



UNIVERSIDAD DE CHILE

INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Doctor Fernando Monckeberg Barros

**“LA INDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA DE RESPUESTA A ESTRÉS FKBP51
PRODUCE DESENSIBILIZACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE INSULINA
HEPÁTICA”**

Tesista

STACY BUSTOS BARRIENTOS

Director de Tesis

Dr. Rodrigo Troncoso Cotal

Tesis para optar al grado de Magíster en Nutrición y Alimentos

Mención Nutrición Humana

Abril de 2021

Santiago, Chile

AUTORIZACIÓN

El siguiente documento presentado como Tesis por la estudiante **Stacy Bustos Barrientos** ha sido revisado y aprobado por el Director de Tesis para la presentación formal ante la Comisión Evaluadora.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rodrigo', is written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat obscured by overlapping loops and strokes.

Dr. Rodrigo Troncoso Cotal

Santiago de Chile, Abril 2021

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Rodrigo Troncoso Cotal

Profesor Asociado; Laboratorio de Investigación en Nutrición y Actividad Física (LABINAF), Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile.

II. COMISIÓN EVALUADORA

Dr. Roberto Bravo Sagua

Profesor Asistente; Laboratorio de Obesidad y Metabolismo Energético en Geriátría y Adultos (OMEGA), Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile.

Dr. Diego Garcia Díaz

Profesor Asociado; Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Dr. Jorge Martinez Winkler

Profesor Titular; Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile.

La presente Tesis de Magíster se llevó a cabo en el laboratorio:

Laboratorio de Investigación en Nutrición y Actividad Física (LABINAF), Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile.

Para su realización, este trabajo contó con el apoyo y financiamiento del siguiente proyecto:

Proyecto FONDECYT 1191078.

III. DEDICATORIA

A mi tutor Dr. Rodrigo Troncoso por haberme dado la oportunidad de ser parte de su laboratorio y equipo de trabajo, por todas sus enseñanzas y correcciones que me han hecho aprender de un área tan linda como la investigación.

A todos los compañeros de LABINAF por su ayuda en la realización de diferentes experimentos y sus consejos para mejorar mi trabajo. Gracias a todos por su tiempo, sus risas, su compañía en cada almuerzo, las salidas que recuerdo con mucho cariño. Quiero agradecer especialmente a Camila, Juan y Francisco Pino, por siempre darse todo el tiempo del mundo para enseñarme experimentos, como se realizaban, toda la información que siempre les pedí, por haber estado ahí para mí gracias. Y por supuesto, quiero agradecer especialmente a mi partner Omara, tuve grandes y lindos momentos a tu lado que jamás olvidaré, gracias por ser como eres, te quiero.

A mi hijo y pareja por ser mi fuerza, mi compañía, los pilares fundamentales de mi vida y mis ganas de salir adelante cada día. A mi niño por su sonrisa tan bonita cada mañana que me llena de energía. Seré para ti tu ejemplo de vida, por eso daré lo mejor de mí, para que sepas que no hay barreras que detengan los sueños, que solo debes querer para poder hacerlos realidad y que grandes personas acompañaran siempre tu camino. Además, mamá y papá estarán ahí para ti, para ser tus guías en el camino que decidas escoger. A mi pareja simplemente gracias por darme este hermoso pedazo de cielo en la tierra, te amo.

A mis padres, por acompañarme en cada paso que quiero dar, por apoyarme en cada decisión que he tomado, me enseñaron que estudiar te ayuda a salir adelante, te abre más puertas, justo como las que ellos abrieron para mí, que suerte tengo de tenerlos a mi lado. Gracias por dejarme ser lo que quería ser, por acompañarme en cada etapa de mi vida con orgullo, gracias a ustedes tuve el privilegio de seguir estudiando. Por todo esto y más agradezco que me sigan acompañando y que siempre están ahí para las buenas y malas, eso se valora mucho.

A mi hermano Eliot por el apoyo que me dio cuando nadie más pudo, siempre estás ahí para las buenas y demostraste que una pandemia no te hace diferente sino que mucho mejor persona, gracias por lo que hiciste por mi familia.

