de medio de cada pocillo
- Cuantificar la concentración de glucosa en el medio correspondiente a la glucosa producida mediante el kit comercial de glucosa (*Glucose (GO) assay kit*, Sigma, GAGO-20) según las instrucciones del fabricante.

12.9 Captación de NBDG.

La captación de glucosa en hepatocitos aislados se realizó mediante citometría de flujo (Ver apartado 8) mediante el marcador fluorescente 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) Amino)-2-Deoxiglucosa (NBDG, *Life Technologies*, N13195), un análogo de la glucosa.

PROTOCOLO:

- Aislar los hepatocitos de ratón (Apartado 5) y sembrar 2×10^5 células por pocillo (placa de 6 pocillos) y mantener en medio de mantenimiento o/n.
- Incubar los hepatocitos con 500 μM de NBDG en DMEM sin glucosa durante 10' a 37°C.
- Lavar la placa con PBS dos veces.
- Añadir 300 μl para un pocillo de 9 cm^2 de 0.5 mM EDTA y dejar durante 5 minutos a 37°C.
- Añadir 1 ml de medio de mantenimiento y raspar con mucho cuidado de no romper las células.
- Pipetear con una pipeta de 10 ml para disgregar las células
- Centrifugar los hepatocitos fijados a 700 g durante 4 minutos y aspirar el SN.
- Resuspender en 2 ml de PBS.
- Centrifugar a 700 g durante 4 minutos y aspirar el SN.
- Resuspender el pellet de hepatocitos en 500 μl de PBS.
- Mantener las muestras a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo.
- Filtrar las muestras con filtros de 100 μm (PARTEC, 04-0042-2318) antes de pasar por el citómetro.

Para esta técnica se ha usado el citómetro BD FACS Canto II (BD Bioscience) con láseres 405nm, 488nm y 633nm. Para detectar la fluorescencia de NBDG se usó el láser 488 nm y el filtro 530/30.

13. Aislamiento de membrana sinusoidal de hígado de ratón.

El aislamiento de membrana sinusoidal se puso a punto para hígado de ratón adaptándolo de un aislamiento de esta misma membrana en hígado de rata [427]. Para ello se utilizaron hígados de 4 ratones por genotipo (WT y AnxA6^{-/-}) y condición (comida *ad libitum* y ayuno durante 24 horas) para obtener unos 8 g de homogenado hepático en cada caso. Los animales de la condición de ayuno fueron ayunados a las 8.00 horas (inicio del ciclo de luz) y sacrificados a las 24 horas posteriores junto con la condición de comida *ad libitum*.

PROTOCOLO:

- Anestesiarse al ratón con 100mg/kg ketamina y 200mg/kg xilacina.
- Perfundir los ratones con PBS para eliminar el exceso de sangre en el hígado y posteriormente aislarlo.
- Pesar el hígado (8g, 4 ratones),
- Homogenizar el hígado en tampón de homogenización a pH7.5, de composición:

Tampón de homogenización
1mM NaHCO ₃
0.5 mM CaCl ₂
*Inhibidores de proteasas y fosfatasa

*Inhibidores de proteasas: 10µg/ml Aprotinina, 10µg/ml Leupeptina y 1mM PMSF;
Inhibidores de fosfatasa: 10mM NaF y 1mM ortovanadato sódico.

- Triturar con tijeras de cirugía los 4 hígados por línea y condición al mismo tiempo durante 1 minuto.
 - Triturar homogenizando al máximo con un bisturí (xxx) en pequeñas partes durante 3 minutos.
 - Añadir la muestra en el homogenizador (Dounce 40 ml, Wheaton, 357546) con un volumen 3 veces mayor de tampón de homogenización (1:3).
 - Homogenizar con el émbolo *tight* 6 veces.
- NOTA: en caso de no quedar bien homogenado este paso se hará más veces, pero siempre los mismos en todas las condiciones del experimento.
- Filtrar la muestra en una gasa quirúrgica (Gaspunt) de 2 capas previamente humedecida con el tampón de homogenización.
 - Volver a filtrar con 4 capas de gasa quirúrgica también humedecida. La muestra se recoge en un tubo de 50 ml y el volumen se ajusta a 25 ml.
 - Recoger una alícuota de 0.5 ml de **homogenado total** en este punto congelar a -20°C.
 - Centrifugar a 1000g durante 10' a 4°C.
 - El SN se guarda en un tubo de 50 ml y el pellet se resuspende en un volumen de 15 ml y se repite el paso anterior 2 veces.

- Los 3 SN guardados con un volumen de 30 ml aproximadamente se guardan en el mismo tubo de 50 ml y el pellet se resuspende en un volumen de 10 ml en Tris/HCl 10 mM pH7.5 y se congela a -20°.

- Los SN se centrifugan a 32811g con el rotor SW 32 Ti durante 12' (son necesarios 8' de centrifugación a la velocidad indicada de aceleración) a 4°C.

NOTA: Los tubos utilizados siempre para este experimento con el rotor SW 32 Ti son los tubos de policarbonato de pared gruesa (BECKMAN, 355631)

- El SN se recoge en un vaso de precipitados por decantación y el pellet se resuspende en 30 ml de tampón de homogenización y se repite el paso anterior de centrifugación.

- El total de SN (60 ml totales aproximadamente) de las dos centrífugas anteriores se guarda y el pellet es descartado.

- Los SN se centrifugan (30 ml en dos tubos por condición) durante 30' a 32811g con el rotor SW 32 Ti a 4°C.

- El **SN** se guarda en una alícuota de 1ml a -20°C y el resto se descarta. El pellet por duplicado de cada condición se resuspende en 10 ml de sacarosa al 80%. Para ello se juntan los 2 pellets de cada condición que son homogenizados primero en el mismo tubo con el émbolo (esta vez se usa el de ratón) *loose* y posteriormente en el mismo *Dounce* 3 veces.

NOTA: Si no se homogeniza bien se realiza la homogenización más veces pero siempre igual para cada condición que se realice en cada experimento.

- Proceder a cargar el gradiente de sacarosa (Serva, 35580) con sus distintas fases detalladas a continuación:

- 8% de sacarosa - 10ml

- 39% de sacarosa - 10 ml

- 80% de sacarosa, que contiene la muestra -10 ml

NOTA: Todas las concentraciones de sacarosa se diluyen en Tris/HCl 5 mM pH7.5.

- Centrifugar el gradiente a 43990g con el rotor SW 32 Ti a 4°C o/n.

- Recoger la fracción de membrana plasmática sinusoidal (**MPS**) que es la banda que queda entre la sacarosa 39% y 80%, absorbiendo con un catéter intravascular 24G (BD Insyte, 381212).

- El volumen recogido se resuspende en 30 ml de sacarosa 8% y se centrifuga a la máxima velocidad del rotor SW 32 Ti.

- El pellet se resuspende en 100 µl de Tris/HCl 10 mM.

A partir de aquí las muestras de **homogenado total**, **SN** y **MLF** se cuantifican mediante Bradford y se procede a la inmunodetección con los anticuerpos primarios de marcadores de las fracciones de membrana (Na⁺/K⁺ ATPasa) y retículo endoplásmico (Sec61) y SNAT2 para determinar su distribución en cada una de las condiciones.

14. Aminogramas de sangre e hígado de ratón.

Las muestras de plasma e hígado analizadas provienen de los ratones en condiciones de dieta de mantenimiento *ad libitum* y ayuno de 24 horas. Los animales de la condición de ayuno se les priva de la dieta de mantenimiento a las 8.00 horas (inicio del ciclo de luz) y son sacrificados a las 24 horas posteriores junto con la condición de dieta de mantenimiento *ad libitum*.

El tratamiento de cada uno de los tipos de muestra se produjo tal como se indica a continuación:

14.1 Plasma.

El plasma de los ratones se obtuvo tal como se indica en el apartado 4.5.

PROTOCOLO:

- Partir de 100 μ l de plasma.
 - Añadir 80 μ l de NorLeucina (patrón interno) 2.5 mM y 100 μ l de 10% trifluoroacético (TFA, Sigma-Aldrich T6508).
- NOTA: El TFA es muy volátil y corrosivo.
- Congelar las muestras a -20°C hasta el análisis.

14.2 Hígado.

Las muestras de hígado fueron extraídas de los mismos animales de los que se obtuvo el plasma. El hígado obtenido rápidamente se congeló en nieve carbónica y se mantuvo a -80°C hasta su manipulación.

La homogenización del hígado, en este caso, se realizó mediante la homogenización física con un mortero en nieve carbónica, para evitar la descongelación de la muestra y la degradación de las proteínas de ésta que interferirían en los aminogramas.

PROTOCOLO:

- Enfriar el mortero en nieve carbónica
 - Pulverizar el tejido hepático y pesarlo en una balanza de precisión, evitando en todo momento que la muestra se descongele.
- NOTA: Es necesaria una cantidad de entre 50-100 mg de hígado por muestra.
- Añadir 80 μ l de NorLeucina 2.5 mM y 350 μ l de H_2O :Acetona (1:1.2).
 - Sonicar la mezcla hasta que la muestra este homogénea.
 - Añadir 650 μ L de H_2O :Acetona (1:1.2).

- Hacer 2 ciclos de congelación/descongelación a -20°C y mantener las muestras congeladas a -20°C hasta el análisis.

14.3 Tratamiento común de todas las muestras.

Las muestras, a partir de aquí fueron tratadas y analizadas en *Centres Científics y Tecnològics de la Universitat de Barcelona* (CCiT-UB).

PROTOCOLO:

- Centrifugar las muestras a velocidad máxima durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Filtrar el SN con centrífuga de 10 kDa (en centrífuga a máxima velocidad durante el tiempo necesario para que pase toda la muestra por la columna).
- Lavar el pellet con agua y volver a centrifugar a velocidad máxima durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Filtrar el SN con el mismo centrífuga (en centrífuga a máxima velocidad durante el tiempo necesario para que pase toda la muestra por la columna).
- Pasar todo el volumen a viales de cristal y secar al vacío hasta que se evapore.
- Resuspender con 500 μl de tampón a pH 2.2.
- Congelar 50 μl de muestra hasta el análisis.

Los niveles de aminoácidos en la sangre e hígado de ratón son analizadas por cromatografía de separación por intercambio de cationes seguido de derivación post-columna con ninidrina y detección por UV [428]. El aparato utilizado es un *Amino Acid Analyzer*. (Biochrom 30). El *software* utilizado para el análisis es *EZChrom-Elite software*.

15. Transporte de [^{14}C]-L-alanina en hepatocitos aislados.

El protocolo utilizado para el estudio de la captación de [^{14}C]-L-alanina en hepatocitos aislados se modificó a partir del protocolo utilizado por Fafournoux *et al*, 1983 [182].

El medio Krebs-Hanseleit es la solución en que se mantienen los hepatocitos aislados en solución durante todo el experimento. La composición del Krebs-Hanseleit a pH 7.4 en este caso se prepara íntegramente ya que el Krebs comercial, utilizado habitualmente para el aislamiento de hepatocitos contiene glucosa.

Krebs-Hanseleit
118 mM NaCl
4.7 mM KCl
1.2 mM MgSO ₄
2.5 mM CaCl ₂ ·2·H ₂ O
1.2 mM KH ₂ PO ₄
25 mM NaHCO ₃

PROTOCOLO

- Aislar hepatocitos de ratón (Apartado 5).
- Mantener los hepatocitos en tubos de 15 ml en suspensión a una concentración de 3×10^6 células/ml en Krebs-Hanseleit + 3% de albúmina dializada (Sigma, A8806).
NOTA: 400 μl de esta suspensión son suficientes por condición.
- Preincubar los hepatocitos en suspensión con 1 mM de ácido amino oxiacético (inhibidor del metabolismo de L-alanina) (Sigma, C13408) durante 10 minutos a 37°C con agitación constante para evitar la sedimentación.
- Añadir 0.1 μCi de [^{14}C]-L-alanina (PerkinElmer, NEC266E050UC).
- Realizar diferentes tiempos de incubación de 2, 5 y 10 minutos en agitación a 37°C.
NOTA: Como control negativo se realizarán los mismos tiempos de incubación con L-[^{14}C]-alanina a 4°C correspondiendo con la inespecificidad de la técnica.
- Para parar la captación de [^{14}C]-L-alanina se añade 1.6 ml de Krebs-Hanseleit + 3% de albúmina dializada frío.
- Centrifugar los tubos de 15 ml con la muestra durante 5 segundos a 1000g y a 4°C.
- Descartar el SN y resuspender el pellet de células con 1 ml de Krebs-Hanseleit + 3% de albúmina dializada y pasar la muestra a un tubo de 1.5 ml a 4°C.
- Centrifugar durante 5 segundos a 1000g a 4°C, descartar el SN y resuspender el pellet de nuevo en 1 ml de Krebs-Hanseleit + 3% de albúmina dializada. Realizar la centrifugación una vez más.
- Descartar el SN y resuspender el pellet en 500 μl de Krebs-Hanseleit + 3% de albúmina dializada.

- Añadir la muestra a viales con 5 ml de líquido de centelleo.
- Contar la L-[¹⁴C]-alanina incorporada por los hepatocitos en un contador de centelleo (5 minutos por muestra).

Este ensayo se realiza con duplicados para cada una de las condiciones. Los resultados obtenidos se muestran en forma de contajes por minuto (cpm). Las cpm registradas para las muestras incubadas con [¹⁴C]-L-alanina a 4°C se restan.

16. Análisis estadístico.

Los resultados se muestran en forma de promedio \pm el error estándar de la media (SEM, *Standard error of the mean*). El análisis estadístico de los resultados se ha llevado a cabo con el programa *GraphPad, Prism 6*. Para la comparación de los datos referentes a una única variable para los genotipos WT vs. AnxA6^{-/-} se ha usado el test de t-Student para datos desaparejados. La estadística utilizada frente a datos de los dos genotipos ante varias variables ha sido ANOVA de dos factores con el post-test de *Bonferroni*.

El análisis estadístico de la supervivencia post-HP llevado a cabo consiste en el Test de *Gehan-Breslow-Wilcoxon*.

El p-valor muestra la significancia estadística de cada experimento. Se ha marcado en cada gráfico con 1, 2 o 3 estrellas el grado de significación según este patrón:

* $p < 0.05$: significativo.

** $p < 0.01$: muy significativo.

*** $p < 0.001$: el más significativo.

La muestra (n) utilizada para cada experimento se detalla en el pie de figura para cada uno de los ensayos y genotipo.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

1. Creutz, C.E., C.J. Pazoles, and H.B. Pollard, *Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules*. J Biol Chem, 1978. 253(8): p. 2858-66.
2. Gerke, V. and S.E. Moss, *Annexins: from structure to function*. Physiol Rev, 2002. 82(2): p. 331-71.
3. Crumpton, M.J. and J.R. Dedman, *Protein terminology tangle*. Nature, 1990. 345(6272): p. 212.
4. Creutz, C.E., et al., *Identification of chromaffin granule-binding proteins. Relationship of the chromobindins to calelectrin, synhibin, and the tyrosine kinase substrates p35 and p36*. J Biol Chem, 1987. 262(4): p. 1860-8.
5. Moore, P.B., N. Kraus-Friedmann, and J.R. Dedman, *Unique calcium-dependent hydrophobic binding proteins: possible independent mediators of intracellular calcium distinct from calmodulin*. J Cell Sci, 1984. 72: p. 121-33.
6. Flower, R.J., *Background and discovery of lipocortins*. Agents Actions, 1986. 17(3-4): p. 255-62.
7. Glenney, J.R., Jr., B. Tack, and M.A. Powell, *Calpactins: two distinct Ca⁺⁺-regulated phospholipid- and actin-binding proteins isolated from lung and placenta*. J Cell Biol, 1987. 104(3): p. 503-11.
8. Moss, S.E. and R.O. Morgan, *The annexins*. Genome Biol, 2004. 5(4): p. 219.
9. Liemann, S. and A. Lewit-Bentley, *Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function*. Structure, 1995. 3(3): p. 233-7.
10. Gerke, V., C.E. Creutz, and S.E. Moss, *Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. 6(6): p. 449-61.
11. Tomas, A. and S.E. Moss, *Calcium- and cell cycle-dependent association of annexin 11 with the nuclear envelope*. J Biol Chem, 2003. 278(22): p. 20210-6.
12. Eberhard, D.A., et al., *Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding*. J Cell Sci, 2001. 114(Pt 17): p. 3155-66.
13. Raynal, P. and H.B. Pollard, *Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins*. Biochim Biophys Acta, 1994. 1197(1): p. 63-93.
14. Rescher, U. and V. Gerke, *Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions*. J Cell Sci, 2004. 117(Pt 13): p. 2631-9.
15. Hayes, M.J., et al., *Regulation of actin dynamics by annexin 2*. EMBO J, 2006. 25(9): p. 1816-26.
16. van de Graaf, S.F., et al., *Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex*. EMBO J, 2003. 22(7): p. 1478-87.

17. Hayes, M.J., et al., *Annexin A2 at the interface between F-actin and membranes enriched in phosphatidylinositol 4,5,-bisphosphate*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1793(6): p. 1086-95.
18. Grieve, A.G., S.E. Moss, and M.J. Hayes, *Annexin A2 at the interface of actin and membrane dynamics: a focus on its roles in endocytosis and cell polarization*. *Int J Cell Biol*, 2012. 2012: p. 852430.
19. Lafont, F., et al., *Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery*. *J Cell Biol*, 1998. 142(6): p. 1413-27.
20. Konig, J., et al., *The annexin II-p11 complex is involved in regulated exocytosis in bovine pulmonary artery endothelial cells*. *J Biol Chem*, 1998. 273(31): p. 19679-84.
21. Sousa, L.P., et al., *Pharmacological strategies to resolve acute inflammation*. *Curr Opin Pharmacol*, 2013. 13(4): p. 625-31.
22. Flower, R.J. and N.J. Rothwell, *Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance*. *Trends Pharmacol Sci*, 1994. 15(3): p. 71-6.
23. Perretti, M. and F. D'Acquisto, *Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(1): p. 62-70.
24. White, I.J., et al., *EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation*. *EMBO J*, 2006. 25(1): p. 1-12.
25. Grewal, T. and C. Enrich, *Annexins--modulators of EGF receptor signalling and trafficking*. *Cell Signal*, 2009. 21(6): p. 847-58.
26. Solito, E., et al., *A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils*. *FASEB J*, 2003. 17(11): p. 1544-6.
27. Flood, E.C. and K.A. Hajjar, *The annexin A2 system and vascular homeostasis*. *Vascul Pharmacol*, 2011. 54(3-6): p. 59-67.
28. Bharadwaj, A., et al., *Annexin A2 heterotetramer: structure and function*. *Int J Mol Sci*, 2013. 14(3): p. 6259-305.
29. Hayes, M.J., et al., *Annexin-actin interactions*. *Traffic*, 2004. 5(8): p. 571-6.
30. Wu, N., et al., *The role of annexin A3 playing in cancers*. *Clin Transl Oncol*, 2013. 15(2): p. 106-10.
31. Harashima, M., et al., *Annexin A3 expression increases in hepatocytes and is regulated by hepatocyte growth factor in rat liver regeneration*. *J Biochem*, 2008. 143(4): p. 537-45.
32. Rand, J.H., *Antiphospholipid antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome*. *J Autoimmun*, 2000. 15(2): p. 107-11.
33. Kenis, H., et al., *Cell surface-expressed phosphatidylserine and annexin A5 open a novel portal of cell entry*. *J Biol Chem*, 2004. 279(50): p. 52623-9.
34. Enrich, C., et al., *Annexin A6-Linking Ca(2+) signaling with cholesterol transport*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1813(5): p. 935-47.
35. Guo, C., et al., *Potential role of annexin A7 in cancers*. *Clin Chim Acta*, 2013. 423: p. 83-9.
36. Goebeler, V., et al., *Annexin A8 displays unique phospholipid and F-actin binding properties*. *FEBS Lett*, 2006. 580(10): p. 2430-4.
37. Goebeler, V., et al., *Annexin A8 regulates late endosome organization and function*. *Mol Biol Cell*, 2008. 19(12): p. 5267-78.
38. Goebeler, V., et al., *Atypical properties displayed by annexin A9, a novel member of the annexin family of Ca(2+) and lipid binding proteins*. *FEBS Lett*, 2003. 546(2-3): p. 359-64.