IV. ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Resumen.....	9
2. Abstract.....	11
3. Introducción.....	13
3.1 Esteatosis Hepática no Alcohólica	13
3.2 Resistencia a la Insulina Hepática.....	14
3.3 Glucocorticoides	16
3.4 FKBP5.....	18
4. Hipótesis de Trabajo y Objetivos.....	20
4.1 Pregunta de investigación	20
4.2 Hipótesis	20
4.3 Objetivo general	20
4.4 Objetivos específicos	20
5. Metodología	21
5.1 Definición de muestra	21
5.2 Definición del diseño de la investigación.....	21
5.3 Diseño experimental por objetivos	21
5.4 Definición de conceptos y variables	22
5.5 Métodos.....	22
5.6 Análisis estadístico.....	28
6. Resultados	29
7. Discusión	32
8. Conclusión.....	37
9. Referencias.....	38
10. Anexos	43

V. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de señalización mediada por insulina en hepatocito.....	16
Figura 2. Los glucocorticoides aumentan la expresión de FKBP51 a través del receptor de glucocorticoides.....	29
Figura 3. Los glucocorticoides inducen desensibilización del receptor de insulina coincidente con un aumento de la expresión de FKBP51.....	30
Figura 4. La sobreexpresión de FKBP51 induce una disminución en la respuesta a insulina.....	31

VI. LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianzas (analysis of variances)
DMEM	Medio de eagle modificado por dulbecco
DT2	Diabetes mellitus tipo 2
GCs	Glucocorticoides
GR	Receptor de glucocorticoides
HFD	Dieta alta en grasas (high fat diet)
HGP	Producción de glucosa hepática (hepatic glucose production)
HPA	Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal
IRS	Sustratos de receptores de insulina (insulin receptor substrates)
mA	Miliamperios
NAFLD	Esteatosis hepática no alcohólica (<i>nonalcoholic fatty liver disease</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RI	Resistencia a la insulina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
TAG	Triglicéridos
TBS	Tampón Tris Salino
TBS-T	Tampón Tris Salino con Tween
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (Very low density lipoprotein)

1. RESUMEN

Introducción: La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es la enfermedad hepática más común, donde la resistencia a la insulina (RI) juega un papel fundamental en su patogénesis. Por otro lado, los glucocorticoides (GCs) son hormonas contrareguladoras de la insulina que se sintetizan en la corteza adrenal y su secreción está regulada por la actividad del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA), donde los niveles circulantes de GCs son mantenidos por una retroalimentación negativa del eje, existiendo una regulación circadiana y en respuesta al estrés. Los GCs tienen múltiples acciones biológicas, modulando procesos como el metabolismo energético, donde un exceso de GCs se asocia con trastornos metabólicos que culminan en el desarrollo de obesidad, diabetes, dislipidemia, hipertensión, hiperglucemia, RI y NAFLD. Los principales efectos de los GCs son mediados por la activación del receptor de glucocorticoides (GR). Bajo este contexto, se han realizado diversos estudios entorno a la co-chaperona del GR llamada FKBP51, cuya expresión es regulada por GCs. Su efecto más estudiado es su acción como regulador negativo de la función del GR. Recientemente, se ha descrito a FKBP51 como un regulador de la vía de señalización Akt, proteína involucrada en la respuesta de insulina. **Objetivo:** Evaluar si la inducción de FKBP51 por GCs produce desensibilización en la señalización de insulina en hepatocitos. **Métodos:** Se utilizó la línea celular HepG2, que fue estimulada con el GC sintético dexametasona, también con el antagonista del GR RU486, con el fin de determinar el papel del GR y la expresión de las proteínas FKBP51, PEPCK1, G6P mediante Western blot. La sensibilidad a insulina se evaluó mediante el estudio de la fosforilación de Akt, a través de Western blot. **Resultados:** El GC dexametasona aumenta de forma significativa la expresión de la proteína FKBP51. El GC dexametasona no modifica significativamente las enzimas claves que regulan la gluconeogénesis PEPCK1 y G6P. La expresión de FKBP51 no aumenta en presencia de RU486 antagonista del GR. Por otra parte, dexametasona disminuye la fosforilación de Akt coincidente con un aumento en la expresión de FKBP51. Finalmente, la sobreexpresión de FKBP51 induce una disminución en la respuesta a la insulina determinada por la fosforilación de Akt. **Conclusión:** El GC

Dexametasona aumenta la expresión de la proteína de respuesta a estrés FKBP51 mediante la activación del GR. Este aumento en los niveles de la proteína FKBP51 inducido por dexametasona es coincidente con la disminución de la fosforilación de Akt. La sobreexpresión de FKBP51 indujo una disminución en la respuesta a insulina mediante p-Akt. Por lo tanto, demostramos que el aumento de la proteína de estrés FKBP51 a través de la sobreexpresión se relaciona con una desensibilización en la señalización de insulina en la línea celular hepática HepG2.