39. Mussunoor, S. and G.I. Murray, *The role of annexins in tumour development and progression*. J Pathol, 2008. 216(2): p. 131-40.
40. Tomas, A., C. Futter, and S.E. Moss, *Annexin 11 is required for midbody formation and completion of the terminal phase of cytokinesis*. J Cell Biol, 2004. 165(6): p. 813-22.
41. Fatimathas, L. and S.E. Moss, *Annexins as disease modifiers*. Histol Histopathol, 2010. 25(4): p. 527-32.
42. Chetcuti, A., et al., *Identification of differentially expressed genes in organ-confined prostate cancer by gene expression array*. Prostate, 2001. 47(2): p. 132-40.
43. Srivastava, M., et al., *ANX7 as a bio-marker in prostate and breast cancer progression*. Dis Markers, 2001. 17(2): p. 115-20.
44. Xin, W., et al., *Dysregulation of the annexin family protein family is associated with prostate cancer progression*. Am J Pathol, 2003. 162(1): p. 255-61.
45. Srivastava, M., et al., *ANX7, a candidate tumor suppressor gene for prostate cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(8): p. 4575-80.
46. Bhargava, R., et al., *EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations*. Mod Pathol, 2005. 18(8): p. 1027-33.
47. Duncan, R., et al., *Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer*. Br J Cancer, 2008. 98(2): p. 426-33.
48. Deng, S., et al., *Annexin A1, A2, A4 and A5 play important roles in breast cancer, pancreatic cancer and laryngeal carcinoma, alone and/or synergistically*. Oncol Lett, 2013. 5(1): p. 107-112.
49. Lu, Z., et al., *Transport of a cancer chemopreventive polyphenol, resveratrol: interaction with serum albumin and hemoglobin*. J Fluoresc, 2007. 17(5): p. 580-7.
50. Falsey, R.R., et al., *Actin microfilament aggregation induced by withaferin A is mediated by annexin II*. Nat Chem Biol, 2006. 2(1): p. 33-8.
51. Matsuzaki, S., et al., *Annexin A4 is a promising therapeutic target for the treatment of platinum-resistant cancers*. Expert Opin Ther Targets, 2014. 18(4): p. 403-14.
52. Rand, J.H., *The annexinopathies: a new category of diseases*. Biochim Biophys Acta, 2000. 1498(2-3): p. 169-73.
53. Hiddink, L., et al., *Annexin A5 haplotypes in the antiphospholipid syndrome*. Thromb Res, 2015. 135(2): p. 417-9.
54. Salle, V., et al., *Anti-annexin II antibodies in systemic autoimmune diseases and antiphospholipid syndrome*. J Clin Immunol, 2008. 28(4): p. 291-7.
55. Cesarman-Maus, G., et al., *Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome*. Blood, 2006. 107(11): p. 4375-82.
56. Hajjar, K.A., A.T. Jacovina, and J. Chacko, *An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II*. J Biol Chem, 1994. 269(33): p. 21191-7.
57. Davies, A.A., et al., *Nonidet P-40 extraction of lymphocyte plasma membrane. Characterization of the insoluble residue*. Biochem J, 1984. 219(1): p. 301-8.

58. Grewal, T., et al., *Annexin A6-regulator of the EGFR/Ras signalling pathway and cholesterol homeostasis*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. 42(5): p. 580-4.
59. Avila-Sakar, A.J., R.H. Kretsinger, and C.E. Creutz, *Membrane-bound 3D structures reveal the intrinsic flexibility of annexin VI*. *J Struct Biol*, 2000. 130(1): p. 54-62.
60. Benz, J., et al., *The structure of recombinant human annexin VI in crystals and membrane-bound*. *J Mol Biol*, 1996. 260(5): p. 638-43.
61. Freye-Minks, C., R.H. Kretsinger, and C.E. Creutz, *Structural and dynamic changes in human annexin VI induced by a phosphorylation-mimicking mutation, T356D*. *Biochemistry*, 2003. 42(3): p. 620-30.
62. Huber, R., et al., *The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution. Implications for membrane binding and calcium channel activity*. *FEBS Lett*, 1990. 275(1-2): p. 15-21.
63. Kawasaki, H., et al., *The crystal structure of annexin VI indicates relative rotation of the two lobes upon membrane binding*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. 1313(3): p. 277-82.
64. Moss, S.E. and M.J. Crumpton, *Alternative splicing gives rise to two forms of the p68 Ca²⁺-binding protein*. *FEBS Lett*, 1990. 261(2): p. 299-302.
65. Edwards, H.C. and M.J. Crumpton, *Ca²⁺-dependent phospholipid and arachidonic acid binding by the placental annexins VI and IV*. *Eur J Biochem*, 1991. 198(1): p. 121-9.
66. Grewal, T., et al., *Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment*. *J Biol Chem*, 2000. 275(43): p. 33806-13.
67. Tagoe, C.E., et al., *Characterization and immunolocalization of rat liver annexin VI*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. 1192(2): p. 272-80.
68. Stogbauer, F., et al., *Annexin A6 is highly abundant in monocytes of obese and type 2 diabetic individuals and is downregulated by adiponectin in vitro*. *Exp Mol Med*, 2009. 41(7): p. 501-7.
69. Smythe, E., et al., *Endocytosis occurs independently of annexin VI in human A431 cells*. *J Cell Biol*, 1994. 124(3): p. 301-6.
70. Vila de Muga, S., et al., *Annexin A6 inhibits Ras signalling in breast cancer cells*. *Oncogene*, 2009. 28(3): p. 363-77.
71. Ayala-Sanmartin, J., J.P. Henry, and L.A. Pradel, *Cholesterol regulates membrane binding and aggregation by annexin 2 at submicromolar Ca²⁺ concentration*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. 1510(1-2): p. 18-28.
72. Ayala-Sanmartin, J., *Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of annexins by their core domain*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 283(1): p. 72-9.
73. Pons, M., et al., *Evidence for the Involvement of annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes*. *Exp Cell Res*, 2001. 269(1): p. 13-22.
74. Cubells, L., et al., *Annexin A6-induced inhibition of cytoplasmic phospholipase A2 is linked to caveolin-1 export from the Golgi*. *J Biol Chem*, 2008. 283(15): p. 10174-83.
75. Cubells, L., et al., *Annexin A6-induced alterations in cholesterol transport and caveolin export from the Golgi complex*. *Traffic*, 2007. 8(11): p. 1568-89.

76. Simons, K. and E. Ikonen, *How cells handle cholesterol*. Science, 2000. 290(5497): p. 1721-6.
77. Leturque, A., et al., *The role of GLUT2 in dietary sugar handling*. J Physiol Biochem, 2005. 61(4): p. 529-37.
78. de Diego, I., et al., *Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6*. J Biol Chem, 2002. 277(35): p. 32187-94.
79. Sztolsztener, M.E., et al., *Cholesterol as a factor regulating intracellular localization of annexin A6 in Niemann-Pick type C human skin fibroblasts*. Arch Biochem Biophys, 2010. 493(2): p. 221-33.
80. Pol, A., et al., *A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance*. J Cell Biol, 2001. 152(5): p. 1057-70.
81. Grimmer, S., et al., *Golgi vesiculation induced by cholesterol occurs by a dynamin- and cPLA2-dependent mechanism*. Traffic, 2005. 6(2): p. 144-56.
82. Sudhof, T.C. and J.E. Rothman, *Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins*. Science, 2009. 323(5913): p. 474-7.
83. Wang, Y., C. Thiele, and W.B. Huttner, *Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network*. Traffic, 2000. 1(12): p. 952-62.
84. Connell, E., et al., *Mechanism of arachidonic acid action on syntaxin-Munc18*. EMBO Rep, 2007. 8(4): p. 414-9.
85. Rickman, C. and B. Davletov, *Arachidonic acid allows SNARE complex formation in the presence of Munc18*. Chem Biol, 2005. 12(5): p. 545-53.
86. Reverter, M., et al., *Cholesterol transport from late endosomes to the Golgi regulates t-SNARE trafficking, assembly, and function*. Mol Biol Cell, 2011. 22(21): p. 4108-23.
87. Reverter, M., et al., *Cholesterol regulates Syntaxin 6 trafficking at trans-Golgi network endosomal boundaries*. Cell Rep, 2014. 7(3): p. 883-97.
88. Creutz, C.E. and S.L. Snyder, *Interactions of annexins with the mu subunits of the clathrin assembly proteins*. Biochemistry, 2005. 44(42): p. 13795-806.
89. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. 387(6633): p. 569-72.
90. Alvarez-Guaita, A., et al., *Evidence for Annexin A6-dependent plasma membrane remodelling of lipid domains*. Br J Pharmacol, 2014.
91. Hosoya, H., et al., *Ca(2+)-regulated actin and phospholipid binding protein (68 kD-protein) from bovine liver: identification as a homologue for annexin VI and intracellular localization*. Cell Motil Cytoskeleton, 1992. 22(3): p. 200-10.
92. Monastyrskaya, K., et al., *Plasma membrane-associated annexin A6 reduces Ca²⁺ entry by stabilizing the cortical actin cytoskeleton*. J Biol Chem, 2009. 284(25): p. 17227-42.
93. Ortega, D., et al., *[Immunohistochemical localization of annexin VI in the endocytic compartment of rat liver hepatocytes]*. Gastroenterol Hepatol, 1997. 20(8): p. 391-7.
94. Kamal, A., Y. Ying, and R.G. Anderson, *Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes*. J Cell Biol, 1998. 142(4): p. 937-47.

95. Grewal, T. and C. Enrich, *Molecular mechanisms involved in Ras inactivation: the annexin A6-p120GAP complex*. *Bioessays*, 2006. 28(12): p. 1211-20.
96. Grewal, T., et al., *Annexin A6 stimulates the membrane recruitment of p120GAP to modulate Ras and Raf-1 activity*. *Oncogene*, 2005. 24(38): p. 5809-20.
97. Pons, M., et al., *Activation of Raf-1 is defective in annexin 6 overexpressing Chinese hamster ovary cells*. *FEBS Lett*, 2001. 501(1): p. 69-73.
98. Koese, M., et al., *Annexin A6 is a scaffold for PKC α to promote EGFR inactivation*. *Oncogene*, 2013. 32(23): p. 2858-72.
99. Wood, P., et al., *Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling modulates protein stability and cell surface expression of scavenger receptor SR-BI*. *J Biol Chem*, 2011. 286(26): p. 23077-92.
100. Rentero, C., et al., *Inhibition of H-Ras and MAPK is compensated by PKC-dependent pathways in annexin A6 expressing cells*. *Cell Signal*, 2006. 18(7): p. 1006-16.
101. Campbell, K.A., et al., *Annexin A6 interacts with p65 and stimulates NF- κ B activity and catabolic events in articular chondrocytes*. *Arthritis Rheum*, 2013. 65(12): p. 3120-9.
102. Swaggart, K.A., et al., *Annexin A6 modifies muscular dystrophy by mediating sarcolemmal repair*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(16): p. 6004-9.
103. Genteski-Hamblin, A.M., et al., *Annexin VI overexpression targeted to heart alters cardiomyocyte function in transgenic mice*. *Am J Physiol*, 1996. 270(3 Pt 2): p. H1091-100.
104. Song, G., et al., *Altered cardiac annexin mRNA and protein levels in the left ventricle of patients with end-stage heart failure*. *J Mol Cell Cardiol*, 1998. 30(3): p. 443-51.
105. Song, G., et al., *Altered mechanical properties and intracellular calcium signaling in cardiomyocytes from annexin 6 null-mutant mice*. *FASEB J*, 2002. 16(6): p. 622-4.
106. Hawkins, T.E., et al., *Immunological development and cardiovascular function are normal in annexin VI null mutant mice*. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(12): p. 8028-32.
107. Mishra, S., et al., *Interaction of annexin A6 with alpha actinin in cardiomyocytes*. *BMC Cell Biol*, 2011. 12: p. 7.
108. Sakwe, A.M., et al., *Annexin A6 contributes to the invasiveness of breast carcinoma cells by influencing the organization and localization of functional focal adhesions*. *Exp Cell Res*, 2011. 317(6): p. 823-37.
109. Ross, M., G. Kaye, and W. Pawlina, *Histology: A Text and Atlas*, 2004, Lipincott & Williams & Wilkins: Buenos Aires. p. 880.
110. Arias, I.M., et al., *The Liver: Biology and Pathobiology*. Fifth Edition ed. Vol. 1. 2009: A John Wiley & Sons, Ltd., Publication. 1088.
111. Martins, P.N., T.P. Theruvath, and P. Neuhaus, *Rodent models of partial hepatectomies*. *Liver Int*, 2008. 28(1): p. 3-11.
112. Greene, A.K. and M. Puder, *Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management*. *J Invest Surg*, 2003. 16(2): p. 99-102.

113. Hijmans, B.S., et al., *Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: mechanism and metabolic consequences*. *Biochimie*, 2014. 96: p. 121-9.
114. Gebhardt, R., *Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function*. *Pharmacol Ther*, 1992. 53(3): p. 275-354.
115. Blouin, A., R.P. Bolender, and E.R. Weibel, *Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study*. *J Cell Biol*, 1977. 72(2): p. 441-55.
116. Weibel, E.R., et al., *Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver*. *J Cell Biol*, 1969. 42(1): p. 68-91.
117. Wisse, E., et al., *The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse*. *Hepatology*, 1985. 5(4): p. 683-92.
118. Martinez-Hernandez, A. and P.S. Amenta, *The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1993. 423(1): p. 1-11.
119. Smedsrod, B., et al., *Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells*. *Gut*, 1994. 35(11): p. 1509-16.
120. Wack, K.E., et al., *Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating rat liver*. *Hepatology*, 2001. 33(2): p. 363-78.
121. Fausto, N., J.S. Campbell, and K.J. Riehle, *Liver regeneration*. *J Hepatol*, 2012. 57(3): p. 692-4.
122. Friedman, S.L., *Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver*. *Physiol Rev*, 2008. 88(1): p. 125-72.
123. Alpini, G., et al., *Molecular and functional heterogeneity of cholangiocytes from rat liver after bile duct ligation*. *Am J Physiol*, 1997. 272(2 Pt 1): p. G289-97.
124. Huang, B.Q., et al., *Isolation and characterization of cholangiocyte primary cilia*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. 291(3): p. G500-9.
125. Doherty, D.G. and C. O'Farrelly, *Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver*. *Immunol Rev*, 2000. 174: p. 5-20.
126. Parker, G.A. and C.A. Picut, *Liver immunobiology*. *Toxicol Pathol*, 2005. 33(1): p. 52-62.
127. Bechmann, L.P., et al., *The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases*. *J Hepatol*, 2012. 56(4): p. 952-64.
128. Rui, L., *Energy metabolism in the liver*. *Compr Physiol*, 2014. 4(1): p. 177-97.
129. Daniels, T.F., et al., *Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health*. *Int J Biol Sci*, 2009. 5(5): p. 474-88.
130. Wang, T.Y., et al., *New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption*. *Eur J Clin Invest*, 2013. 43(11): p. 1203-23.
131. Timlin, M.T. and E.J. Parks, *Temporal pattern of de novo lipogenesis in the postprandial state in healthy men*. *Am J Clin Nutr*, 2005. 81(1): p. 35-42.
132. Merkel, M., R.H. Eckel, and I.J. Goldberg, *Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation*. *J Lipid Res*, 2002. 43(12): p. 1997-2006.

133. Shen, W.J., et al., *Scavenger receptor class B type I (SR-BI): a versatile receptor with multiple functions and actions*. *Metabolism*, 2014. 63(7): p. 875-86.
134. Arner, P., *Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2005. 19(4): p. 471-82.
135. Berk, P.D., *Regulatable fatty acid transport mechanisms are central to the pathophysiology of obesity, fatty liver, and metabolic syndrome*. *Hepatology*, 2008. 48(5): p. 1362-76.
136. Zhou, S.L., et al., *Adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells involves augmented expression of a 43-kDa plasma membrane fatty acid-binding protein*. *J Biol Chem*, 1992. 267(20): p. 14456-61.
137. Zhou, S.L., et al., *Mitochondrial aspartate aminotransferase expressed on the surface of 3T3-L1 adipocytes mediates saturable fatty acid uptake*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1995. 208(3): p. 263-70.
138. Trigatti, B.L., R.G. Anderson, and G.E. Gerber, *Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 255(1): p. 34-9.
139. Nguyen, P., et al., *Liver lipid metabolism*. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2008. 92(3): p. 272-83.
140. Smith, S., A. Witkowski, and A.K. Joshi, *Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase*. *Prog Lipid Res*, 2003. 42(4): p. 289-317.
141. Coleman, R.A. and D.P. Lee, *Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation*. *Prog Lipid Res*, 2004. 43(2): p. 134-76.
142. Wendel, A.A., T.M. Lewin, and R.A. Coleman, *Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1791(6): p. 501-6.
143. Neuschwander-Tetri, B.A., *Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites*. *Hepatology*, 2010. 52(2): p. 774-88.
144. Walther, T.C. and R.V. Farese, Jr., *Lipid droplets and cellular lipid metabolism*. *Annu Rev Biochem*, 2012. 81: p. 687-714.
145. Martin, S. and R.G. Parton, *Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(5): p. 373-8.
146. Pol, A., S.P. Gross, and R.G. Parton, *Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites*. *J Cell Biol*, 2014. 204(5): p. 635-46.
147. Krahmer, N., R.V. Farese, Jr., and T.C. Walther, *Balancing the fat: lipid droplets and human disease*. *EMBO Mol Med*, 2013. 5(7): p. 905-15.
148. Angulo, P., *Nonalcoholic fatty liver disease*. *N Engl J Med*, 2002. 346(16): p. 1221-31.
149. Kohjima, M., et al., *Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adipose differentiation related protein-null mice*. *J Hepatol*, 2013. 59(6): p. 1246-54.
150. Singh, R., et al., *Autophagy regulates lipid metabolism*. *Nature*, 2009. 458(7242): p. 1131-5.
151. Herms, A., et al., *Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity*. *Curr Biol*, 2013. 23(15): p. 1489-96.

152. Lass, A., et al., *Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores*. Prog Lipid Res, 2011. 50(1): p. 14-27.
153. Lass, A., et al., *Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome*. Cell Metab, 2006. 3(5): p. 309-19.
154. Zechner, R., et al., *FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling*. Cell Metab, 2012. 15(3): p. 279-91.
155. Quiroga, A.D. and R. Lehner, *Liver triacylglycerol lipases*. Biochim Biophys Acta, 2012. 1821(5): p. 762-9.
156. Lian, J., et al., *Liver specific inactivation of carboxylesterase 3/triacylglycerol hydrolase decreases blood lipids without causing severe steatosis in mice*. Hepatology, 2012. 56(6): p. 2154-62.
157. Czaja, M.J., *Autophagy in health and disease. 2. Regulation of lipid metabolism and storage by autophagy: pathophysiological implications*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. 298(5): p. C973-8.
158. Singh, R., *Autophagy and regulation of lipid metabolism*. Results Probl Cell Differ, 2010. 52: p. 35-46.
159. Shibata, M., et al., *The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 382(2): p. 419-23.
160. Finn, P.F. and J.F. Dice, *Proteolytic and lipolytic responses to starvation*. Nutrition, 2006. 22(7-8): p. 830-44.
161. Nelson, D. and C. MM., *Lehninger principles of biochemistry*. 4th edition ed2005, New York: W.H. Freeman.
162. Akkaoui, M., et al., *Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids*. Biochem J, 2009. 420(3): p. 429-38.
163. Sato, R., *Sterol metabolism and SREBP activation*. Arch Biochem Biophys, 2010. 501(2): p. 177-81.
164. Adeli, K., et al., *Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance*. Trends Cardiovasc Med, 2001. 11(5): p. 170-6.
165. Maxfield, F.R. and G. van Meer, *Cholesterol, the central lipid of mammalian cells*. Curr Opin Cell Biol, 2010. 22(4): p. 422-9.
166. Tran-Dinh, A., et al., *HDL and endothelial protection*. Br J Pharmacol, 2013. 169(3): p. 493-511.
167. Russell, D.W., *Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism*. J Lipid Res, 2009. 50 Suppl: p. S120-5.
168. Agius, L., *Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism*. Biochem J, 2008. 414(1): p. 1-18.
169. Karim, S., D.H. Adams, and P.F. Lalor, *Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family*. World J Gastroenterol, 2012. 18(46): p. 6771-81.
170. Seyer, P., et al., *Hepatic glucose sensing is required to preserve beta cell glucose competence*. J Clin Invest, 2013. 123(4): p. 1662-76.
171. Leturque, A., E. Brot-Laroche, and M. Le Gall, *GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. 296(5): p. E985-92.

172. Lee, J.M., et al., *A nuclear-receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects*. *Nature*, 2011. 474(7352): p. 506-10.
173. Oosterveer, M.H., et al., *LRH-1-dependent glucose sensing determines intermediary metabolism in liver*. *J Clin Invest*, 2012. 122(8): p. 2817-26.
174. Chu, C.A., et al., *Rapid translocation of hepatic glucokinase in response to intraduodenal glucose infusion and changes in plasma glucose and insulin in conscious rats*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. 286(4): p. G627-34.
175. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger Principios de Bioquímica. Tercera Edición*. third ed2001: Ediciones Omega.
176. Bollen, M., S. Keppens, and W. Stalmans, *Specific features of glycogen metabolism in the liver*. *Biochem J*, 1998. 336 (Pt 1): p. 19-31.
177. Kim, H.S., et al., *Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis*. *Cell Metab*, 2010. 12(3): p. 224-36.
178. Jeong, J.Y., et al., *Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase*. *Diabetes Metab J*, 2012. 36(5): p. 328-35.
179. Dashty, M., *A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism*. *Clin Biochem*, 2013. 46(15): p. 1339-52.
180. Felig, P., *Amino acid metabolism in man*. *Annu Rev Biochem*, 1975. 44: p. 933-55.
181. Yamamoto, H., et al., *Interorganal relationships of amino acid metabolism in fed rats*. *Am J Physiol*, 1974. 226(6): p. 1428-33.
182. Fafournoux, P., C. Remesy, and C. Demigne, *Control of alanine metabolism in rat liver by transport processes or cellular metabolism*. *Biochem J*, 1983. 210(3): p. 645-52.
183. Brosnan, J.T., *Interorgan amino acid transport and its regulation*. *J Nutr*, 2003. 133(6 Suppl 1): p. 2068S-2072S.
184. Mithieux, G., et al., *Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. 286(3): p. E370-5.
185. Owen, O.E., et al., *Liver and kidney metabolism during prolonged starvation*. *J Clin Invest*, 1969. 48(3): p. 574-83.
186. Gerich, J.E., et al., *Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis*. *Diabetes Care*, 2001. 24(2): p. 382-91.
187. Glinghammar, B., et al., *Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma*. *Int J Mol Med*, 2009. 23(5): p. 621-31.
188. Lindblom, P., et al., *Isoforms of alanine aminotransferases in human tissues and serum--differential tissue expression using novel antibodies*. *Arch Biochem Biophys*, 2007. 466(1): p. 66-77.
189. Jelen, S., et al., *Aquaporin-9 and urea transporter-A gene deletions affect urea transmembrane passage in murine hepatocytes*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012. 303(11): p. G1279-87.
190. Jelen, S., et al., *Aquaporin-9 protein is the primary route of hepatocyte glycerol uptake for glycerol gluconeogenesis in mice*. *J Biol Chem*, 2011. 286(52): p. 44319-25.