2. ABSTRACT

Introduction: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common liver disease, where insulin resistance (IR) plays a fundamental role in its pathogenesis. On the other hand, glucocorticoids (GCs) are insulin counterregulatory hormones that are synthesized in the adrenal cortex and their secretion is regulated by the activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis, where circulating levels of GCs are maintained by a negative feedback of the axis, existing a circadian regulation and in response to stress. GCs have multiple biological actions, modulating processes such as energy metabolism, where an excess of GCs is associated with metabolic disorders that culminate in the development of obesity, diabetes, dyslipidemia, hypertension, hyperglycemia, RI and NAFLD. The main effects of GCs are mediated by the activation of the glucocorticoid receptor (GR). In this context, various studies have been carried out on the GR co-chaperone called FKBP51, whose expression is regulated by GCs. Its most studied effect is its action as a negative regulator of GR function. Recently, FKBP51 has been described as a regulator of the Akt signaling pathway, a protein involved in the insulin response.

Objective: To evaluate whether the induction of FKBP51 by GCs produces desensitization of insulin signaling in hepatocytes. **Methods:** The HepG2 cell line was used, which was stimulated with the synthetic GC dexamethasone, also with the GR antagonist RU486, in order to determine the role of GR and the expression of FKBP51, PEPCK1, G6P proteins by Western blot. Insulin sensitivity was evaluated by studying the Akt phosphorylation, through Western blot. **Results:** The GC dexamethasone significantly increases the expression of the FKBP51 protein. GC dexamethasone does not significantly modify the key enzymes that regulate gluconeogenesis PEPCK1 and G6P. The expression of FKBP51 does not increase in the presence of GR antagonist RU486. On the other hand, dexamethasone decreases the phosphorylation of Akt coinciding with an increase in the expression of FKBP51. Finally, the overexpression of FKBP51 induces a decrease in the response to insulin determined by the phosphorylation of Akt. **Conclusion:** GC Dexamethasone increases the

expression of the stress response protein FKBP51 by activating the GR. This increase in the levels of the protein FKBP51 induced by dexamethasone is coincident with the decrease in phosphorylation of Akt. FKBP51 overexpression induced a decrease in insulin response by p-Akt. Therefore, we demonstrate that the increase of the stress protein FKBP51 through overexpression is related to a desensitization in insulin signaling in the hepatic cell line HepG2.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Esteatosis hepática no alcohólica

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés *Nonalcoholic fatty liver disease*) es la enfermedad hepática más común y está aumentando en todo el mundo en paralelo con el incremento de obesidad, diabetes y resistencia a la insulina (RI) (1,2). Se estima una prevalencia de alrededor de un 10% a 30% dependiendo de la población de estudio (variabilidad mundial; Anexo 1) y metodología de diagnóstico (ultrasonido, biopsias hepáticas, entre otros). Independiente de su estado nutricional y género, en sujetos obesos o con diabetes tipo 2 (DT2) puede ser superior al 70% (1,3,4). En Chile, el año 2009 un estudio realizado con ultrasonografía abdominal reportó una prevalencia del 23.4% con NAFLD y una prevalencia del 23.2% con obesidad (5). En la última Encuesta Nacional de Salud de Chile un 74.2% de la población presenta exceso de peso, por lo que la prevalencia de NAFLD podría aumentar (6).

La NAFLD es una entidad clínico-patológica que engloba un amplio espectro de lesiones en el hígado que incluyen la esteatosis simple o hígado graso no alcohólico, que es la forma no progresiva de NAFLD. Esta rara vez progresa a cirrosis. La NAFLD también incluye esteatohepatitis no alcohólica, la cual es la forma progresiva de NAFLD que puede conducir a fibrosis, cirrosis hepática y en última instancia carcinoma hepatocelular, insuficiencia hepática y mortalidad relacionada con la enfermedad hepática (3,7). Técnicamente, la NAFLD se define como la acumulación anormal de triglicéridos (TAG) mayor a un 5% del peso total del hígado. Este es el primer paso en la fisiopatología de NAFLD y resulta de un desequilibrio entre la síntesis, el catabolismo y el transporte de TAG. La NAFLD se determina por técnicas de imagen o biopsia hepática en individuos sin consumo excesivo de alcohol (<20 g/día para mujeres y <30 g/día para hombres), ni consumo de drogas, entre otros (1,8,9).