191. Calamita, G., et al., *Biophysical assessment of aquaporin-9 as principal facilitative pathway in mouse liver import of glucogenetic glycerol*. *Biol Cell*, 2012. 104(6): p. 342-51.
192. Mutel, E., et al., *Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas*. *J Hepatol*, 2011. 54(3): p. 529-37.
193. Lei, K.J., et al., *Glucose-6-phosphatase dependent substrate transport in the glycogen storage disease type-1a mouse*. *Nat Genet*, 1996. 13(2): p. 203-9.
194. She, P., et al., *Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism*. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(17): p. 6508-17.
195. Burgess, S.C., et al., *Impaired tricarboxylic acid cycle activity in mouse livers lacking cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase*. *J Biol Chem*, 2004. 279(47): p. 48941-9.
196. Zhao, S., et al., *Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation*. *Science*, 2010. 327(5968): p. 1000-4.
197. Herzig, S., et al., *CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1*. *Nature*, 2001. 413(6852): p. 179-83.
198. Matsumoto, M., et al., *Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver*. *Cell Metab*, 2007. 6(3): p. 208-16.
199. Inoue, Y., et al., *Disruption of hepatic C/EBPalpha results in impaired glucose tolerance and age-dependent hepatosteatosis*. *J Biol Chem*, 2004. 279(43): p. 44740-8.
200. Kimura, T., et al., *Hypoglycemia-associated hyperammonemia caused by impaired expression of ornithine cycle enzyme genes in C/EBPalpha knockout mice*. *J Biol Chem*, 1998. 273(42): p. 27505-10.
201. Malandro, M.S. and M.S. Kilberg, *Molecular biology of mammalian amino acid transporters*. *Annu Rev Biochem*, 1996. 65: p. 305-36.
202. Palacin, M., et al., *Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters*. *Physiol Rev*, 1998. 78(4): p. 969-1054.
203. McGivan, J.D., *Mammalian amino acid transporters and their regulation: introduction*. *Biochem Soc Trans*, 1996. 24(3): p. 837-8.
204. del Amo, E.M., A. Urtti, and M. Yliperttula, *Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2*. *Eur J Pharm Sci*, 2008. 35(3): p. 161-74.
205. Weissbach, L., et al., *Evidence for two Na⁺-independent neutral amino acid transport systems in primary cultures of rat hepatocytes. Time-dependent changes in activity*. *J Biol Chem*, 1982. 257(20): p. 12006-11.
206. Reimer, R.J., et al., *Amino acid transport system A resembles system N in sequence but differs in mechanism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(14): p. 7715-20.
207. Romero, M.F., et al., *The SLC4 family of bicarbonate (HCO₃⁻) transporters*. *Mol Aspects Med*, 2013. 34(2-3): p. 159-82.
208. Mueckler, M. and B. Thorens, *The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters*. *Mol Aspects Med*, 2013. 34(2-3): p. 121-38.
209. Wright, E.M., *Glucose transport families SLC5 and SLC50*. *Mol Aspects Med*, 2013. 34(2-3): p. 183-96.

210. Khananshvili, D., *The SLC8 gene family of sodium-calcium exchangers (NCX) - structure, function, and regulation in health and disease*. Mol Aspects Med, 2013. 34(2-3): p. 220-35.
211. Donowitz, M., C. Ming Tse, and D. Fuster, *SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchangers*. Mol Aspects Med, 2013. 34(2-3): p. 236-51.
212. Claro da Silva, T., J.E. Polli, and P.W. Swaan, *The solute carrier family 10 (SLC10): beyond bile acid transport*. Mol Aspects Med, 2013. 34(2-3): p. 252-69.
213. Fredriksson, R., et al., *The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families*. FEBS Lett, 2008. 582(27): p. 3811-6.
214. Kanai, Y., et al., *The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family*. Mol Aspects Med, 2013. 34(2-3): p. 108-20.
215. Fotiadis, D., Y. Kanai, and M. Palacin, *The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters*. Mol Aspects Med, 2013. 34(2-3): p. 139-58.
216. Reimer, R.J., *SLC17: a functionally diverse family of organic anion transporters*. Mol Aspects Med, 2013. 34(2-3): p. 350-9.
217. Schioth, H.B., et al., *Evolutionary origin of amino acid transporter families SLC32, SLC36 and SLC38 and physiological, pathological and therapeutic aspects*. Mol Aspects Med, 2013. 34(2-3): p. 571-85.
218. Bodoy, S., et al., *The small SLC43 family: facilitator system I amino acid transporters and the orphan EEG1*. Mol Aspects Med, 2013. 34(2-3): p. 638-45.
219. Hoglund, P.J., et al., *The solute carrier families have a remarkably long evolutionary history with the majority of the human families present before divergence of Bilaterian species*. Mol Biol Evol, 2011. 28(4): p. 1531-41.
220. Broer, S., *The SLC38 family of sodium-amino acid co-transporters*. Pflugers Arch, 2014. 466(1): p. 155-72.
221. Freeman, T.L., H.Q. Ngo, and M.E. Mailliard, *Inhibition of system A amino acid transport and hepatocyte proliferation following partial hepatectomy in the rat*. Hepatology, 1999. 30(2): p. 437-44.
222. Krebs, H.A., *Some aspects of the regulation of fuel supply in omnivorous animals*. Adv Enzyme Regul, 1972. 10: p. 397-420.
223. White, M.F., *IRS proteins and the common path to diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. 283(3): p. E413-22.
224. Fafalios, A., et al., *A hepatocyte growth factor receptor (Met)-insulin receptor hybrid governs hepatic glucose metabolism*. Nat Med, 2011. 17(12): p. 1577-84.
225. Klover, P.J. and R.A. Mooney, *Hepatocytes: critical for glucose homeostasis*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. 36(5): p. 753-8.
226. Haeusler, R.A., K.H. Kaestner, and D. Accili, *FoxOs function synergistically to promote glucose production*. J Biol Chem, 2010. 285(46): p. 35245-8.
227. Li, X., et al., *Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator*. Nature, 2007. 447(7147): p. 1012-6.
228. Puigserver, P., et al., *Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction*. Nature, 2003. 423(6939): p. 550-5.
229. Lu, M., et al., *Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1*. Nat Med, 2012. 18(3): p. 388-95.

230. Okar, D.A., et al., *PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate*. Trends Biochem Sci, 2001. 26(1): p. 30-5.
231. Li, S., M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(8): p. 3441-6.
232. Peterson, T.R., et al., *mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway*. Cell, 2011. 146(3): p. 408-20.
233. Jiang, G. and B.B. Zhang, *Glucagon and regulation of glucose metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. 284(4): p. E671-8.
234. Wang, Y., et al., *Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor regulates hepatic gluconeogenesis in fasting and diabetes*. Nature, 2012. 485(7396): p. 128-32.
235. 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.
236. Yoon, J.C., et al., *Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1*. Nature, 2001. 413(6852): p. 131-8.
237. Michalopoulos, G.K., *Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control*. FASEB J, 1990. 4(2): p. 176-87.
238. Tiniakos, D.G., A. Kandilis, and S.A. Geller, *Tityus: a forgotten myth of liver regeneration*. J Hepatol, 2010. 53(2): p. 357-61.
239. Mehendale, H.M., *Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury*. Toxicol Pathol, 2005. 33(1): p. 41-51.
240. Michalopoulos, G.K., *Liver regeneration: alternative epithelial pathways*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. 43(2): p. 173-9.
241. Michalopoulos, G.K., *Liver regeneration*. J Cell Physiol, 2007. 213(2): p. 286-300.
242. Rychtrmoc, D., et al., *Studying liver regeneration by means of molecular biology: how far we are in interpreting the findings?* Acta Medica (Hradec Kralove), 2009. 52(3): p. 91-9.
243. Fausto, N., J.S. Campbell, and K.J. Riehle, *Liver regeneration*. Hepatology, 2006. 43(2 Suppl 1): p. S45-53.
244. Dabeva, M.D. and D.A. Shafritz, *Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration*. Am J Pathol, 1993. 143(6): p. 1606-20.
245. Fausto, N., *Lessons from genetically engineered animal models. V. Knocking out genes to study liver regeneration: present and future*. Am J Physiol, 1999. 277(5 Pt 1): p. G917-21.
246. Fausto, N., *Liver regeneration*. J Hepatol, 2000. 32(1 Suppl): p. 19-31.
247. Braun, K.M. and E.P. Sandgren, *Cellular origin of regenerating parenchyma in a mouse model of severe hepatic injury*. Am J Pathol, 2000. 157(2): p. 561-9.
248. Taub, R., *Liver regeneration: from myth to mechanism*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5(10): p. 836-47.
249. Michalopoulos, G.K., *Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas*. Am J Pathol, 2010. 176(1): p. 2-13.

250. Higgins, G.M. and R.M. Anderson, *Experimental Pathology of the Liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.* Arch Pathol, 1931. 12: p. 186–202.
251. Gaub, J. and J. Iversen, *Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy.* Hepatology, 1984. 4(5): p. 902-4.
252. Emond, J., et al., *Extent of hepatectomy in the rat. Evaluation of basal conditions and effect of therapy.* Eur Surg Res, 1989. 21(5): p. 251-9.
253. Inderbitzin, D., et al., *Magnetic resonance imaging provides accurate and precise volume determination of the regenerating mouse liver.* J Gastrointest Surg, 2004. 8(7): p. 806-11.
254. Inderbitzin, D., et al., *Regenerative capacity of individual liver lobes in the microsurgical mouse model.* Microsurgery, 2006. 26(6): p. 465-9.
255. Michalopoulos, G.K. and M.C. DeFrances, *Liver regeneration.* Science, 1997. 276(5309): p. 60-6.
256. Marcos, A., et al., *Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult to adult living donor liver transplantation.* Transplantation, 2000. 69(7): p. 1375-9.
257. Yang, L., et al., *NF-kappaB activation in Kupffer cells after partial hepatectomy.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. 289(3): p. G530-8.
258. Fujita, J., et al., *Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice.* Surgery, 2001. 129(1): p. 48-54.
259. Blindenbacher, A., et al., *Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice.* Hepatology, 2003. 38(3): p. 674-82.
260. Yamada, Y., et al., *Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(4): p. 1441-6.
261. Northemann, W., et al., *Production of interleukin 6 by hepatoma cells.* Mol Biol Med, 1990. 7(3): p. 273-85.
262. Moshage, H., *Cytokines and the hepatic acute phase response.* J Pathol, 1997. 181(3): p. 257-66.
263. Cressman, D.E., et al., *Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice.* Science, 1996. 274(5291): p. 1379-83.
264. Li, W., et al., *STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration.* J Biol Chem, 2002. 277(32): p. 28411-7.
265. Talarmin, H., et al., *The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes.* Mol Cell Biol, 1999. 19(9): p. 6003-11.
266. Huh, C.G., et al., *Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(13): p. 4477-82.
267. Bell, A., et al., *The five amino acid-deleted isoform of hepatocyte growth factor promotes carcinogenesis in transgenic mice.* Oncogene, 1999. 18(4): p. 887-95.
268. Benvenuti, S. and P.M. Comoglio, *The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis.* J Cell Physiol, 2007. 213(2): p. 316-25.
269. Borowiak, M., et al., *Met provides essential signals for liver regeneration.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(29): p. 10608-13.

270. Mitchell, C., et al., *Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration*. J Biol Chem, 2005. 280(4): p. 2562-8.
271. Kiso, S., et al., *Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy*. Gastroenterology, 2003. 124(3): p. 701-7.
272. Russell, W.E., et al., *Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice*. Mol Carcinog, 1996. 15(3): p. 183-9.
273. Natarajan, A., B. Wagner, and M. Sibilica, *The EGF receptor is required for efficient liver regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(43): p. 17081-6.
274. Stolz, D.B., et al., *Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat*. Cancer Res, 1999. 59(16): p. 3954-60.
275. Scheving, L.A., et al., *Integral role of the EGF receptor in HGF-mediated hepatocyte proliferation*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 290(1): p. 197-203.
276. Francavilla, A., et al., *Epidermal growth factor and proliferation in rat hepatocytes in primary culture isolated at different times after partial hepatectomy*. Cancer Res, 1986. 46(3): p. 1318-23.
277. Steiling, H., et al., *Fibroblast growth factor receptor signalling is crucial for liver homeostasis and regeneration*. Oncogene, 2003. 22(28): p. 4380-8.
278. Taniguchi, E., et al., *Expression and role of vascular endothelial growth factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats*. J Histochem Cytochem, 2001. 49(1): p. 121-30.
279. Cruise, J.L., et al., *Alpha 1-adrenergic effects and liver regeneration*. Hepatology, 1987. 7(6): p. 1189-94.
280. Cruise, J.L., K.A. Houck, and G.K. Michalopoulos, *Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha 1 adrenoreceptor by norepinephrine*. Science, 1985. 227(4688): p. 749-51.
281. Skov Olsen, P., et al., *Adrenergic effects on renal secretion of epidermal growth factor in the rat*. Regul Pept, 1985. 11(1): p. 17-25.
282. Leffert, H.L., et al., *Hormonal control of rat liver regeneration*. Gastroenterology, 1979. 76(6): p. 1470-82.
283. Taub, R., L.E. Greenbaum, and Y. Peng, *Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and -independent pathways in liver regeneration*. Semin Liver Dis, 1999. 19(2): p. 117-27.
284. Huang, J. and D.A. Rudnick, *Elucidating the metabolic regulation of liver regeneration*. Am J Pathol, 2014. 184(2): p. 309-21.
285. Weglarz, T.C. and E.P. Sandgren, *Timing of hepatocyte entry into DNA synthesis after partial hepatectomy is cell autonomous*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(23): p. 12595-600.
286. Sigal, S.H., et al., *Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events*. Am J Physiol, 1999. 276(5 Pt 1): p. G1260-72.
287. Barbason, H., et al., *Importance of cell kinetics rhythmicity for the control of cell proliferation and carcinogenesis in rat liver (review)*. In Vivo, 1995. 9(6): p. 539-48.

288. Matsuo, T., et al., *Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo*. Science, 2003. 302(5643): p. 255-9.
289. Apte, U., et al., *Enhanced liver regeneration following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase*. Hepatology, 2009. 50(3): p. 844-51.
290. Sakamoto, T., et al., *Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy*. Hepatology, 1999. 29(2): p. 403-11.
291. Campbell, J.S., et al., *Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration*. J Clin Invest, 2001. 107(10): p. 1285-92.
292. Carr, B.I., et al., *Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type beta transforming growth factor*. Cancer Res, 1986. 46(5): p. 2330-4.
293. Houck, K.A. and G.K. Michalopoulos, *Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta*. J Cell Physiol, 1989. 141(3): p. 503-9.
294. Braun, L., et al., *Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(5): p. 1539-43.
295. Macias-Silva, M., et al., *Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration*. J Biol Chem, 2002. 277(32): p. 28483-90.
296. Date, M., et al., *Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury*. J Hepatol, 2000. 32(2): p. 251-60.
297. Haber, B.A., et al., *Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration*. J Clin Invest, 1993. 91(4): p. 1319-26.
298. Su, A.I., et al., *Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(17): p. 11181-6.
299. Kelley-Loughnane, N., et al., *Independent and overlapping transcriptional activation during liver development and regeneration in mice*. Hepatology, 2002. 35(3): p. 525-34.
300. Weymann, A., et al., *p21 is required for dextrose-mediated inhibition of mouse liver regeneration*. Hepatology, 2009. 50(1): p. 207-15.
301. Gazit, V., et al., *Liver regeneration is impaired in lipodystrophic fatty liver dystrophy mice*. Hepatology, 2010. 52(6): p. 2109-17.
302. Klingensmith, J.S. and H.M. Mehendale, *Chlordecone-induced fat depletion in the male rat*. J Toxicol Environ Health, 1982. 10(1): p. 121-9.
303. Brasaemle, D.L., *Cell biology. A metabolic push to proliferate*. Science, 2006. 313(5793): p. 1581-2.
304. Shteyer, E., et al., *Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice*. Hepatology, 2004. 40(6): p. 1322-32.
305. Schofield, P.S., et al., *Altered interactions between lipogenesis and fatty acid oxidation in regenerating rat liver*. Biochem J, 1987. 241(2): p. 469-74.
306. Gove, C.D. and D.A. Hems, *Fatty acid synthesis in the regenerating liver of the rat*. Biochem J, 1978. 170(1): p. 1-8.
307. Rudnick, D.A. and N.O. Davidson, *Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration*. Int J Hepatol, 2012. 2012: p. 549241.

308. Farrell, G.C., *Probing Prometheus: fat fueling the fire?* Hepatology, 2004. 40(6): p. 1252-5.
309. Rudnick, D.A., *Trimming the fat from liver regeneration.* Hepatology, 2005. 42(5): p. 1001-3.
310. Chakravarthy, M.V., et al., *"New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis.* Cell Metab, 2005. 1(5): p. 309-22.
311. Fernandez, M.A., et al., *Caveolin-1 is essential for liver regeneration.* Science, 2006. 313(5793): p. 1628-32.
312. Holecek, M., *Nutritional modulation of liver regeneration by carbohydrates, lipids, and amino acids: a review.* Nutrition, 1999. 15(10): p. 784-8.
313. Yang, S.Q., et al., *Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology.* Hepatology, 2001. 34(4 Pt 1): p. 694-706.
314. Yamauchi, H., et al., *Impaired liver regeneration after partial hepatectomy in db/db mice.* Exp Toxicol Pathol, 2003. 54(4): p. 281-6.
315. Zhang, B.H., M. Weltman, and G.C. Farrell, *Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats.* J Gastroenterol Hepatol, 1999. 14(2): p. 133-7.
316. Sydor, S., et al., *Steatosis does not impair liver regeneration after partial hepatectomy.* Lab Invest, 2013. 93(1): p. 20-30.
317. Murray, A.B., W. Strecker, and S. Silz, *Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy, and comparison with biochemical results.* J Cell Sci, 1981. 50: p. 433-48.
318. Bucher, N.L., *Insulin, glucagon, and the liver.* Adv Enzyme Regul, 1976. 15: p. 221-30.
319. Wang, H., et al., *CCAAT/enhancer binding protein-beta is a transcriptional regulator of peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha in the regenerating liver.* Mol Endocrinol, 2008. 22(7): p. 1596-605.
320. Haber, B.A., et al., *High levels of glucose-6-phosphatase gene and protein expression reflect an adaptive response in proliferating liver and diabetes.* J Clin Invest, 1995. 95(2): p. 832-41.
321. Rosa, J.L., R. Bartrons, and A. Tauler, *Gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in regenerating rat liver.* Biochem J, 1992. 287 (Pt 1): p. 113-6.
322. Costa, R.H., et al., *Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration.* Hepatology, 2003. 38(6): p. 1331-47.
323. Leu, J.I., et al., *Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury.* Mol Cell Biol, 2001. 21(2): p. 414-24.
324. Diehl, A.M. and S.Q. Yang, *Regenerative changes in C/EBP alpha and C/EBP beta expression modulate binding to the C/EBP site in the c-fos promoter.* Hepatology, 1994. 19(2): p. 447-56.
325. Mischoulon, D., et al., *Growth-dependent inhibition of CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP alpha) gene expression during hepatocyte proliferation in the regenerating liver and in culture.* Mol Cell Biol, 1992. 12(6): p. 2553-60.
326. Greenbaum, L.E., et al., *Coexistence of C/EBP alpha, beta, growth-induced proteins and DNA synthesis in hepatocytes during liver regeneration.*

- Implications for maintenance of the differentiated state during liver growth.* J Clin Invest, 1995. 96(3): p. 1351-65.
327. Leduc, E.H., *Mitotic activity in the liver of the mouse during inanition followed by refeeding with different levels of protein.* Am J Anat, 1949. 84(3): p. 397-429.
328. Chiba, T., et al., *Effect of an exogenous energy source and amino acids on DNA synthesis in regenerating rat liver.* Biochim Biophys Acta, 1983. 755(3): p. 420-7.
329. Holecek, M., *Three targets of branched-chain amino acid supplementation in the treatment of liver disease.* Nutrition, 2010. 26(5): p. 482-90.
330. Fowler, F.C., R.K. Banks, and M.E. Mailliard, *Characterization of sodium-dependent amino acid transport activity during liver regeneration.* Hepatology, 1992. 16(5): p. 1187-94.
331. Freeman, T.L., et al., *ATA2-mediated amino acid uptake following partial hepatectomy is regulated by redistribution to the plasma membrane.* Arch Biochem Biophys, 2002. 400(2): p. 215-22.
332. Handlogten, M.E. and M.S. Kilberg, *Induction and decay of amino acid transport in the liver. Turnover of transport activity in isolated hepatocytes after stimulation by diabetes or glucagon.* J Biol Chem, 1984. 259(6): p. 3519-25.
333. Haussinger, D., F. Lang, and W. Gerok, *Regulation of cell function by the cellular hydration state.* Am J Physiol, 1994. 267(3 Pt 1): p. E343-55.
334. Bussolati, O., et al., *The stimulation of Na,K,Cl cotransport and of system A for neutral amino acid transport is a mechanism for cell volume increase during the cell cycle.* FASEB J, 1996. 10(8): p. 920-6.
335. Hatanaka, T., Y. Hatanaka, and M. Setou, *Regulation of amino acid transporter ATA2 by ubiquitin ligase Nedd4-2.* J Biol Chem, 2006. 281(47): p. 35922-30.
336. Hatanaka, T., et al., *Amino acid transporter ATA2 is stored at the trans-Golgi network and released by insulin stimulus in adipocytes.* J Biol Chem, 2006. 281(51): p. 39273-84.
337. Fukagawa, N.K., et al., *Insulin-mediated reduction of whole body protein breakdown. Dose-response effects on leucine metabolism in postabsorptive men.* J Clin Invest, 1985. 76(6): p. 2306-11.
338. Hyde, R., K. Peyrollier, and H.S. Hundal, *Insulin promotes the cell surface recruitment of the SAT2/ATA2 system A amino acid transporter from an endosomal compartment in skeletal muscle cells.* J Biol Chem, 2002. 277(16): p. 13628-34.
339. Ritchie, J.W., et al., *Mechanisms of glutamine transport in rat adipocytes and acute regulation by cell swelling.* Cell Physiol Biochem, 2001. 11(5): p. 259-70.
340. Barber, E.F., et al., *Neutral amino acid transport in hepatocytes isolated from streptozotocin-induced diabetic rats.* J Biol Chem, 1982. 257(24): p. 14960-7.
341. Kilberg, M.S. and O.W. Neuhaus, *Hormonal regulation of hepatic amino acid transport.* J Supramol Struct, 1977. 6(2): p. 191-204.
342. Varoqui, H. and J.D. Erickson, *Selective up-regulation of system a transporter mRNA in diabetic liver.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. 290(3): p. 903-8.