La NAFLD se asocia a los diferentes componentes del síndrome metabólico especialmente obesidad, DT2, RI y dislipidemia, de manera que es considerado por muchos autores como el componente hepático del síndrome metabólico (1,10).

Debido a esto, la NAFLD es un factor de riesgo importante para la mortalidad tanto hepática como cardiometabólica (9), y se ha convertido en una de las principales preocupaciones de salud pública por sus secuelas potencialmente graves, enfatizando que no existe tratamiento más que un cambio de alimentación y actividad física (10).

En cuanto a los mecanismos del desarrollo y progresión de la enfermedad, lo más aceptado es el modelo de impactos múltiples, los que incluyen factores genéticos, ambientales (dieta, peso, entre otros aspectos) y también, impactos paralelos en tejidos y órganos como cambios en la microbiota intestinal, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, estrés de retículo endoplásmico, lipogénesis *de novo*, lipotoxicidad, lesión del hepatocito y muerte que desencadena inflamación hepática, activación de células estrelladas hepáticas y fibrogénesis progresiva. En resumen, el influjo excesivo de ácidos grasos hacia el hígado y la RI juegan un papel fundamental en la patogénesis de NAFLD, aunque se desconoce cuál es primero, la acumulación de lípidos o la RI hepática (9-11).

3.2 Resistencia a la insulina hepática

El hígado desempeña un papel central en la regulación sistémica del metabolismo de la glucosa y el de lípidos. Se cree que una insensibilidad hepática a la acción de la insulina es un impulsor fundamental de la RI, en la cual son necesarios niveles más altos de insulina circulante para controlar adecuadamente los niveles de glucosa en la sangre. La RI se define cuando un nivel de insulina normal o elevada produce una respuesta biológica reducida, es decir una disminución de la sensibilidad a la insulina (12). La RI puede ser un mecanismo de adaptación para optimizar el suministro de nutrientes a diversos tejidos, relacionado con el ciclo vital, y también puede ser patológico, por ejemplo en respuesta al estrés, a la ingesta excesiva de alimentos, al inadecuado gasto energético o a otras enfermedades (13).

La insulina es una hormona peptídica secretada por el páncreas. En el hígado, su acción es reducir la producción de glucosa hepática (HGP) y favorecer la síntesis de macromoléculas como el glucógeno, lípidos y proteínas (14). La insulina efectúa su acción cuando se une al receptor de insulina (15). Estos efectos están mediados

por la fosforilación de sus sustratos (IRS, por sus siglas en inglés *Insulin Receptor Substrates*). Una vez fosforilado IRS, sirve como sitio de acoplamiento para mediadores posteriores, que son dos vías principales, la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) – que media el efecto de la insulina sobre el crecimiento celular – y la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) – que media el efecto de la insulina en el metabolismo y la supervivencia (16). Una rama importante de la señalización vía PI3K es la quinasa Akt (**Figura 1**), la cual es reclutada a la membrana plasmática donde es fosforilada en dos residuos, Ser⁴⁷³ y Thr³⁰⁸ (17).

La señalización de insulina río abajo de Akt **estimula la síntesis de glucógeno**, a través de la inactivación de la proteína glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), que desfosforila y activa la glucógeno sintasa (GS), modulando así la síntesis de glucógeno. Además, Akt **estimula la lipogénesis de novo**, a través de la activación de la proteína de unión al elemento regulador del esteroide que une la proteína 1c (SREBP-1c), promueve la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos en el núcleo. También, Akt **inhibe la glicógenolisis**, mediante la inactivación del factor de transcripción FOXO1, evitando que ingrese al núcleo y regulando a la baja los genes necesarios para la gluconeogénesis, principalmente la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la glucosa 6-fosfatasa (G6P), e **inhibe la HGP** lo que ayuda a mantener un nivel bajo de glucosa en la sangre (18,19). La desregulación de la activación de Akt tiene un gran impacto en el desarrollo de diversos entornos patológicos como la RI, DT2, enfermedades cardiovasculares y obesidad, entre otros (17).