343. Jungas, R.L., M.L. Halperin, and J.T. Brosnan, *Quantitative analysis of amino acid oxidation and related gluconeogenesis in humans*. *Physiol Rev*, 1992. 72(2): p. 419-48.
344. Sips, H.J., J.M. Van Amelsvoort, and K. Van Dam, *Amino acid transport in plasma-membrane vesicles from rat liver. Characterization of L-alanine transport*. *Eur J Biochem*, 1980. 105(2): p. 217-24.
345. Kurtz, D., J. Prescott, and G. Travlos, *Loeb and Quimby's Clinical Chemistry of Laboratory Animals, Third Edition*. Third Edition ed2013: CRC Press LLC. 1024.
346. Hoekstra, L.T., et al., *Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review*. *Ann Surg*, 2013. 257(1): p. 27-36.
347. Rabes, H.M., *Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver*. *Ciba Found Symp*, 1977(55): p. 31-53.
348. Gebhardt, R., et al., *Hepatocellular expression of glutamine synthetase: an indicator of morphogen actions as master regulators of zonation in adult liver*. *Prog Histochem Cytochem*, 2007. 41(4): p. 201-66.
349. Bravo, R. and H. Macdonald-Bravo, *Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites*. *J Cell Biol*, 1987. 105(4): p. 1549-54.
350. Greenspan, P., E.P. Mayer, and S.D. Fowler, *Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets*. *J Cell Biol*, 1985. 100(3): p. 965-73.
351. Ding, Y., et al., *Proteomic profiling of lipid droplet-associated proteins in primary adipocytes of normal and obese mouse*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2012. 44(5): p. 394-406.
352. Brinkmann, A., et al., *Increase of the gluconeogenic and decrease of the glycolytic capacity of rat liver with a change of the metabolic zonation after partial hepatectomy*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1978. 359(11): p. 1561-71.
353. Jia, C., *Advances in the regulation of liver regeneration*. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011. 5(1): p. 105-21.
354. Bucher, N.L. and G.C. Weir, *Insulin, glucagon, liver regeneration, and DNA synthesis*. *Metabolism*, 1976. 25(11 Suppl 1): p. 1423-5.
355. Bucher, M.L. and M.N. Swaffield, *Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. 72(3): p. 1157-60.
356. Amador-Alvarado, L., T. Montiel, and L. Massieu, *Differential production of reactive oxygen species in distinct brain regions of hypoglycemic mice*. *Metab Brain Dis*, 2014. 29(3): p. 711-9.
357. Suh, S.W., et al., *Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase*. *J Clin Invest*, 2007. 117(4): p. 910-8.
358. Simek, J., et al., *Influence of protracted infusion of glucose and insulin on the composition and regeneration activity of liver after partial hepatectomy in rats*. *Nature*, 1967. 213(5079): p. 910-1.
359. Bowe, J.E., et al., *Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models*. *J Endocrinol*, 2014. 222(3): p. G13-25.

360. Pacini, G., B. Omar, and B. Ahren, *Methods and models for metabolic assessment in mice*. J Diabetes Res, 2013. 2013: p. 986906.
361. Andrikopoulos, S., et al., *Evaluating the glucose tolerance test in mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. 295(6): p. E1323-32.
362. Ayala, J.E., et al., *Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice*. Dis Model Mech, 2010. 3(9-10): p. 525-34.
363. Bell, G.I., et al., *Molecular biology of mammalian glucose transporters*. Diabetes Care, 1990. 13(3): p. 198-208.
364. Im, S.S., et al., *Transcriptional regulation of glucose sensors in pancreatic beta cells and liver*. Curr Diabetes Rev, 2006. 2(1): p. 11-8.
365. Mutel, E., et al., *Control of blood glucose in the absence of hepatic glucose production during prolonged fasting in mice: induction of renal and intestinal gluconeogenesis by glucagon*. Diabetes, 2011. 60(12): p. 3121-31.
366. Wahren, J. and K. Ekberg, *Splanchnic regulation of glucose production*. Annu Rev Nutr, 2007. 27: p. 329-45.
367. Nuttall, F.Q., A. Ngo, and M.C. Gannon, *Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant?* Diabetes Metab Res Rev, 2008. 24(6): p. 438-58.
368. Stumvoll, M., et al., *Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues*. Kidney Int, 1999. 55(3): p. 778-92.
369. Mather, A. and C. Pollock, *Glucose handling by the kidney*. Kidney Int Suppl, 2011(120): p. S1-6.
370. Adeva, M., et al., *Enzymes involved in l-lactate metabolism in humans*. Mitochondrion, 2013. 13(6): p. 615-29.
371. Brand, H.S., et al., *In vivo amino acid fluxes in regenerating liver after two-thirds hepatectomy in the rat*. J Hepatol, 1995. 23(3): p. 333-40.
372. Gazzola, R.F., et al., *The adaptive regulation of amino acid transport system A is associated to changes in ATA2 expression*. FEBS Lett, 2001. 490(1-2): p. 11-4.
373. Roviezzo, F., et al., *The annexin-1 knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response*. J Physiol Pharmacol, 2002. 53(4 Pt 1): p. 541-53.
374. Brachvogel, B., et al., *Annexin A5 is not essential for skeletal development*. Mol Cell Biol, 2003. 23(8): p. 2907-13.
375. Srivastava, M., et al., *Defects in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression, Ca(2+) signaling, and insulin secretion in the anx7(+/-) knockout mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(24): p. 13783-8.
376. Ling, Q., et al., *Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo*. J Clin Invest, 2004. 113(1): p. 38-48.
377. Babiychuk, E.B., et al., *Annexin VI participates in the formation of a reversible, membrane-cytoskeleton complex in smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1999. 274(49): p. 35191-5.
378. Martin, S. and R.G. Parton, *Caveolin, cholesterol, and lipid bodies*. Semin Cell Dev Biol, 2005. 16(2): p. 163-74.
379. Prattes, S., et al., *Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes: triglyceride droplets are surrounded by*

- cholesterol-rich ER-like surface layer structures. *J Cell Sci*, 2000. 113 (Pt 17): p. 2977-89.
380. Londos, C., et al., *Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells*. *Biochem Soc Trans*, 1995. 23(3): p. 611-5.
381. Aqul, A., et al., *Hepatic entrapment of esterified cholesterol drives continual expansion of whole body sterol pool in lysosomal acid lipase-deficient mice*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014. 307(8): p. G836-47.
382. Bie, J., et al., *Liver-specific transgenic expression of cholesteryl ester hydrolase reduces atherosclerosis in Ldlr-/- mice*. *J Lipid Res*, 2014. 55(4): p. 729-38.
383. Gubern, A., et al., *Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets*. *J Biol Chem*, 2008. 283(41): p. 27369-82.
384. Gropler, M.C., et al., *Lipin 2 is a liver-enriched phosphatidate phosphohydrolase enzyme that is dynamically regulated by fasting and obesity in mice*. *J Biol Chem*, 2009. 284(11): p. 6763-72.
385. Ikonen, E., *Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(2): p. 125-38.
386. Bohm, F., et al., *Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines*. *EMBO Mol Med*, 2010. 2(8): p. 294-305.
387. White, P., et al., *Identification of transcriptional networks during liver regeneration*. *J Biol Chem*, 2005. 280(5): p. 3715-22.
388. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. *Genes Dev*, 2004. 18(18): p. 2195-224.
389. Zou, Y., et al., *Nrf2 is essential for timely M phase entry of replicating hepatocytes during liver regeneration*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015. 308(4): p. G262-8.
390. Kurzchalia, T.V. and R.G. Parton, *Membrane microdomains and caveolae*. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. 11(4): p. 424-31.
391. Pol, A., et al., *Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant*. *Mol Biol Cell*, 2004. 15(1): p. 99-110.
392. Cryer, P.E., *Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death*. *J Clin Invest*, 2007. 117(4): p. 868-70.
393. Ida, T., K. Ozawa, and I. Honjo, *Glucose intolerance after massive liver resection in man and other mammals*. *Am J Surg*, 1975. 129(5): p. 523-7.
394. Irie, R., et al., *Impaired glucose tolerance related to changes in the energy metabolism of the remnant liver after major hepatic resection*. *J Lab Clin Med*, 1983. 101(5): p. 692-8.
395. Talarico, K.S., D.D. Feller, and E.D. Neville, *Mitotic response to various dietary conditions in the normal and regenerating rat liver*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1971. 136(2): p. 381-4.
396. Lai, H.S., W.J. Chen, and K.M. Chen, *Liver regeneration after partial hepatectomy: effects of glucose and branched-chain amino acid*. *J Formos Med Assoc*, 1990. 89(12): p. 1045-51.
397. Campbell, J.E. and D.J. Drucker, *Islet alpha cells and glucagon-critical regulators of energy homeostasis*. *Nat Rev Endocrinol*, 2015.
398. Leffert, H.L., *Growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. VII. Hormonal control of DNA synthesis and its possible*

- significance to the problem of liver regeneration. *J Cell Biol*, 1974. 62(3): p. 792-801.
399. Huard, J., et al., *An integrative model links multiple inputs and signaling pathways to the onset of DNA synthesis in hepatocytes*. *FEBS J*, 2012. 279(18): p. 3290-313.
400. Viscarra, J.A. and R.M. Ortiz, *Cellular mechanisms regulating fuel metabolism in mammals: role of adipose tissue and lipids during prolonged food deprivation*. *Metabolism*, 2013. 62(7): p. 889-97.
401. Ozen, H., *Glycogen storage diseases: new perspectives*. *World J Gastroenterol*, 2007. 13(18): p. 2541-53.
402. Newsholme, P., et al., *Glutamine and glutamate as vital metabolites*. *Braz J Med Biol Res*, 2003. 36(2): p. 153-63.
403. DeFronzo, R.A., J.A. Davidson, and S. Del Prato, *The role of the kidneys in glucose homeostasis: a new path towards normalizing glycaemia*. *Diabetes Obes Metab*, 2012. 14(1): p. 5-14.
404. Goodman, A.D., R.E. Fuisz, and G.F. Cahill, Jr., *Renal gluconeogenesis in acidosis, alkalosis, and potassium deficiency: its possible role in regulation of renal ammonia production*. *J Clin Invest*, 1966. 45(4): p. 612-9.
405. Brooks, G.A., et al., *Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(3): p. 1129-34.
406. Le Cam, A. and P. Freychet, *Glucagon stimulates the A system for neutral amino acid transport in isolated hepatocytes of adult rat*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976. 72(3): p. 893-901.
407. Freychet, P. and A. Le Cam, *Amino acid transport in isolated hepatocytes: effect of glucagon*. *Ciba Found Symp*, 1977(55): p. 247-62.
408. Fehlmann, M., A. Le Cam, and P. Freychet, *Insulin and glucagon stimulation of amino acid transport in isolated rat hepatocytes. Synthesis of a high affinity component of transport*. *J Biol Chem*, 1979. 254(20): p. 10431-7.
409. Fafournoux, P., C. Remesy, and C. Demigne, *Stimulation of amino acid transport into liver cells from rats adapted to a high-protein diet*. *Biochem J*, 1982. 206(1): p. 13-8.
410. Kondou, H., et al., *Sodium-coupled neutral amino acid transporter 4 functions as a regulator of protein synthesis during liver development*. *Hepatol Res*, 2013. 43(11): p. 1211-23.
411. Martinez-Mas, J.V., et al., *Up-regulation of system A activity in the regenerating rat liver*. *FEBS Lett*, 1993. 329(1-2): p. 189-93.
412. Dransfeld, O., et al., *Oligonucleotide microarray analysis of differential transporter regulation in the regenerating rat liver*. *Liver Int*, 2005. 25(6): p. 1243-58.
413. Ortiz, V., et al., *Promoter characterization and role of CRE in the basal transcription of the rat SNAT2 gene*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011. 300(6): p. E1092-102.
414. Jones, H.N., T. Jansson, and T.L. Powell, *IL-6 stimulates system A amino acid transporter activity in trophoblast cells through STAT3 and increased expression of SNAT2*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. 297(5): p. C1228-35.

415. Pacitti, A.J., Y. Inoue, and W.W. Souba, *Tumor necrosis factor stimulates amino acid transport in plasma membrane vesicles from rat liver*. J Clin Invest, 1993. 91(2): p. 474-83.
416. Franchi-Gazzola, R., et al., *The synthesis of SNAT2 transporters is required for the hypertonic stimulation of system A transport activity*. Biochim Biophys Acta, 2004. 1667(2): p. 157-66.
417. Hyde, R., et al., *Subcellular localization and adaptive up-regulation of the System A (SAT2) amino acid transporter in skeletal-muscle cells and adipocytes*. Biochem J, 2001. 355(Pt 3): p. 563-8.
418. Ling, R., et al., *Involvement of transporter recruitment as well as gene expression in the substrate-induced adaptive regulation of amino acid transport system A*. Biochim Biophys Acta, 2001. 1512(1): p. 15-21.
419. Rosario, F.J., et al., *Mammalian target of rapamycin signalling modulates amino acid uptake by regulating transporter cell surface abundance in primary human trophoblast cells*. J Physiol, 2013. 591(Pt 3): p. 609-25.
420. Hulce, J.J., et al., *Proteome-wide mapping of cholesterol-interacting proteins in mammalian cells*. Nat Methods, 2013. 10(3): p. 259-64.
421. Vallon, V., et al., *SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule*. J Am Soc Nephrol, 2011. 22(1): p. 104-12.
422. Boyce, S. and D. Harrison, *A detailed methodology of partial hepatectomy in the mouse*. Lab Anim (NY), 2008. 37(11): p. 529-32.
423. 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.
424. Zor, T. and Z. Selinger, *Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies*. Anal Biochem, 1996. 236(2): p. 302-8.
425. Russell, W.E. and N.L. Bucher, *Vasopressin modulates liver regeneration in the Brattleboro rat*. Am J Physiol, 1983. 245(2): p. G321-4.
426. Spurr, A.R., *A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy*. J Ultrastruct Res, 1969. 26(1): p. 31-43.
427. Wisher, M.H. and W.H. Evans, *Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane. Isolation and characterization of plasma-membrane subfractions from the blood-sinusoidal, bile-Canalicular and contiguous surfaces of the hepatocyte*. Biochem J, 1975. 146(2): p. 375-88.
428. Moore, S., D.H. Spackman, and W.H. Stein, *Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids*. Fed Proc, 1958. 17(4): p. 1107-15.

ANEXO

EVIDENCIA DE REMODELACIÓN DE LOS DOMINIOS LIPÍDICOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEPENDIENTE DE ANNEXINA A6.

El modelo de mosaico fluido, descrito en 1972 por Singer y Nicolson, representaba a la membrana como una estructura fluida, dinámica, homogénea y bidimensional en la que los lípidos y proteínas podían difundir lateralmente. 25 años de estudios y refinamientos de dicho modelo han desembocado en la hipótesis de las balsas lipídicas (*lipid raft*), propuesta por Simons y Ikonen en 1997. Los lípidos de la membrana no solo tienen un papel estructural, sino también están implicados en la agrupación y la difusión de proteínas en las membranas, siendo clave para la regulación de la señalización celular y endocitosis. La existencia de dominios enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, denominados balsas lipídicas o dominios de fases líquido-ordenado (Lo), rodeados de dominios líquido-desordenados (Ld) ha sido ampliamente analizado y debatido. Más recientemente el equipo dirigido por Kusumi, ha propuesto la red de actina cortical, juntamente con las balsas lipídicas, como la base reguladora de la difusión lateral de la membrana plasmática.

En estudios previos ya se había identificado la afinidad de AnxA6 por las membranas enriquecidas en colesterol (*raft*) y su translocación a membranas resistentes a detergentes (DRM, *Detergent-resistant membranes*) de forma dependiente de Ca^{2+} . Por otro lado, debido a la afinidad de AnxA6 por fosfolípidos negativos también se encuentra en dominios *non-raft* como los hoyos y las vesículas recubiertas de clatrina. En este sentido, AnxA6 también se ha visto implicada en la regulación de la distribución intracelular de colesterol. Además, AnxA6 actúa como proteína de andamiaje para proteínas de señalización e interacciona con proteínas del citoesqueleto como espectrina y actina. Con estos antecedentes, se procedió al estudio del papel de AnxA6 en el orden de membrana mediante el uso de sondas lipídicas fluorescentes como el Laurdan y el di-4-ANEPPDHQ, y el análisis del agrupamiento de proteínas en la membrana plasmática con la técnica de microscopía de superresolución de localización por fotoactivación (PALM, *Photoactivated localization microscopy*). Este estudio se realizó en membranas artificiales e *in vivo*, en células epiteliales de

adenocarcinoma y fibroblastos embrionarios de ratón ante la expresión o ausencia de AnxA6. Así, el papel de AnxA6 en la membrana plasmática se determinó en las líneas celulares A431-A6 y MEF-WT en comparación con A431-WT y MEF-A6ko que no expresan la proteína.

En las membranas artificiales, mediante el uso de Laurdan, se demostró que la adición de AnxA6 purificada induce un incremento global del orden de membrana. En cambio, el estudio mediante microscopía confocal y la sonda di-4-ANEPPDHQ en las células *in vivo* mostró que las células que expresan AnxA6 exhiben una reducción en el orden de membrana. Esta disminución en el orden de membrana dependiente de AnxA6 es debida a la reducción del colesterol en la membrana plasmática y la modificación del citoesqueleto de actina.

El análisis de PALM reveló que la expresión de AnxA6 induce y regula la agregación de proteínas de membrana *raft* y *non-raft*, analizada mediante la distribución de los marcadores Lck-10 y Src-15 (*raft* y *non-raft*, respectivamente). El efecto de la AnxA6 sobre esta agregación depende del tipo celular. Mientras que la expresión de AnxA6 solo incrementa la formación de agregados de Lck-10 en las células MEF, la agregación de Src-15 aumenta tanto en A431-A6 como en MEF-WT.

Estos resultados demostraron que AnxA6 induce la remodelación de la membrana plasmática de manera que, elevados niveles de la proteína provocan una disminución en el orden de membrana a través de la regulación de la homeostasis del colesterol y el citoesqueleto de actina. De esta misma manera, los diferentes niveles de expresión de AnxA6 alteran la distribución de las proteínas *raft* y *non-raft*. Este estudio muestra por primera vez evidencias *in vivo* que apoyan los modelos existentes que relacionan las annexinas como proteínas organizadoras de membrana.

RESEARCH PAPER THEMED ISSUE

Evidence for annexin A6-dependent plasma membrane remodelling of lipid domains

Anna Alvarez-Guaita^{1*}, Sandra Vilà de Muga^{1*}, Dylan M Owen^{2†}, David Williamson^{2‡}, Astrid Magenau^{2§}, Ana García-Melero¹, Meritxell Reverter¹, Monira Hoque³, Rose Cairns³, Rhea Cornely², Francesc Tebar¹, Thomas Grewal³, Katharina Gaus², Jesús Ayala-Sanmartín⁴, Carlos Enrich^{1,5} and Carles Rentero¹

¹*Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*, ²*Center for Vascular Research, The University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia*, ³*Faculty of Pharmacy, University of Sydney, Sydney, NSW, Australia*, ⁴*Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), École Normale Supérieure (ENS) and Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Paris, France*, and ⁵*Centre de Recerca Biomèdica CELLEX, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain*

Correspondence

Carles Rentero and Carlos Enrich,
Departament de Biologia
Cel·lular, Immunologia i
Neurociències, Facultat de
Medicina, Universitat de
Barcelona, 08036 Barcelona,
Spain. E-mail:
carles.rentero@ub.edu;
enrich@ub.edu

*Both authors contributed
equally.

Present addresses: [†]Department of
Physics and Randall Division of
Cell and Molecular Biophysics,
King's College London, London
WC2R 2LS, UK.

[‡]Faculty of Life Sciences,
University of Manchester,
Manchester M13 9PT, UK.

[§]Garvan Institute of Medical
Research and Kinghorn Cancer
Centre, Cancer Research
Program, St. Vincent's Clinical
School, Faculty of Medicine,
University of New South Wales,
Sydney, NSW 2010, Australia.

Received

2 April 2014

Revised

11 November 2014

Accepted

14 November 2014

BACKGROUND AND PURPOSE

Annexin A6 (AnxA6) is a calcium-dependent phospholipid-binding protein that can be recruited to the plasma membrane to function as a scaffolding protein to regulate signal complex formation, endo- and exocytic pathways as well as distribution of cellular cholesterol. Here, we have investigated how AnxA6 influences the membrane order.

EXPERIMENTAL APPROACH

We used Laurdan and di-4-ANEPPDHQ staining in (i) artificial membranes; (ii) live cells to investigate membrane packing and ordered lipid phases; and (iii) a super-resolution imaging (photoactivated localization microscopy, PALM) and Ripley's K second-order point pattern analysis approach to assess how AnxA6 regulates plasma membrane order domains and protein clustering.

KEY RESULTS

In artificial membranes, purified AnxA6 induced a global increase in membrane order. However, confocal microscopy using di-4-ANEPPDHQ in live cells showed that cells expressing AnxA6, which reduces plasma membrane cholesterol levels and modifies the actin cytoskeleton meshwork, displayed a decrease in membrane order (~15 and 30% in A431 and MEF cells respectively). PALM data from Lck10 and Src15 membrane raft/non-raft markers revealed that AnxA6 expression induced clustering of both raft and non-raft markers. Altered clustering of Lck10 and Src15 in cells expressing AnxA6 was also observed after cholesterol extraction with methyl- β -cyclodextrin or actin cytoskeleton disruption with latrunculin B.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

AnxA6-induced plasma membrane remodelling indicated that elevated AnxA6 expression decreased membrane order through the regulation of cellular cholesterol homeostasis and the actin cytoskeleton. This study provides the first evidence from live cells that support current models of annexins as membrane organizers.

Abbreviations

A6ko, annexin A6 knockout; AnxA1, annexin A1; AnxA2, annexin A2; AnxA6, annexin A6; cPLA₂, cytoplasmic phospholipase A₂; DRM, detergent-resistant membrane; EGFR, epidermal growth factor receptor; Lat34, transmembrane domain of linker for activation of T-cells; LatB, latrunculin B; Laurdan, 6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene; Lck10, 10 first amino acids of Lck; Ld, liquid-disordered domain; Lo, liquid-ordered domain; LUV, large unilamellar vesicle; mβCD, methyl-β-cyclodextrin; MEF, mouse embryonic fibroblast; PALM, photoactivated localization microscopy; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PFA, paraformaldehyde; PIP₂, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; PS, phosphatidylserine; *r*, radius; Src15, 15 first amino acids of Src; TIRF, total internal reflection fluorescence; WT, wild type

Tables of Links

TARGETS
Enzymes^a
Phospholipase A ₂
PKCα
Catalytic receptor^{a,b}
EGFR, EGF receptor

LIGANDS
AnxA1, annexin A1
Cholesterol
PE, phosphatidylethanolamine
PIP ₂ , phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PS, phosphatidyl-L-serine

These Tables list key protein targets and ligands in this article which are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (Pawson *et al.*, 2014) and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14 (^{a,b}Alexander *et al.*, 2013a,b).

Introduction

The cellular plasma membrane was initially described as a two-dimensional homogeneous fluid cell compartment in which lipids and embedded proteins are able to diffuse in the lateral dimension (Singer and Nicolson, 1972; Nicolson, 2014). The plasma membrane sets a physical barrier and selectively regulates the molecules that pass through, delimiting an intra- and an extracellular space. This selective permeability is critical for drug diffusion into the cell (Sugano *et al.*, 2010).

Following many observations showing that proteins are not homogeneously distributed in the plasma membrane, Simons and Ikonen (1997) proposed the lipid raft hypothesis. In this model, lipids not only play a structural role but mediate protein clustering and diffusion parameters within the bilayer inducing lateral heterogeneity of proteins and lipids. It postulates the existence of cholesterol- and sphingolipid-enriched, ordered-phase liquid (Lo) domains surrounded by the bulk liquid-disordered (Ld) membrane. These domains create lateral heterogeneity and functionality as highly efficient transient platforms for clustering of specific proteins in cell membranes (Parton and Richards, 2003). Many of these raft clustered proteins function in cell signalling and endocytosis, as described for immune and other cell types (Simons and Toomre, 2000; Jacobson *et al.*, 2007). Membrane cholesterol concentration has also been described as a regulator of membrane permeability of both hydrophilic

and hydrophobic solutes by changing the phospholipid packing conformation of the lipid bilayer affecting drug delivery (Zocher *et al.*, 2013).

New findings have prompted researchers to revisit and update the lipid raft hypothesis in the last few years. Kusumi and colleagues proposed that the cortical actin meshwork, together with lipid rafts and membrane proteins, regulates lateral diffusion of plasma membrane components (Ritchie *et al.*, 2003; Kusumi *et al.*, 2004). A transient tethering of the cortical actin filaments (fences) with transmembrane proteins (pickets) would divide the plasma membrane in corrals, which would orchestrate protein and lipid lateral diffusion and, among others, contribute to several cellular processes such as cell migration, mechanotransduction and immune cell activation (Head *et al.*, 2014). Other studies identified actin-associated 'protein islands' in the plasma membrane surrounded by protein-free membrane characterized by very low amounts of cholesterol. In contrast, the 'protein islands' can have high (raft) or low (non-raft) cholesterol content (Lillemeier *et al.*, 2006). Targeting fluorescent proteins to different domains of the plasma membrane, for instance, Lck10 (first 10 amino acids of Lck) and transmembrane domain of linker for activation of T-cells (Lat34) to lipid rafts, and Src15 (first 15 residues of Src) to non-lipid rafts, allowed the definition of the role of the actin cytoskeleton in inducing co-clustering of raft-associated proteins by FRET microscopy (Chichili and Rodgers, 2007). Strikingly, actin promotes protein clustering and

regulates the protein phosphorylation of raft-associated signalling proteins. More recent findings suggest that the actin meshwork can induce membrane partitioning with Lo-enriched compartments surrounded by Ld-enriched domains that correlate with the actin fibres (Honigsmann *et al.*, 2014).

Adding further complexity, plasma membrane cholesterol/membrane rafts can also regulate the cortical actin cytoskeleton structure. For instance, cholesterol depletion induced stress fibre formation through Rho activation in both mesenchymal and epithelial cell lines (Qi *et al.*, 2009). However, other studies suggested less stable actin stress fibres after cholesterol depletion through the disorganization of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) microdomains at the plasma membrane in both fibroblasts and lymphoblasts (Kwik *et al.*, 2003).

It is generally believed that annexins contribute to the architecture, functioning and structural organization of membranes through their binding to negatively charged phospholipids in a calcium-dependent manner, but also through protein-protein interactions with a variety of membrane-associated proteins. In addition, several annexins, including AnxA1, AnxA2 and AnxA6, have shown some affinity for cholesterol and cholesterol-enriched membranes (Ayala-Sanmartin, 2001; Hulse *et al.*, 2013). We and others showed that AnxA2 and AnxA6 translocate to detergent-resistant membranes (DRMs, membrane rafts) in a calcium-dependent manner (Gokhale *et al.*, 2005; Illien *et al.*, 2012), and were found enriched in caveolae (Schnitzer *et al.*, 1995; Calvo and Enrich, 2000). However, probably based on their strong affinity to negatively charged phospholipids, these annexins were also found in non-raft domains such as clathrin-coated pits, which are required for receptor-mediated endocytosis (Kamal *et al.*, 1998; Zobiack *et al.*, 2003).

In addition to its lipid-binding properties, we and others identified that AnxA6 acts as a scaffolding protein for signalling proteins such as PKC α and p120GAP (Grewal *et al.*, 2005; Rentero *et al.*, 2006; Koese *et al.*, 2013), but also interacts with cytoskeleton proteins such as actin and spectrin (Kamal *et al.*, 1998; Monastyrskaya *et al.*, 2009). This tethering ability of AnxA6 may indicate an anchoring role of AnxA6 to link lipid bilayers and cell cytoskeleton structure.

Although annexins have been proposed as membrane organizers since their discovery as calcium-dependent membrane-binding proteins more than three decades ago, experimental evidence for this hypothesis in living cells is still lacking. To address if AnxA6 alters membrane organization, we compared membrane order and protein clustering using the fluorescent dyes Laurdan and di-4-ANEPPDHQ, and super-resolution photoactivated localization microscopy (PALM), in live cells lacking or expressing AnxA6. Direct visualization of membrane lipid structure of living cells indicated that elevated AnxA6 expression significantly decreased membrane order through the regulation of cholesterol cellular homeostasis and actin cytoskeleton meshwork. These findings are in agreement with our previous data identifying reduced cholesterol levels at the plasma membrane upon AnxA6 up-regulation (Cubells *et al.*, 2007). Studies presented here provide the first evidence from live cells that a member of the annexins family, AnxA6, is capable of inducing changes in the membrane architecture.

Methods

Large unilamellar vesicle (LUV) preparation and fluorescence spectroscopy

LUVs mimicking the inner leaflet of the plasma membrane with and without cholesterol using a mix of PC, PS/PIP₂, PE and cholesterol (PC/PS or PIP₂/PE: 25/15/60 and PC/PS or PIP₂/PE/cholesterol: 17/12/52/19, weight ratio) were prepared by extrusion as previously described (Zibouche *et al.*, 2008) and Laurdan was added at a final concentration of 0.1%. Briefly, lipids were mixed together in chloroform. The solvent was removed under a stream of nitrogen and the residual solvent was removed under vacuum. Lipids were then resuspended in buffer A (40 mM HEPES pH 7, 30 mM KCl, 1 mM EGTA) at a final concentration of 1 mg·mL⁻¹ by vortexing vigorously. The liposomes were then extruded by passing the suspension 21 times through a polycarbonate membrane with 0.1 μ m pores (Avestin, Mannheim, Germany).

Fluorescence measurements were performed as described previously with a Cary fluorimeter (Varian, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) in cuvettes thermostated at 37°C (Maniti *et al.*, 2010). In five independent experiments, three spectra were recorded before and 7 min after addition of 5 μ g purified AnxA6 to 5 μ g LUVs in the presence of 500 μ M Ca²⁺. All fluorescence spectra were corrected for the baseline signal. Laurdan emission spectra were recorded from 400 to 600 nm using a 365 nm excitation wavelength, and its generalized polarization (GP) index was calculated according to the equation:

$$GP = (I_{(440)} - I_{(490)}) / (I_{(440)} + I_{(490)})$$

where intensities at 440 and 490 nm ($I_{(440)}$ and $I_{(490)}$, respectively) represent the fluorescence intensities at the maximum emission wavelength in the ordered (440 nm) and disordered (490 nm) phases (Parasassi *et al.*, 1990). The means of three replicates from each independent experiment ($n = 5$) were used for the statistical analysis.

Cell culture, transfection and treatments

A431 adenocarcinoma cells were supplied by ATCC (CRL-1555; Middlesex, UK) and mouse embryonic fibroblast (MEF) cells were isolated from wild-type (WT) and AnxA6 knockout mice (Hawkins *et al.*, 1999) and immortalized by stable transfection of the SV40 large T antigen mammalian expression vector pBsSVD2005. Both cell types were grown in DMEM, 10% fetal calf serum, L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U·mL⁻¹) and streptomycin (100 μ g·mL⁻¹), and incubated at 37°C, 5% CO₂. The generation of stable AnxA6-expressing A431 cells has been described in detail (Grewal *et al.*, 2005). For transient transfection, A431 or MEF cells were transfected using Lipofectamine LTX (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

For di-4-ANEPPDHQ or PALM imaging, cells were treated with 1 μ M (di-4-ANEPPDHQ) or 5 μ M (PALM) LatB for 10 min, or with 10 mM m β CD for 30 min. For the addition of cholesterol, cells were incubated with 50 μ g·mL⁻¹ cholesterol for 2 h.

Fluorescence microscopy

For cholesterol imaging, cells were grown on glass coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) at 37°C, stained with

200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Filipin, mounted in Mowiol (Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and imaged with a Leica DMI 6000B epifluorescence inverted microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) equipped with an HCX PLAN APO 63 \times oil immersion objective lens. For actin staining, cells were grown on glass coverslips, fixed and permeabilized with methanol for 2 min at -20°C , immunolabelled against β -actin and mounted in Mowiol (Calbiochem, Merck Millipore). Images were acquired with a Leica TCS-SL inverted spectral confocal microscope with a 63 \times oil immersion objective lens.

For di-4-ANEPPDHQ, live cells grown on glass coverslips were stained for 30 min at 37°C with 1.5 μM di-4-ANEPPDHQ in DMEM, and *in vivo* imaged as described previously (Owen *et al.*, 2012b) in a Leica TCS-SL inverted spectral confocal microscope with a 63 \times oil immersion objective lens. Di-4-ANEPPDHQ was excited at 488 nm and two simultaneous images were acquired at 540–580 and 620–700 nm channels. Di-4-ANEPPDHQ intensity images were converted into GP images (Gaus *et al.*, 2006; Owen *et al.*, 2012b), with each pixel calculated in ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) from the two di-4-ANEPPDHQ intensity images according to the equation:

$$\text{GP} = (I_{(540-580)} - I_{(620-700)}) / (I_{(540-580)} + I_{(620-700)})$$

GP distributions were obtained from the GP images histogram values and non-linearly fitted to one Gauss distributions using a custom-built macro in ImageJ (Owen *et al.*, 2012b). GP images were pseudocoloured. The induced membrane changes were estimated by the ΔGP ($\text{GP}_{\text{treated}} - \text{GP}_{\text{untreated}}$) value.

Cholesterol measurements

Total cellular cholesterol was determined using the Amplex™ Red Cholesterol Assay Kit (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Inc.) according to the manufacturer's instructions. Results were normalized to total cellular protein.

Photoactivated localization microscopy (PALM)

A431 and MEF cell lines were plated onto ozone-cleaned total internal reflection fluorescence (TIRF)-suitable 18 mm coverslips and transfected with Lck10-PS-CFP2 or Src15-PS-CFP2. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with m β CD or LatB and fixed in 4% PFA at 37°C . Seven to ten PALM images were acquired on a TIRF microscope (ELYRA PS-1; Carl Zeiss MicroImaging, GmbH, Jena, Germany) with a 100 \times NA 1.46 oil immersion objective. Eight microwatts of 405 nm laser radiation was used for photo-conversion and 18 mW of 488 nm light was used for imaging of green-converted PS-CFP2. Fifteen thousand images were acquired per sample with a cooled, electron-multiplying charge-coupled device camera (iXon DU-897D; Andor Tech., Ltd., Belfast, UK) with an exposure time of 30 ms. Images were analysed with Zeiss ZEN 2010D software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Drifting of the sample during acquisition was corrected relative to the position of surface-immobilized 100 nm colloidal gold beads (BB International, Cardiff, UK) placed on each sample.

PALM image analysis

Events from raw fluorescence intensity images were Gaussian and Laplace filtered, and were judged to be originated from

single molecules when $I - M > 6S$, where I is event intensity, M is mean image intensity and S the SD of image intensity. The centre of each point-spread function was then calculated by fitting intensity profiles to a two-dimensional Gaussian distribution. After correction for sample drift with immobile colloidal gold bead markers, the x-y particle coordinates of each molecule were stored in a table. Two-dimensional molecular coordinates were cropped into non-overlapping regions of $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ in size. Stringent parameters for single molecule detection were applied as previously described, excluding molecules with localization precisions smaller than 30 nm and re-excited fluorophores from further analysis (Williamson *et al.*, 2011; Rossy *et al.*, 2013). Because individual fluorophores can undergo several 'blinking-cycles', we accounted for multiple blinks by selection of an appropriate off-gap, as published previously (Annibale *et al.*, 2011; Rossy *et al.*, 2013). Ripley's K function analysis and quantitative cluster maps were generated as described (Owen *et al.*, 2010). The Getis and Franklin's L function for local point pattern analysis was calculated with a cluster threshold of 60 ($L(r) > 60$) with the radial scale $r = 30$ nm, corresponding to approximately 30% of each region's cluster-map maximum (Owen *et al.*, 2013). Confidence intervals were generated by simulating 100 spatially random distributions with the same average molecular density as the data regions.

Isolation of DRMs

Isolation of DRMs was performed as described previously (Reverter *et al.*, 2011). Fractions were separated by SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membrane (Merck Millipore) followed by incubation with primary antibodies and the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL detection (Amersham Biosciences, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA).

Data analysis

Data were analysed for normality using the D'Agostino-Pearson omnibus K^2 normality test (D'Agostino *et al.*, 1990) from Prism 5.02 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) to ensure Gaussian distribution and its suitability for further analysis. Statistical significance was determined by two-tailed unpaired Student's *t*-test or Bonferroni post-tested two-way ANOVA using Prism 5.02. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. Graphs are given as bar plots \pm SD or SEM as indicated in the figure legends.

Materials

DMEM was from Biological Industries (Kibbutz Beit-Haemek, Israel). Methyl- β -cyclodextrin (m β CD), egg yolk L- α -phosphatidylcholine (PC), egg yolk L- α -phosphatidylethanolamine (PE), brain L- α -glycerophosphatidyl-L-serine (PS) and cholesterol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Latrunculin B (LatB) was purchased from Calbiochem (Merck Millipore). Brain L- α -phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) was from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Laurdan, di-4-ANEPPDHQ and Filipin were from Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Annexin A6 from pig brain was a kind gift of L.A. Pradel (Paris, France). Mouse monoclonal anti- β -actin and rabbit polyclonal antibody against GFP were from Abcam (Cambridge, UK). Rabbit

polyclonal antibody against RFP was from Genscript (Piscataway, NJ, USA). HRP-conjugated secondary antibodies were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). pBsSVD2005 (Addgene plasmid 21826) was a kind gift of D. Ron (Cambridge, UK).

For the generation of eGFP, monomeric Cherry (mCherry) and photoswitchable cyan fluorescent protein 2 (PS-CFP2) fusion proteins containing either the Lck10 or the Src15, sense and antisense oligonucleotides for the respective human sequences plus a spacer of four glycines were annealed and subcloned into the BamHI and EcoRI sites of pEGFP-N1 (Tanaka Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France), pmCherry-N1 (kindly provided by R.Y. Tsien, La Jolla, CA, USA) and pPS-CFP2-N1 (Evrogen, Moscow, Russia).

Results

AnxA6 changes membrane order in LUVs

The potential involvement of several annexin family members in the compartmentalization of membrane lipids and cortical actin cytoskeleton using *in vitro* vesicle and cellular models has been described previously (Illien *et al.*, 2012; Drucker *et al.*, 2013), supporting models of annexins as membrane organizers (Gerke *et al.*, 2005). This might involve the ability of annexins to bind negatively charged phospholipids as well as cholesterol. However, there is still a lack of an integrated model to explain how annexins may regulate the formation and/or maintenance of lipid microdomains.

Taking advantage of Laurdan, an environment-sensitive membrane probe, to label LUVs, we investigated whether the addition of AnxA6 could induce modification in membrane order in the presence or absence of cholesterol. Like other annexins, AnxA6 preferentially binds PS and other negatively charged phospholipids (Gerke *et al.*, 2005). AnxA6 may also show some affinity for PIP₂ *in vitro* (Enrich *et al.*, 2011; Hoque *et al.*, 2014), which is often enriched in specialized, cholesterol-rich domains (DRMs, lipid rafts) at the plasma membrane (Hayes *et al.*, 2004; Rescher and Gerke, 2004). Therefore, membrane order of PC and PE vesicles with PS or PIP₂ ± AnxA6 together with calcium and with or without cholesterol was compared.