Ahora bien, la resistencia a la insulina hepática (RI-H) es la disminución de la capacidad de la insulina para suprimir la HGP, pese a los elevados niveles de insulina circulantes. Asimismo, la ablación específica del receptor de insulina en el hígado, induce intolerancia a la glucosa, RI, disminuye los TAG plasmáticos y la lipogénesis *de novo* (18,20). En este sentido, existe un fenómeno conocido como la paradoja de la RI-H, que corresponde a acciones duales de la insulina en el hígado:

- 1) El factor de transcripción FOXO1 se vuelve resistente a la insulina, por tanto los ARNm para PEPCK y G6P seguirán elevados, estimulando la gluconeogénesis; Sin

embargo 2) SREBP-1c mantendrá la sensibilidad a la insulina, por lo que se mantendrá la síntesis de ácidos grasos, conduciendo a la acumulación de TAG en el hígado. Este último conduce a la excesiva secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés *very low density lipoprotein*), elevando los niveles de TAG plasmáticos. En ratones y humanos con obesidad y DT2, la menor inhibición de la HGP induce hiperglucemia con exacerbación de la lipogénesis *de novo*, que contribuye a NAFLD e hipertrigliceridemia (21,22).

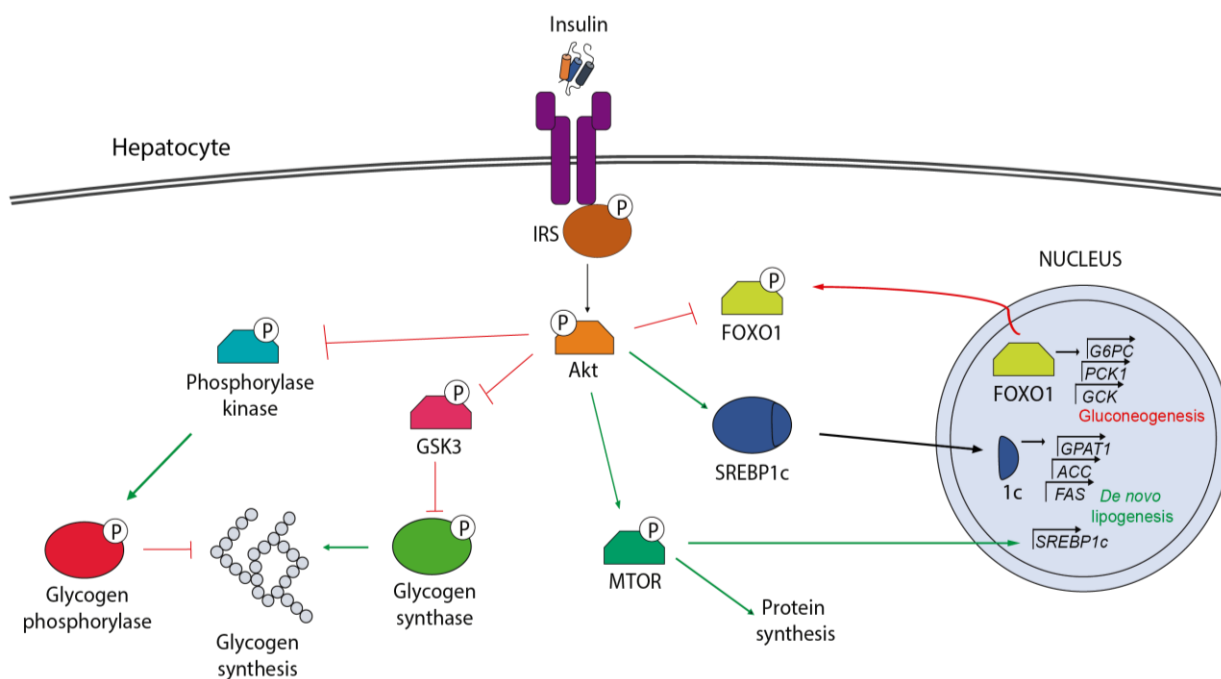


Figura 1. Vía de señalización mediada por insulina en hepatocito. La interacción de la insulina con su receptor desencadena una cascada de señalización río abajo, donde el principal efector es Akt. La fosforilación de Akt estimula la síntesis de glucógeno, a través de la inactivación de la proteína GSK3. También, Akt estimula la lipogénesis de novo, a través de la activación de la proteína SREBP-1c. Asimismo, Akt inhibe la gluconeogénesis mediante la inactivación del factor de transcripción FOXO1, evitando su ingreso al núcleo y regulando la expresión de los genes que codifican las principales enzimas reguladoras de gluconeogénesis: PEPCK y G6Pasa.