As shown in Figure 1, the addition of cholesterol to PC/PS/PE and PC/PIP₂/PE LUVs strongly increased membrane order; Laurdan fluorescence intensity increased at 440 nm and decreased at 490 nm (compare the spectral shape of Figure 1B vs. 1A and Figure 1D vs. 1C), and the GP value [ratiometric function to quantify membrane order (Owen *et al.*, 2012b)] dramatically increased in those LUVs. In cholesterol-free Ld membranes (Figure 1A and C), AnxA6 induced a statistically significant increase in membrane order in both PS and PIP₂ LUVs (Figure 1A and C). At the same time, a statistically significant increase of membrane order (Lo) could be observed with the addition of purified AnxA6 to cholesterol-containing membranes (Figure 1B and D). Interestingly, addition of AnxA6 increased membrane order regardless whether LUVs contained PS or PIP₂. Taken together, these data indicate that AnxA6 is able to induce membrane lipid redistribution *in vitro*.

Annexin A6 regulates membrane order in living cells

To assess the possible role of AnxA6 in plasma membrane remodelling in living cells, we next examined the membrane order of two cellular models using: (i) the AnxA6-deficient epithelial adenocarcinoma cell line A431-WT and a well-characterized AnxA6-overexpressing A431 cell line (A431-A6) (Grewal *et al.*, 2005); and (ii) wild-type mesenchymal mouse embryonic fibroblasts (MEF-WT) and AnxA6 knockout MEFs (MEF-A6ko) derived from the AnxA6 knockout mice (Hawkins *et al.*, 1999).

Membrane order was assessed by labelling the plasma membrane of these cells with the fluorescent probe di-4-ANEPPDHQ (Figure 2A) (Owen *et al.*, 2012b). Di-4-ANEPPDHQ specifically labels the cell membranes (Figure 2A) and is associated with a spectral shift when membrane order decreases. The membrane order can be quantified by the ratiometric GP function (Figure 2B and C) (Owen *et al.*, 2012b), and the induced membrane changes can be estimated by the ΔGP ($GP_{\text{treated}} - GP_{\text{untreated}}$), where a positive ΔGP indicates an increase in membrane order and a negative ΔGP indicates a decrease in membrane order.

The comparison of ΔGP demonstrated that AnxA6 expression in A431 and MEF cells (A431-A6 and MEF-WT) induced a diminution in the plasma membrane order (Figure 2D and E). In line with published data, 30 min 10 mM m β CD treatment decreased membrane order in A431 and MEFs, independently of AnxA6 expression (Figure 2D and E). However, both up-regulation and loss of AnxA6 in A431-A6 and MEF-A6ko cells were associated with a significantly increased sensitivity towards m β CD compared with their respective controls. In contrast, the addition of exogenous cholesterol increased membrane order in both A431-WT and A431-A6 cells, restoring the membrane order perturbed by up-regulated AnxA6 expression (Supporting Information Fig. S1A). We have previously shown that elevated AnxA6 levels cause intracellular cholesterol imbalance, characterized by a strong reduction of the cholesterol levels at the plasma membrane (Cubells *et al.*, 2007). Filipin staining showed prominent cholesterol staining at the plasma membrane in AnxA6-deficient A431-WT (Cubells *et al.*, 2007) and MEF-A6ko cells (Supporting Information Fig. S1B), suggesting a redistribution of cholesterol to the plasma membrane in the absence of AnxA6. In line with previous data, plasma membrane cholesterol levels in cells with low/high AnxA6 levels did not correlate with total cholesterol levels in the two cell lines studied (Supporting Information Fig. S1C).

Next, we studied the contribution of the cortical actin cytoskeleton for plasma membrane organization in the presence or absence of AnxA6. Upon cortical actin network depolymerization after 10 min of 1 μ M LatB treatment, we observed changes in membrane order of A431-A6 cells (Figure 2D). However, LatB induced a dramatic increment of membrane order in both MEF-WT and MEF-A6ko cell lines (Figure 2E). These findings correlated with AnxA6-dependent changes in actin cytoskeleton organization: (i) AnxA6 expression in A431 cells reduced cortical actin staining (arrowheads, Supporting Information Fig. S2). (ii) In contrast, AnxA6 expression in MEF cells increased stress fibres and reduced cell surface area.

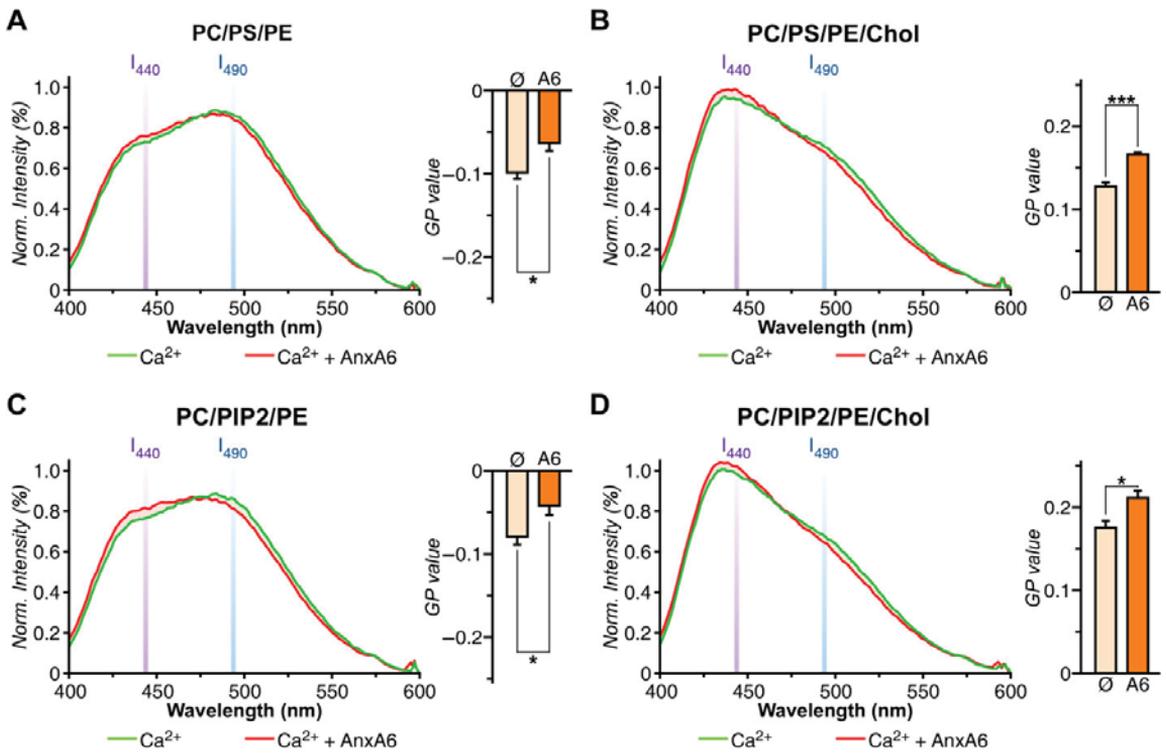


Figure 1

AnxA6 modifies membrane order in LUVs. Normalized fluorescence spectra of Laurdan stained (A) PC/PS/PE, (B) PC/PS/PE/Chol, (C) PC/PIP₂/PE and (D) PC/PIP₂/PE/Chol LUVs in the absence or presence of purified porcine AnxA6 (5 µg). Mean and SD graphical representation of its corresponding GP values. See Methods for the preparation of LUV details. The presented spectra are representative of five independent experiments (three replicates per condition for each experiment), where Lo (440 nm) and Ld (490 nm) emission wavelengths are represented. The means of three replicates from five independent experiments were used for statistical analysis. Unpaired Student's *t*-test showed statistically significant differences. **P* < 0.05, ****P* < 0.001. Chol, cholesterol.

Taken together, up-regulation of AnxA6 expression levels is associated with plasma membrane lipid redistributions, probably due to elevated AnxA6 levels causing intracellular cholesterol imbalance, in particular reducing cholesterol levels at the plasma membrane. This may contribute to create a microdomain environment that renders the plasma membrane in AnxA6-expressing cells more sensitive towards mβCD-induced lipid disorder. Furthermore, increased sensitivity towards actin-depolymerizing agents in our gain- and loss-of-function AnxA6 models may be indicative of AnxA6 providing a bridging function for the actin cytoskeleton to attach to the plasma membrane, with potentially drastic consequences for establishing membrane microdomain partitioning.

AnxA6-induced plasma membrane organization regulates clustering of raft and non-raft membrane proteins

Results presented above implied that AnxA6 contributed to membrane remodelling. To determine the effect of

AnxA6-induced membrane order changes in protein domain partitioning at the plasma membrane in more detail, we next analysed the clustering of membrane-anchored fluorescent proteins expressed in the presence (A431-A6 and MEF-WT) or absence (A431-WT and MEF-A6ko) of AnxA6 by PALM super-resolution microscopy. Lck10 and Src15 membrane-targeting motifs were fused to the photoconvertible fluorescent protein PS-CFP2. Lck10 corresponds to the first 10 N-terminal amino acids of Lck, which contain a myristoylation and two palmitoylation groups and partitions into DRMs. In contrast, Src15 corresponds to the first 15 N-terminal residues of Src, which contains a myristoylation group and several positively charged amino acids and is not enriched in DRMs but in Triton X-100 soluble fractions. In line with total cell lysate fractionation data, these motifs are targeted to raft (DRM) or to non-raft (TX-100 soluble) fractions of the plasma membrane respectively (Chichili and Rodgers, 2007) (Supporting Information Fig. S3).

The clustering level of Lck10 and Src15 membrane domain markers imaged by PALM microscopy was calculated

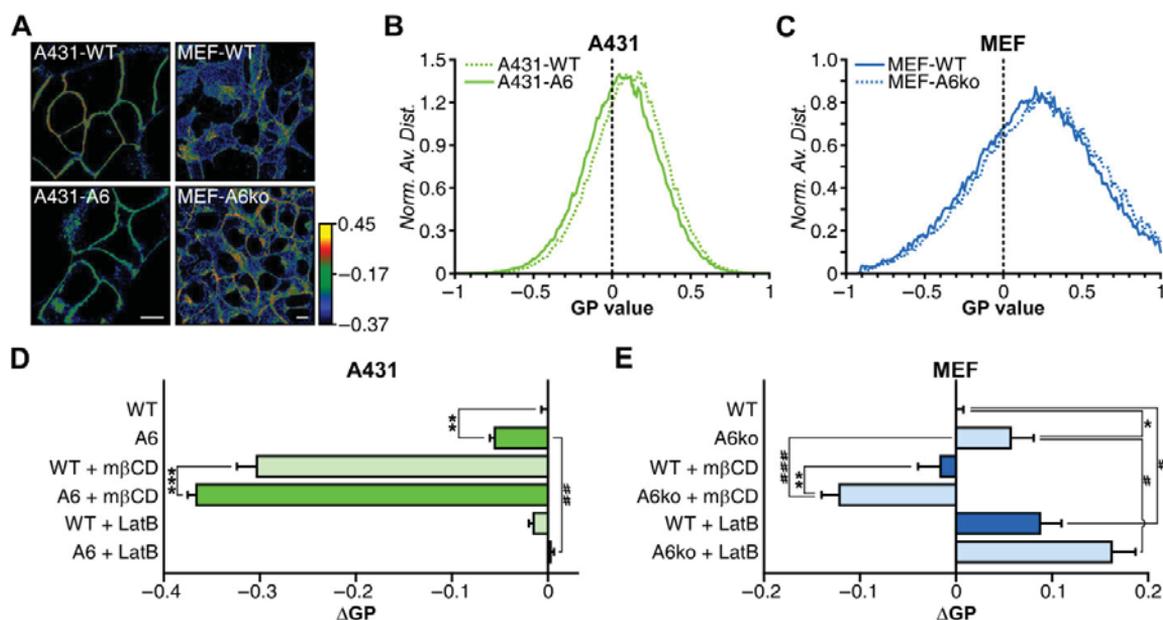


Figure 2

Membrane order of AnxA6-overexpressing A431 and AnxA6 knockout MEF cells. A431-WT, A431-A6, MEF-WT and MEF-A6ko cells were stained with $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ di-4-ANEPPDHQ for 30 min and imaged with a confocal microscope. (A) Representative GP pseudocoloured images of A431 and MEF cells. Bar, 10 μm . GP value histogram graphical representations of di-4-ANEPPDHQ stained (B) A431 and (C) MEF images from (A). (D) Mean and SD of A431-WT versus A431-A6 and (E) MEF-WT versus MEF-A6ko ΔGP representation under normal conditions, 30 min 10 mM m β CD and 10 min 5 μM LatB treatments of di-4-ANEPPDHQ stained images. The mean GP values of five images from five independent experiments were used to generate the ΔGP values for the statistical analysis. Two-way ANOVA tests were conducted on (C) and (D), and statistically significant interaction between AnxA6 levels and drug treatment ($F(2, 84) = 8.907$, $P = 0.0003$ in A431 cells; $F(2, 66) = 11.20$, $P < 0.0001$ in MEF cells) was determined. Bonferroni post-test analysis showed significant differences for drug treatment ($\#P < 0.05$, $\#\#\#P < 0.001$) and AnxA6 expression ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$).

using the Ripley's K function ($L(r)-r$), which indicates the degree of clustering (density of molecules) at a specific radius r (Owen *et al.*, 2010). Both these membrane domain markers clustered in A431 and MEF cells, with a clustering radius of $r = 60$ nm in all cases (Figures 3A,C and 4A,C). At this radius, we also analysed the percentage of molecules per cluster, the cluster density and the cluster radius (Figures 3B,D and 4B,D). A431 cells with and without AnxA6 displayed no significant changes in regard to raft marker clustering (Lck10, Figure 3A and B). However, Lck10 clustering, proportion of molecules in cluster and cluster density significantly increased in MEF-WT cells (Figure 4A and B). On the other hand, the expression of AnxA6 increased Src15 clustering, proportion of molecules in cluster and cluster density in both A431-A6 and MEF-WT cells, with slight increase in cluster radius (Figures 3C,D and 4C,D).

Hence, AnxA6 expression differentially affects the distribution of raft and non-raft markers depending on the cell type analysed. While AnxA6 increases membrane raft protein clustering only in MEF-WT, AnxA6 expression in both A431-A6 and MEF-WT increases non-lipid raft protein clustering.

AnxA6 modulates the regulatory role of cholesterol and cortical actin cytoskeleton in plasma membrane protein partitioning

Since the lipid raft model was proposed in 1997 by Ikonen and Simons (Simons and Ikonen, 1997), the cholesterol function on the protein partitioning at the plasma membrane has been studied extensively (Owen *et al.*, 2012a). As outlined above, we and others identified a role for AnxA6 in the regulation of cholesterol homeostasis (Enrich *et al.*, 2011), with elevated AnxA6 levels causing cholesterol accumulation in late endosomes, thereby reducing cholesterol at the Golgi complex and the plasma membrane (Cubells *et al.*, 2007). As shown above, AnxA6 modified membrane order of PS- and PIP₂-containing membrane bilayers in a calcium-dependent manner *in vitro* (Figure 1), but most strikingly, also in living cells (Figure 2). Furthermore, these AnxA6-induced changes in membrane order in live cells correlated with altered membrane-anchored raft and non-raft marker proteins partitioning at the plasma membrane (Figures 3 and 4).

To further assess the role of AnxA6 in cholesterol-dependent plasma membrane protein partitioning, Lck10- and Src15-PS-CFP2 transfected cells were treated with 30 min

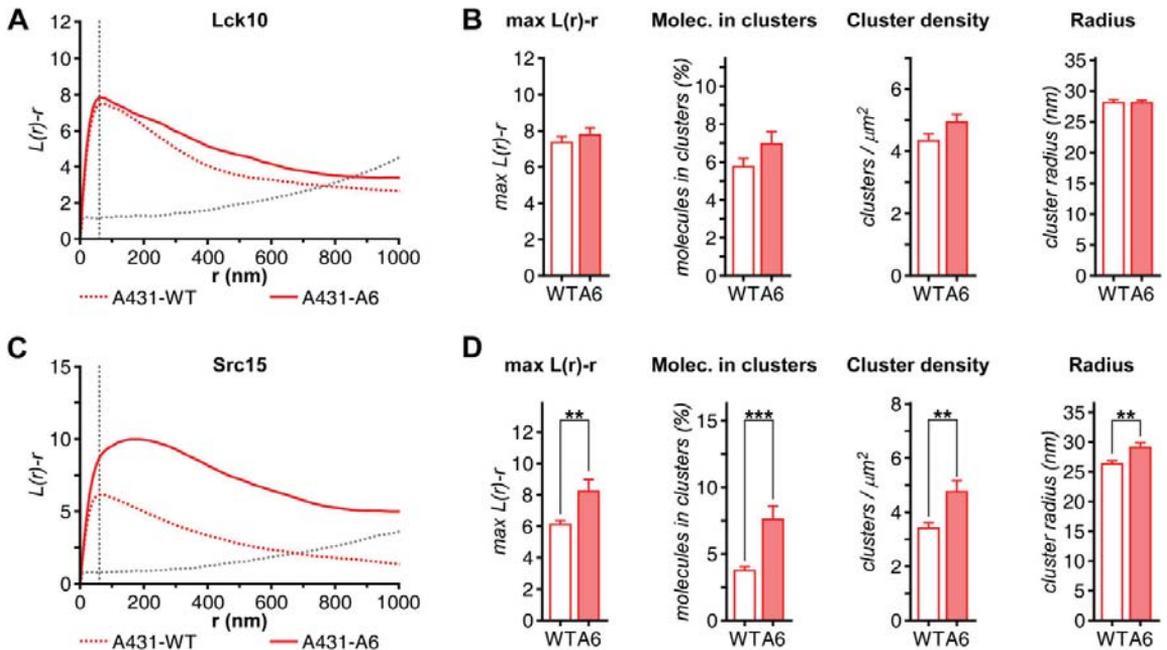


Figure 3

Cluster analysis of Lck10-PS-CFP2 and Src15-PS-CFP2 in A431-WT and A431-A6 cells. A431-WT and A431-A6 cells were transfected with (A and B) Lck10-PS-CFP2 and (C and D) Src15-PS-CFP2 and fixed 20 min with 4% PFA. PALM images were acquired and cluster analysis of 35–50 non-overlapping $3 \times 3 \mu\text{m}$ regions at the plasma membrane from 7 to 10 PALM images was performed as explained in Materials and Methods. (A) Graphical representation of mean Ripley's K functions of 35–50 non-overlapping regions of Lck10-PS-CFP2 in A431-WT and A431-A6 cells. It reports the degree of clustering relative to a random distribution (indicated by the 95% CI, grey dotted line). (B) Graphical representation of mean \pm SEM of maximum $L(r)-r$ at radius = 60 nm, molecules in cluster, cluster density and cluster radius of Lck10-PS-CFP2 in A431-WT and A431-A6 cells. (C) Mean Ripley's K functions of 35–50 non-overlapping regions of Src15-PS-CFP2 in both A431-WT and A431-A6 cells. Grey dotted line, 95% CI. (D) Graphical representation of mean \pm SEM of maximum $L(r)-r$ at radius = 60 nm, molecules in cluster, cluster density and cluster radius of Src15-PS-CFP2 in A431-WT and A431-A6 cells. Unpaired Student's *t*-test showed statistically significant differences in (D). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

10 mM m β CD, fixed and PALM images were acquired. The cluster analysis revealed that cholesterol depletion did not significantly affect Lck10 clustering in MEF-A6ko cells, but induced a broad Lck10 Ripley's K function curve, indicating higher heterogeneity of raft cluster size (Figure 5C, blue-dotted vs. red-dotted line; Supporting Information Fig. S4). In both AnxA6-expressing MEF-WT and A431-A6 cells, m β CD treatment significantly reduced Lck10 clustering and increased cluster size heterogeneity (Figure 5A and C, blue line; Supporting Information Fig. S4). On the other hand, m β CD treatment did not affect Src15 clustering of AnxA6-deficient A431-WT cells (Figure 5B, blue-dotted vs. red-dotted line; Supporting Information Fig. S4), but increased Src15 clustering, proportion of molecules in cluster, cluster density and cluster size in AnxA6-deficient MEF-A6ko cells (Figure 5D, blue-dotted line; Supporting Information Fig. S4). When we treated AnxA6-expressing A431-A6 cells with m β CD, Src15 clustering was comparable to non-treated A431-A6 cells (Figure 5B, blue vs. red line; Supporting Information Fig. S4). However, m β CD treatment of MEF-WT cells

dropped Src15 clustering to levels observed in non-treated MEF-A6ko cells (Figure 5D, compare blue vs. red-dotted lines; Supporting Information Fig. S4).

Taken together, our PALM microscopy data further emphasize differential and cell-specific differences of AnxA6 on the cholesterol-sensitive microdomain distribution of raft and non-raft markers.

The function of the cortical actin meshwork in membrane protein partitioning and clustering has been examined extensively (Owen *et al.*, 2012a; Gomez-Llobregat *et al.*, 2013). To analyse if AnxA6 may contribute to cortical actin cytoskeleton-dependent compartmentalization of membrane-anchored proteins such as Lck10 and Src15, A431 and MEF \pm AnxA6 cell lines transfected with fluorescent raft (Lck10) and non-raft (Src15) markers were treated with 5 μM LatB for 10 min, fixed and imaged by PALM microscopy. Cluster analysis of these PALM images revealed that actin cytoskeleton disruption did not significantly affect Lck10 clustering in AnxA6-deficient A431-WT cells, but increased cluster heterogeneity in MEF-A6ko fibroblasts (Figure 5A and

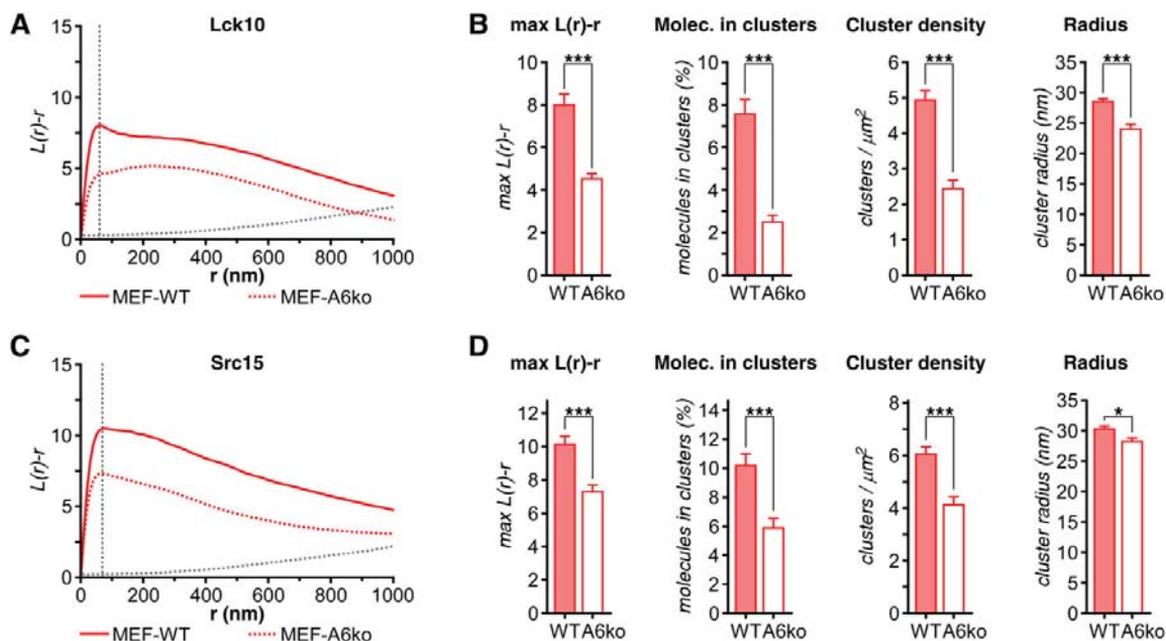


Figure 4

Cluster analysis of Lck10-PS-CFP2 and Src15-PS-CFP2 in MEF-WT and MEF-A6ko cells. MEF-WT and MEF-A6ko cells were transfected with (A and B) Lck10-PS-CFP2 and (C and D) Src15-PS-CFP2 and fixed 20 min with 4% PFA. PALM images were acquired and cluster analysis of 35–50 non-overlapping $3 \times 3 \mu\text{m}$ regions at the plasma membrane from 7 to 10 PALM images was performed as explained in Materials and Methods. (A) Graphical representation of mean Ripley's K functions of 35–50 non-overlapping regions of Lck10-PS-CFP2 in both MEF-WT and MEF-A6ko cells. Grey dotted line, 95% CI. (B) Graphical representation of mean \pm SEM of maximum $L(r)-r$ at radius = 60 nm, molecules in cluster, cluster density and cluster radius of Lck10-PS-CFP2 in MEF-WT and MEF-A6ko cells. (C) Mean Ripley's K functions of 35–50 non-overlapping regions of Src15-PS-CFP2 in both MEF-WT and MEF-A6ko cells. Grey dotted line, 95% CI. (D) Graphical representation of mean \pm SEM of maximum $L(r)-r$ at radius = 60 nm, molecules in cluster, cluster density and cluster radius of Src15-PS-CFP2 in MEF-WT and MEF-A6ko cells. Unpaired Student's *t*-test showed statistically significant differences in (B) and (D). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

C, green-dotted vs. red-dotted line; Supporting Information Fig. S4). In contrast, AnxA6 expression in A431-A6 and MEF-WT correlated with LatB treatment inducing Lck10 clustering (proportion of molecules in cluster, cluster density and cluster size) (Figure 5A and C, green line; Supporting Information Fig. S4). On the other hand, LatB treatment induced Src15 clustering in both A431-WT and MEF-A6ko cells (Figure 5B and D, green-dotted vs. red-dotted line; Supporting Information Fig. S4). The expression of AnxA6 in LatB-treated A431 cells reduced Src15 clustering to almost the clustering levels of untreated A431-WT cells (Figure 5B, green vs. red-dotted line; Supporting Information Fig. S4). In MEF-WT, the presence of AnxA6 was associated with slightly more Src15 clustering, proportion of molecules in cluster, cluster density and cluster size than in LatB-treated MEF-A6ko fibroblasts (Figure 5D, green vs. red line; Supporting Information Fig. S4).

Altogether, these results highlight that differential expression levels of AnxA6 not only alter the cholesterol-sensitive distribution of raft and non-raft proteins, but can also modulate the actin-dependent microdomain environment in a cell-specific manner.

Discussion and conclusions

Utilizing two gain- and loss-of-function cellular models for AnxA6, this study provides the first evidence from live cells that members of the annexin family have the ability to remodel plasma membrane order. Results presented here strongly suggest that AnxA6 modulates plasma membrane order through two different mechanisms: (i) directly affecting phospholipid bilayer organization and the actin cortical cytoskeleton; and (ii) indirectly through alterations in cholesterol homeostasis, thereby inducing plasma membrane cholesterol depletion and plasma membrane order diminution.

AnxA6 is well known to play a role in calcium homeostasis, membrane traffic and membrane organization. Negatively charged phospholipids [phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol, phosphatidic acid] are the preferred binding partners of annexins. It has been suggested that, despite calcium-dependent interaction with anionic phospholipids, AnxA6 displays calcium-independent cholesterol-binding properties (de Diego *et al.*, 2002). In addition, AnxA6 also shows affinity for PE and arachidonic acid (Edwards and Crumpton, 1991),

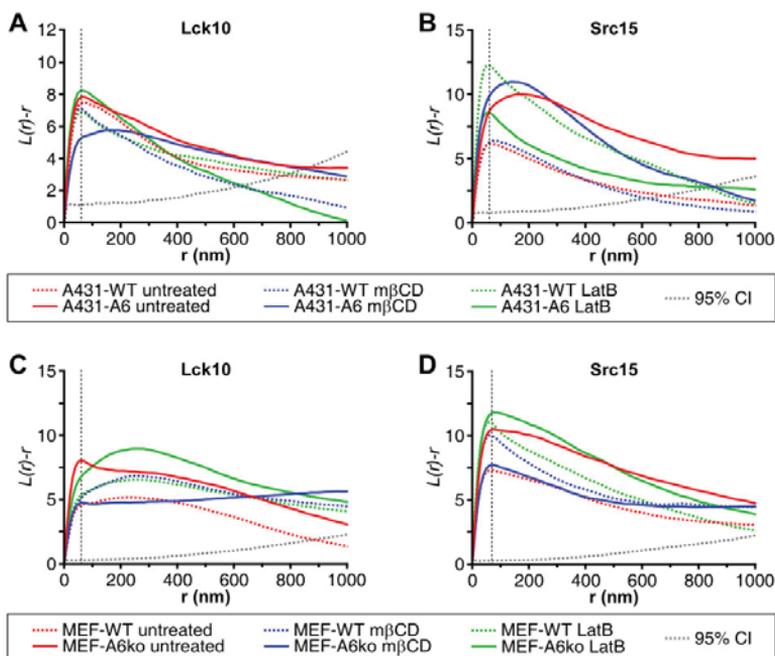


Figure 5

Ripley's K function of Lck10-PS-CFP2 and Src15-PS-CFP2 in mβCD and LatB-treated A431 and MEF cells. Mean Ripley's K function graphical representations of 35–50 non-overlapping $3 \times 3 \mu\text{m}$ regions at the plasma membrane from 7 to 10 PALM images of (A and B) A431-WT and A431-A6 and (C and D) MEF-WT and MEF-A6ko of (A and C) Lck10-PS-CFP2 and (B and D) Src15-PS-CFP2 transfected cells. Graphs show the mean of Ripley's K functions under normal conditions, 10 mM mβCD and 5 μM LatB treatments. Grey dotted line, 95% CI.

which are enriched in membrane rafts and generated by cytoplasmic phospholipase A₂ (cPLA₂) (Brown *et al.*, 2003). Apart from the role in phospholipid reorganization and membrane aggregation, AnxA6 expression also regulates intracellular cholesterol homeostasis (Grewal *et al.*, 2010). Cells with elevated AnxA6 levels are characterized by an accumulation of cholesterol in late endosomes, with a consequent cholesterol diminution at the plasma membrane and Golgi apparatus, which inhibits caveolin-1 transport to the plasma membrane (Cubells *et al.*, 2007). Interestingly, cholesterol depletion in the Golgi of AnxA6-expressing cells interferes with the recruitment and activity of cPLA₂ at the trans-Golgi-network (TGN) (Cubells *et al.*, 2008). Given that cPLA₂ is required to drive cholesterol-dependent formation and transport of secretory vesicles from the TGN to the plasma membrane, this might further contribute to changes in membrane order at the cell surface.

A role for cholesterol to stimulate the binding of AnxA6 to liposomes *in vitro* (Ayala-Sanmartin, 2001) and changes in cholesterol and/or pH stimulating Ca²⁺-independent interactions of AnxA6 with endosomal and cell surface membranes had already been observed in earlier studies (de Diego *et al.*, 2002; Monastyrskaya *et al.*, 2009). AnxA6 has been postulated as a *bona fide* cholesterol-binding protein; *in vitro* binding studies identified tryptophan-343 (W343) within the linker region of AnxA6 as important for the proposed interaction

between recombinant AnxA6 and cholesterol (Domon *et al.*, 2010). More recently, a comprehensive proteome-wide mapping of cholesterol-interacting proteins in mammalian cells recognized AnxA6 as a potential cholesterol-binding protein (Hulce *et al.*, 2013). Interestingly, while AnxA6 has been linked to cholesterol homeostasis, similar modes of action have not been made for other annexins like AnxA2, indicating different mechanisms of AnxA2 and AnxA6 to affect plasma membrane order (Illien *et al.*, 2012).

In Figure 6, we propose a model that summarizes and links AnxA6 expression with cholesterol- and actin-mediated structural and functional changes at the plasma membrane. This model outlines two different plasma membrane domain distributions depending on cellular cholesterol levels and cortical actin cytoskeleton meshwork features. In MEF cells, the cortical actin cytoskeleton forms corrals where the Lo raft domains are confined. This hypothesis is in agreement with recent findings that describe, using fluorescent correlation spectrometry and stimulated emission depletion super-resolution microscopy, membrane partitioning into Lo-enriched domains surrounded by Ld-enriched domains that correlate with actin fibres (Honigsmann *et al.*, 2014). In both models, the degree of the actin meshwork density will determine the corral size, and the level of membrane cholesterol and other raftophilic lipid moieties will determine the different membrane phase proportions. In A431 cells,

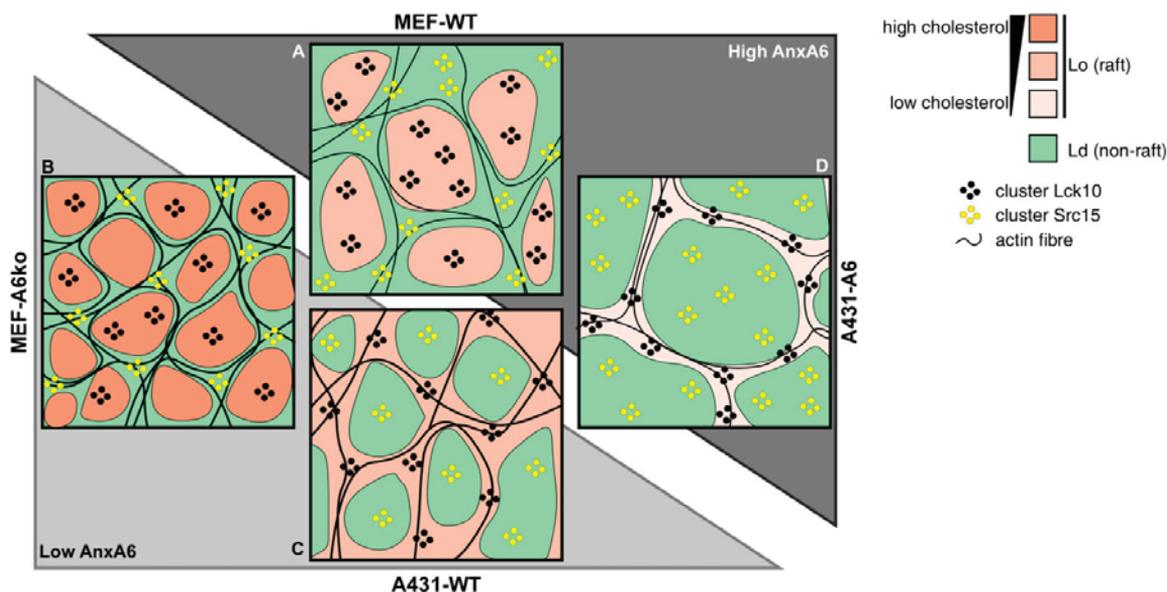


Figure 6

Proposed model for AnxA6-induced membrane organization. The proposed model suggests that fibroblasts plasma membrane (A) has lipid raft confined into actin fibre corrals due to its cholesterol content and its cortical actin cytoskeleton. (B) When AnxA6 is knocked out, higher plasma membrane cholesterol content and a prominent cortical actin cytoskeleton can be observed, which could drive domain partitioning of both Lo and Ld phases. On the other hand, epithelial cells (C and D) might have non-rafts confined into corrals where cortical actin cytoskeleton determines corral size and cluster partitioning. (D) In this setting, AnxA6 expression may induce diminution of cortical actin cytoskeleton and plasma membrane cholesterol, allowing larger non-raft Ld domains.

however, cortical actin cytoskeleton delimits Ld non-raft domains into corrals, with the Lo membrane phase associated with the actin filaments. Experimental data supporting this hypothesis, using a phasor approach to fluorescence lifetime imaging microscopy data analysis and 7-ketocholesterol treatment, allowed us to propose a model where, in reduced plasma membrane order conditions, Ld phase is present in the corral lumen while the Lo raft phase is associated with actin filaments (Owen *et al.*, 2012c). The proposed model here suggests that the regulation of cholesterol levels, other raftophilic lipid moieties and/or the actin cytoskeleton meshwork, by means of AnxA6 and other membrane regulators or even specific drugs such as m β CD or LatB, might modulate the plasma membrane structure and partitioning. In addition, fluctuations in intracellular calcium levels are well known to strongly affect the membrane-binding ability of AnxA6 *in vitro*, but also in cellular models. For instance, we showed that calcium ionophores, but also activation of epidermal growth factor receptor (EGFR), which triggers local intracellular calcium concentration increase, induces AnxA6 translocation to the plasma membrane (Vila de Muga *et al.*, 2009; Grewal *et al.*, 2010). Hence, a combination of cholesterol, actin and calcium-driven events probably enables AnxA6 to not only affect the membrane order locally, but also to affect recruitment of signalling proteins to the plasma membrane. In line with this hypothesis, AnxA6 promotes calcium-dependent membrane recruitment of the GTPase

activating protein p120GAP (Grewal *et al.*, 2005) as well as PKC α (Koesel *et al.*, 2013). This is associated with AnxA6 interacting with active H-Ras and EGFR, promoting EGF-inducible Ras and EGFR inactivation in a calcium-dependent manner (Vila de Muga *et al.*, 2009; Koesel *et al.*, 2013). One can envisage that the dual role of AnxA6 affecting membrane order through cholesterol- and actin-dependent events identified here, together with calcium-sensitive AnxA6 membrane association, modulates the recruitment of signalling proteins, and consequently strength and duration of cellular signalling.

We and others have shown different AnxA6 functions regulating important cellular/physiological events such as endocytosis, exocytosis and cell migration, where membrane partitioning is considered essential. Firstly, AnxA6 is located at clathrin-coated pits and caveolae at the plasma membrane (Calvo and Enrich, 2000), specific membrane structures characterized by Ld and Lo phases respectively. Anderson and co-workers, based on AnxA6 interacting with spectrin, proposed a role for AnxA6 in receptor-mediated endocytosis (Kamal *et al.*, 1998). Upon AnxA6 binding to spectrin, calpain I cleaves spectrin and 'opens' the actin cytoskeleton facilitating the endocytosis. These AnxA6-dependent dynamic changes in membrane-cytoskeleton interaction are likely to involve changes in membrane order.

Secondly, currently available data suggest that AnxA6 probably inhibits the secretory pathway (Creutz, 1992;

Donnelly and Moss, 1997; Podsiwyalow-Bartnicka *et al.*, 2010). Our recent findings are in line with this concept as we identified a significant diminution of retrograde transport of vesicular stomatitis virus G protein transport from the cell surface to the TGN in cells with up-regulated AnxA6 levels (Cubells *et al.*, 2007). Furthermore, high levels of AnxA6 interfered with cholesterol-sensitive and t-SNARE (SNAP23 and syntaxin-4) dependent secretion of cargo (fibronectin, TNF- α) (Reverter *et al.*, 2011).

Finally, our most recent data provide novel molecular insights into our understanding of constitutive protein trafficking at the TGN/endosomal boundaries and identify the delivery of late endosomal cholesterol to the Golgi as a new pathway linking cholesterol with t-SNARE functioning and integrin recycling (Reverter *et al.*, 2014).

Future studies will have to determine whether AnxA6 expression levels and its influence in the remodelling of membrane microdomains are a common determinant for cholesterol regulation of t-SNARE localization, assembly and functioning in various cellular processes and cell types.

Acknowledgements

This study was supported by grants BFU2012-36272 and CSD2009-00016 from Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, Spain) and PI042182 from Fundació Marató TV3 (Spain) to C. E. K. G. would like to acknowledge funding from the National Health and Medical Research Council of Australia (NHMRC; 1059278, 1022182 and 1037320) and the Australian Research Council (ARC; CE140100011). T. G. is supported by the NHMRC of Australia (510294) and the University of Sydney (2010-02681). F. T. is supported by MINECO (BFU2012-38259). We are thankful to M. Calvo (Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona) for her help in confocal microscopy, and M. Molinos for technical assistance. A. A. G. and M. R. are grateful to MEC for a short-term fellowship at the Center for Vascular Research, University of New South Wales in Sydney, Australia.

Author contributions

A. A-G.: PALM experiments and biochemistry. S. V. d. M.: Di-4-ANEPPDHQ experiments. D. M. O. and D. W.: PALM quantification. A. M.: Lck10 and Src15 cloning. A. G-M.: Immunocytochemistry. M. R.: Cholesterol quantification. M. H. and R. C.: Biochemistry experiments. R. C.: Lck10 and Src15 cloning. F. T.: Discussion of results. T. G.: Discussion and proofreading. K. G.: PALM experiments design. J. A-S.: LUV experiments and discussion. C. E.: Financial support, discussion and proofreading. C. R.: Experiment design, discussion of results and writing the paper.

Conflict of interest

The authors disclose no conflicts.