3.3 Glucocorticoides

Los Glucocorticoides (GCs) modulan múltiples procesos biológicos afectando a casi todos los órganos y tejidos del cuerpo, regulando procesos como el metabolismo y la homeostasis de energía, la respuesta inmune, el crecimiento óseo, la reproducción, la proliferación celular y la supervivencia (23). Los GCs son hormonas

esteroidales derivadas del colesterol, se sintetizan en la corteza adrenal y su secreción está regulada por la actividad del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA). En este sentido, los niveles circulantes de GCs son mantenidos por una retroalimentación negativa establecida dentro de este eje HPA, que posee regulación circadiana y en respuesta al estrés (24,25).

Los GCs ejercen sus funciones mediante la unión a su receptor intracelular, es decir, el receptor de glucocorticoides (GR) y la mayoría de los efectos de estas hormonas son mediados por la activación del GR. Los GCs naturales (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) y sintéticos (por ejemplo, dexametasona) son lipofílicos e ingresan a las células por difusión a través de la membrana plasmática. Las principales funciones biológicas de la unión GC-GR incluyen el control de la homeostasis energética y la glucosa, entre otras. La acción de los GCs a corto plazo es necesaria para mantener el equilibrio de diferentes procesos metabólicos dentro del organismo. Acorde a su concentración sistémica, la acción de GCs se divide en dos rutas: a bajas concentraciones regulan enzimas del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, mientras que a altas concentraciones activan mecanismos antiinflamatorios e inmunosupresores (26,27).

Dentro de sus efectos metabólicos, los GCs participan en la mantención de la euglicemia, a través de la producción de glucosa mediante la gluconeogénesis en el hígado, efecto que es mediado por la inducción transcripcional de la G6P y la PEPCK1, que catalizan etapas limitantes de la gluconeogénesis. Además, los GCs activan la degradación de proteínas musculares y aumento de la lipólisis del tejido adiposo, para aumentar la cantidad de sustratos metabólicos circulantes. Un exceso sostenido de GCs se asocia con trastornos metabólicos como el desarrollo de DT2, obesidad, RI, dislipidemia, hipertensión, hiperglucemia y NAFLD (27-31).

Curiosamente, los GCs promueven la lipogénesis inducida por la insulina en hepatocitos, pero no se ha observado ninguna asociación entre la NAFLD y los niveles plasmáticos de cortisol en los humanos (32). Sin embargo, los sujetos obesos con NAFLD tienen una sobreactividad sutil y crónica en el eje HPA, la cual está asociada con la severidad de NAFLD (33). Por el contrario, se han

documentado los efectos beneficiosos del bloqueo del GR en los trastornos relacionados con la obesidad. La droga Mifepristona (RU486) que es un antagonista del GR, contrarresta la hiperglucemia, la RI y la obesidad, argumentando un papel crítico del GR en la fisiopatología del exceso de GCs en pacientes con síndrome de Cushing (27).

3.4 FKBP51

La proteína de unión FK506 de inmunofilina 51 (FKBP51) es una proteína co-chaperona, perteneciente a la familia de las peptidil prolil isomerasas (PPIase), que es codificada por el gen FKBP5 y posee un dominio tetratricopéptido (TPR), que sirve de acoplamiento para copartícipes como Hsp90 (*Heat shock protein 90*). La proteína co-chaperona FKBP51 forma parte del heterocomplejo del GR junto a las chaperonas Hsp90, Hsp70 y p23 que mantienen al GR en el citoplasma y cuando se une el ligando GC, FKBP51 se disocia del GR y es reemplazada por FKBP52, permitiendo la translocación del GR al núcleo (34,35). Una vez allí, el GR se une a los elementos de respuesta a GCs (GRE), secuencias de ADN en la región promotora de los genes diana, lo que desencadena la transcripción o represión de varios genes, donde el gen FKBP5 que codifica para la expresión de la proteína FKBP51 es un objetivo de transcripción del GR (36,37).