References

- Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M *et al.* (2013a). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: Enzymes. *Br J Pharmacol* 170: 1797–1867.
- Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M *et al.* (2013b). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: Catalytic Receptors. *Br J Pharmacol* 170, 1676–1705.
- Annibale P, Vanni S, Scarselli M, Rothlisberger U, Radenovic A (2011). Quantitative photo activated localization microscopy: unraveling the effects of photoblinking. *PLoS ONE* 6: e22678.
- Ayala-Sanmartin J (2001). Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of annexins by their core domain. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 72–79.
- Brown WJ, Chambers K, Doody A (2003). Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* 4: 214–221.
- Calvo M, Enrich C (2000). Biochemical analysis of a caveolae-enriched plasma membrane fraction from rat liver. *Electrophoresis* 21: 3386–3395.
- Chichili GR, Rodgers W (2007). Clustering of membrane raft proteins by the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 282: 36682–36691.
- Creutz CE (1992). The annexins and exocytosis. *Science* 258: 924–931.
- Cubells L, Vila de Muga S, Tebar F, Wood P, Evans R, Ingelmo-Torres M *et al.* (2007). Annexin A6-induced alterations in cholesterol transport and caveolin export from the Golgi complex. *Traffic* 8: 1568–1589.
- Cubells L, Vila de Muga S, Tebar F, Bonventre JV, Balsinde J, Pol A *et al.* (2008). Annexin A6-induced inhibition of cytoplasmic phospholipase A2 is linked to caveolin-1 export from the Golgi. *J Biol Chem* 283: 10174–10183.
- D'Agostino RB, Belanger A, D'Agostino RB (1990). A suggestion for using powerful and informative tests of normality. *Am Stat* 44: 316–321.
- de Diego I, Schwartz F, Siegfried H, Dauterstedt P, Heeren J, Beisiegel U *et al.* (2002). Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6. *J Biol Chem* 277: 32187–32194.
- Domon MM, Matar G, Strzelecka-Kiliszek A, Bandorowicz-Pikula J, Pikula S, Besson F (2010). Interaction of annexin A6 with cholesterol rich membranes is pH-dependent and mediated by the sterol OH. *J Colloid Interface Sci* 346: 436–441.
- Donnelly SR, Moss SE (1997). Annexins in the secretory pathway. *Cell Mol Life Sci* 53: 533–538.
- Drucker P, Pejic M, Galla HJ, Gerke V (2013). Lipid segregation and membrane budding induced by the peripheral membrane binding protein annexin A2. *J Biol Chem* 288: 24764–24776.
- Edwards HC, Crumpton MJ (1991). Ca(2+)-dependent phospholipid and arachidonic acid binding by the placental annexins VI and IV. *Eur J Biochem* 198: 121–129.
- Enrich C, Rentero C, de Muga SV, Reverter M, Mulay V, Wood P *et al.* (2011). Annexin A6-Linking Ca(2+) signaling with cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* 1813: 935–947.
- Gaus K, Zech T, Harder T (2006). Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy. *Mol Membr Biol* 23: 41–48.
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE (2005). Annexins: linking Ca2+ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 449–461.

- Gokhale NA, Abraham A, Digman MA, Gratton E, Cho W (2005). Phosphoinositide specificity of and mechanism of lipid domain formation by annexin A2-p11 heterotetramer. *J Biol Chem* 280: 42831–42840.
- Gomez-Llobregat J, Buceta J, Reigada R (2013). Interplay of cytoskeletal activity and lipid phase stability in dynamic protein recruitment and clustering. *Sci Rep* 3: 2608.
- Grewal T, Evans R, Rentero C, Tebar F, Cubells L, de Diego I *et al.* (2005). Annexin A6 stimulates the membrane recruitment of p120GAP to modulate Ras and Raf-1 activity. *Oncogene* 24: 5809–5820.
- Grewal T, Koese M, Rentero C, Enrich C (2010). Annexin A6-regulator of the EGFR/Ras signalling pathway and cholesterol homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 580–584.
- Hawkins TE, Roes J, Rees D, Monkhouse J, Moss SE (1999). Immunological development and cardiovascular function are normal in annexin VI null mutant mice. *Mol Cell Biol* 19: 8028–8032.
- Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE (2004). Annexin-actin interactions. *Traffic* 5: 571–576.
- Head BP, Patel HH, Insel PA (2014). Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim Biophys Acta* 1838: 532–545.
- Honigsmann A, Sadeghi S, Keller J, Hell SW, Eggeling C, Vink R (2014). A lipid bound actin meshwork organizes liquid phase separation in model membranes. *eLife* 3: e01671.
- Hoque M, Rentero C, Cairns R, Tebar F, Enrich C, Grewal T (2014). Annexins – scaffolds modulating PKC localization and signaling. *Cell Signal* 26: 1213–1225.
- Hulce JJ, Cognetta AB, Niphakis MJ, Tully SE, Cravatt BF (2013). Proteome-wide mapping of cholesterol-interacting proteins in mammalian cells. *Nat Methods* 10: 259–264.
- Illien F, Piao HR, Coue M, di Marco C, Ayala-Sanmartin J (2012). Lipid organization regulates annexin A2 Ca(2+)-sensitivity for membrane bridging and its modulator effects on membrane fluidity. *Biochim Biophys Acta* 1818: 2892–2900.
- Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson RG (2007). Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* 9: 7–14.
- Kamal A, Ying Y, Anderson RG (1998). Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. *J Cell Biol* 142: 937–947.
- Koese M, Rentero C, Kota BP, Hoque M, Cairns R, Wood P *et al.* (2013). Annexin A6 is a scaffold for PKC α to promote EGFR inactivation. *Oncogene* 32: 2858–2872.
- Kusumi A, Koyama-Honda I, Suzuki K (2004). Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic* 5: 213–230.
- Kwik J, Boyle S, Fooksman D, Margolis L, Sheetz MP, Edidin M (2003). Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13964–13969.
- Lillemeier BF, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Wilson BS, Davis MM (2006). Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18992–18997.
- Maniti O, Alves I, Trugnan G, Ayala-Sanmartin J (2010). Distinct behaviour of the homeodomain derived cell penetrating peptide penetratin in interaction with different phospholipids. *PLoS ONE* 5: e15819.
- Monastyrskaya K, Babychuk EB, Hostettler A, Wood P, Grewal T, Draeger A (2009). Plasma membrane-associated annexin A6 reduces Ca²⁺ entry by stabilizing the cortical actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 284: 17227–17242.
- Nicolson GL (2014). The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta* 1838: 1451–1466.
- Owen DM, Rentero C, Rossy J, Magenau A, Williamson D, Rodriguez M *et al.* (2010). PALM imaging and cluster analysis of protein heterogeneity at the cell surface. *J Biophotonics* 3: 446–454.
- Owen DM, Magenau A, Williamson D, Gaus K (2012a). The lipid raft hypothesis revisited—new insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy. *Bioessays* 34: 739–747.
- Owen DM, Rentero C, Magenau A, Abu-Siniyeh A, Gaus K (2012b). Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. *Nat Protoc* 7: 24–35.
- Owen DM, Williamson DJ, Magenau A, Gaus K (2012c). Sub-resolution lipid domains exist in the plasma membrane and regulate protein diffusion and distribution. *Nat Commun* 3: 1256.
- Owen DM, Magenau A, Williamson DJ, Gaus K (2013). Super-resolution imaging by localization microscopy. *Methods Mol Biol* 950: 81–93.
- Parasassi T, De Stasio G, d’Ubaldo A, Gratton E (1990). Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys J* 57: 1179–1186.
- Parton RG, Richards AA (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 4: 724–738.
- Pawson AJ, Sharman JL, Benson HE, Faccenda E, Alexander SP, Buneman OP *et al.*; NC-IUPHAR (2014). The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY: an expert-driven knowledge base of drug targets and their ligands. *Nucleic Acids Res* 42 (Database Issue): D1098–1106.
- Podszylawalow-Bartnicka P, Kosiorok M, Piwocka K, Sikora E, Zablocki K, Pikula S (2010). Role of annexin A6 isoforms in catecholamine secretion by PC12 cells: distinct influence on calcium response. *J Cell Biochem* 111: 168–178.
- Qi M, Liu Y, Freeman MR, Solomon KR (2009). Cholesterol-regulated stress fiber formation. *J Cell Biochem* 106: 1031–1040.
- Rentero C, Evans R, Wood P, Tebar F, Vila de Muga S, Cubells L *et al.* (2006). Inhibition of H-Ras and MAPK is compensated by PKC-dependent pathways in annexin A6 expressing cells. *Cell Signal* 18: 1006–1016.
- Rescher U, Gerke V (2004). Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 117 (Pt 13): 2631–2639.
- Reverter M, Rentero C, de Muga SV, Alvarez-Guaita A, Mulay V, Cairns R *et al.* (2011). Cholesterol transport from late endosomes to the Golgi regulates t-SNARE trafficking, assembly, and function. *Mol Biol Cell* 22: 4108–4123.
- Reverter M, Rentero C, Garcia-Melero A, Hoque M, Vila de Muga S, Alvarez-Guaita A *et al.* (2014). Cholesterol regulates Syntaxin 6 trafficking at trans-Golgi network endosomal boundaries. *Cell Rep* 7: 883–897.
- Ritchie K, Iino R, Fujiwara T, Murase K, Kusumi A (2003). The fence and picket structure of the plasma membrane of live cells as revealed by single molecule techniques (Review). *Mol Membr Biol* 20: 13–18.

- Rossy J, Owen DM, Williamson DJ, Yang Z, Gaus K (2013). Conformational states of the kinase Lck regulate clustering in early T cell signaling. *Nat Immunol* 14: 82–89.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671–675.
- Schnitzer JE, Liu J, Oh P (1995). Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J Biol Chem* 270: 14399–14404.
- Simons K, Ikonen E (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569–572.
- Simons K, Toomre D (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31–39.
- Singer SJ, Nicolson GL (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720–731.
- Sugano K, Kansy M, Artursson P, Avdeef A, Bendels S, Di L *et al.* (2010). Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov* 9: 597–614.
- Vila de Muga S, Timpson P, Cubells L, Evans R, Hayes TE, Rentero C *et al.* (2009). Annexin A6 inhibits Ras signalling in breast cancer cells. *Oncogene* 28: 363–377.
- Williamson DJ, Owen DM, Rossy J, Magenau A, Wehrmann M, Gooding JJ *et al.* (2011). Pre-existing clusters of the adaptor Lat do not participate in early T cell signaling events. *Nat Immunol* 12: 655–662.

- Zibouche M, Vincent M, Illien F, Gallay J, Ayala-Sanmartin J (2008). The N-terminal domain of annexin 2 serves as a secondary binding site during membrane bridging. *J Biol Chem* 283: 22121–22127.
- Zobiack N, Rescher U, Ludwig C, Zeuschner D, Gerke V (2003). The annexin 2/S100A10 complex controls the distribution of transferrin receptor-containing recycling endosomes. *Mol Biol Cell* 14: 4896–4908.
- Zocher F, van der Spoel D, Pohl P, Hub JS (2013). Local partition coefficients govern solute permeability of cholesterol-containing membranes. *Biophys J* 105: 2760–2770.

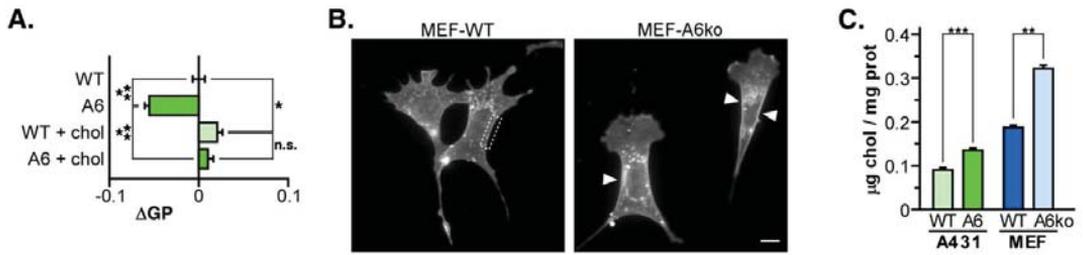
Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

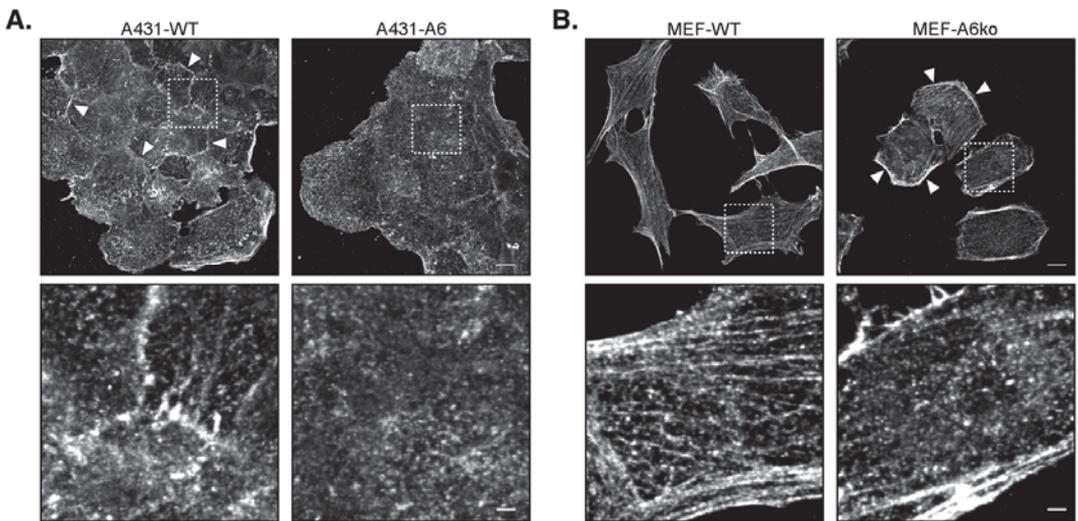
<http://dx.doi.org/10.1111/bph.13022>

- Figure S1** AnxA6 alters cholesterol levels and distribution in A431 and MEF cells.
- Figure S2** AnxA6 modulates actin cytoskeleton distribution in A431 and MEF cells.
- Figure S3** Lck10-EGFP and Src15-mCherry distribution in DRMs and bulk membranes after subcellular fractionation of A431 and MEF ± AnxA6 cells.
- Figure S4** Cluster analysis of Lck10-PS-CFP2 and Src15-PS-CFP2 in mβCD and LatB-treated A431 and MEF cells.

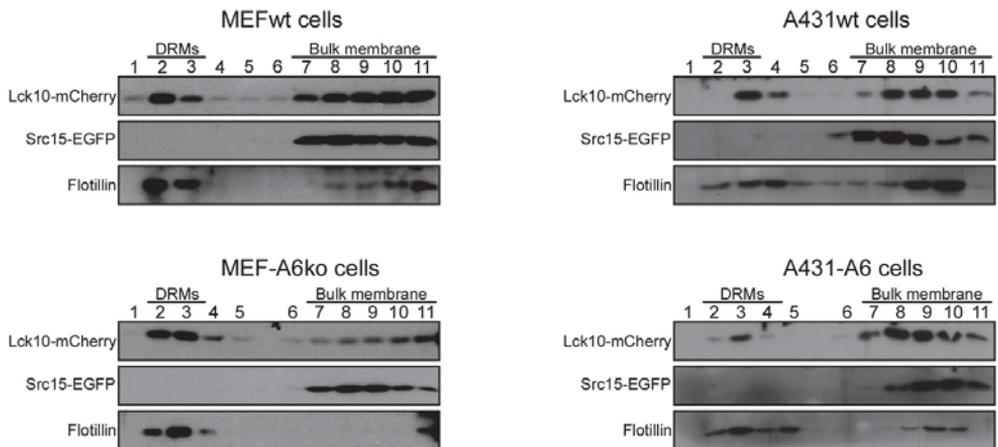
Supp Fig 1



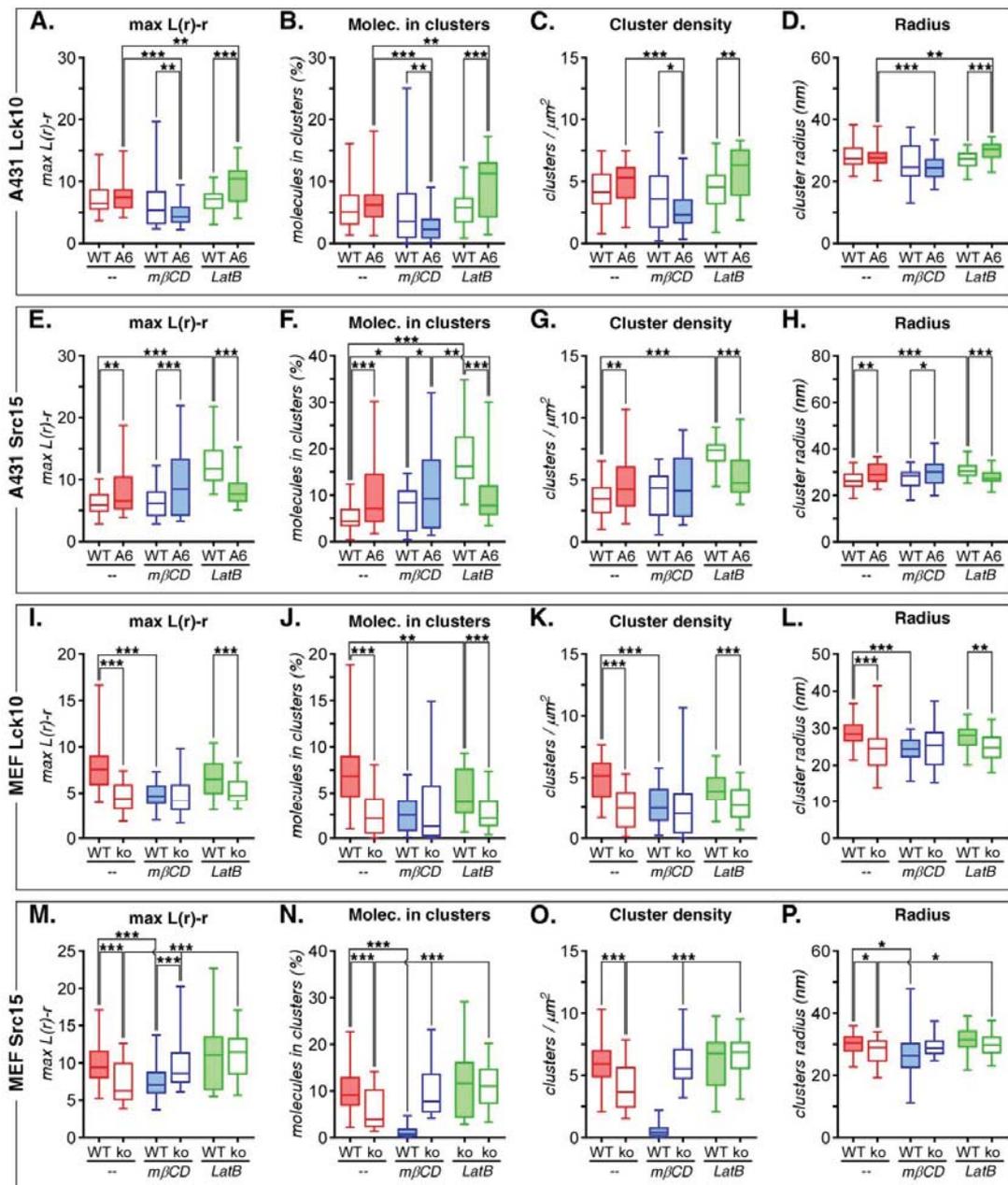
Supp Fig 2



Supp Fig 3



Supp Fig 4



PUBLICACIONES DURANTE LA TESIS

1. Alvarez-Guaita A, Vilà de Muga S, Owen DM, Williamson D, Magenau A, García-Melero A, Reverter M, Hoque M, Cairns R, Cornely R, Tebar F, Gaus K, Ayala-Sanmartín J, Enrich C, Rentero C. Evidence for Annexin A6-dependent plasma membrane remodelling of lipid domains. BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY. (Nov 19, 2014).
2. Reverter M, Rentero C, García-Melero A, Hoque M, Vilà de Muga S, Alvarez-Guaita A, Conway JR, Woods P, Cairns R, Lykopoulou L, Grinberg D, Vilageliu LI, Bosch M, Heeren J, Blasi J, Timpson P, Pol A, Tebar F, Murray RZ, Grewal T, Enrich C. Cholesterol regulates syntaxin 6 trafficking at trans-Golgi network endosomal boundaries. CELL REPORTS. 7 (3): 883 – 897; 2014.
3. Rodrigo-Torres D, Affò S, Coll M, Morales-Ibañez O, Millán C, Blaya D, Alvarez-Guaita A, Rentero C, Arroyo V, Caballería J, van Grunsven LA, Enrich C; Ginès P, Ferrer J, Bataller R, Sancho-Bru P. The Biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells. HEPATOLOGY. 2014. PMID: 24700364
4. Koese M, Rentero C, Kota BP, Hoque M, Cairns R, Wood P, Vilà de Muga S, Reverter M, Alvarez Guaita A, Monastyrskaya K, Hughes WE, Swarbrick A, Tebar F, Daly RJ, Enrich C, Grewal T. Annexin A6 is a scaffold for PKC α to promote EGFR inactivation. ONCOGENE. 32: 2858 – 2872; 2013.
5. Herms A, Bosch M, Ariotti N, Reddy BJ, Fajardo A, Fernández-Vidal A, Alvarez-Guaita A, Fernández Rojo MA, Rentero C, Tebar F, Enrich C, Geli MI, Parton RG, Gross SP, Pol A. Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity. CURRENT BIOLOGY. 23(15): 1489 - 1496. 2013.
6. Mulay V, Wood P, Manetsch M, Darabi M, Cairns R, Hoque M, Chan KC, Reverter M, Alvarez-Guaita A, Rye KA, Rentero C, Heeren J, Enrich C, Grewal T. Inhibition of mitogen-activated protein kinase Erk1/2 promotes protein degradation of ATP binding cassette transporters A1 and G1 in CHO and HuH7 cells. PLoS ONE. 8(4); e62667. 2013.
7. Reverter M, Rentero C, Vilà de Muga S, Alvarez-Guaita A, Mulay V, Cairns R, Wood P, Monastyrskaya K, Pol A, Tebar F, Blasi J, Grewal T, Enrich C. Cholesterol transport from late endosomes to the Golgi regulates t-SNARE trafficking, assembly and function. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL. 22: 4108 – 4123; 2011.