La expresión de la proteína FKBP51 es inducida por la activación del GR, por lo que FKBP51 regula la actividad del GR, reduce su unión a GCs y retrasa su translocación al núcleo, resultando en un mecanismo intracelular de retroalimentación negativa, por lo que FKBP51 se ha descrito como marcador de sensibilidad y biodisponibilidad del GR (38,39,40). Independientemente de su rol como co-chaperona del GR, FKBP51 participa en el metabolismo energético, regulando negativamente la vía de señalización de Akt, promoviendo la desfosforilación en Ser⁴⁷³. Este efecto lo realiza aumentando la interacción entre Akt y la proteína fosfatasa de repetición rica en leucina (PHLPP) (38,41).

La desregulación del eje HPA por trastornos metabólicos ha sido ampliamente reportada; pero el papel de FKBP51 ha comenzado a ser estudiado recientemente. Un estudio reportó la expresión del ARNm de FKBP5 en biopsias de tejido adiposo

subcutáneo y omental de donantes no diabéticos bajo la exposición al GC sintético dexametasona. El GC Dex aumentó la expresión del gen y la proteína FKBP5, específicamente en el tejido adiposo omental la mayor expresión del gen FKBP5 se asoció con menor sensibilidad a la insulina sobre la captación de glucosa, y en el tejido adiposo subcutáneo la mayor expresión del gen FKBP5 se correlacionó positivamente con resistencia a la insulina (HOMA-IR), por lo que la exposición a Dex promueve la expresión de FKBP5 en el tejido adiposo, gen que puede estar implicado en RI inducida por GCs (37). Se encontró que el polimorfismo en FKBP5 está asociado con DT2, mientras que ratones FKBP5-KO alimentados con una dieta alta en grasas (HFD por sus siglas en inglés, *High Fat Diet*) son resistentes al aumento de peso, a la esteatosis hepática, poseen un tejido adiposo reducido, tienen niveles de glucosa e insulina más bajos versus ratones *wild type* (42). Además, en otro trabajo se demostró que tienen una mayor tolerancia a la glucosa y una mayor señalización de la insulina en el músculo esquelético, a través de una unión reducida de la fosfatasa PHLPP con Akt y AS160 (42). Asimismo, en este estudio el bloqueo o antagonismo farmacológico de FKBP51 con SAFit2 demostró mejorar la tolerancia a la glucosa (43). Es importante destacar que SAFit2 es el primer antagonista altamente selectivo para FKBP51 y ha sido desarrollado recientemente (44). Estos estudios sugieren un papel clave de FKBP51 en la cascada de señalización de insulina, el metabolismo de carbohidratos y lípidos, lo que hace de FKBP51 un objetivo potencial para los enfoques terapéuticos en los trastornos relacionados con el metabolismo.

En vista de los antecedentes expuestos, en esta tesis se evaluó el papel de la proteína de respuesta a estrés FKBP51 en la regulación de la sensibilidad a insulina en la línea celular de hepatocarcinoma HepG2.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

4.1 Pregunta de investigación

¿Podrá FKBP51 inducir desensibilización en la señalización de insulina hepática?

4.2 Hipótesis

La inducción de la proteína de respuesta al estrés FKBP51 induce desensibilización en la señalización de insulina hepática.

4.3 Objetivo General

Evaluar si la inducción de FKBP51 produce desensibilización en la señalización de insulina hepática.

4.4 Objetivos Específicos

1. Evaluar si los glucocorticoides, a través del receptor de glucocorticoides inducen un aumento en la expresión de FKBP51 y desensibilización a la respuesta a insulina.
2. Estudiar si la sobreexpresión de FKBP51 induce desensibilización en la señalización de insulina.

5. METODOLOGÍA

5.1 Muestra

Se utilizó la línea celular HepG2, que corresponde a una línea celular establecida a partir de un carcinoma hepatocelular de humano – derivada del tejido hepático de un varón caucásico de 15 años.

5.2 Definición del diseño de la investigación

El diseño de estudio es experimental *in vitro*. Los experimentos fueron realizados al menos en tres repeticiones independientes por condición experimental.

5.3 Diseño experimental

Objetivo 1: Evaluar si los glucocorticoides, a través del GR inducen aumento en la expresión de FKBP51 y desensibilización a la insulina.

Para evaluar si los GCs inducen un aumento en la expresión de FKBP51 se utilizó la línea celular HepG2 se estimuló por 24 h con dexametasona 1 μM , donde se evaluó la expresión de FKBP51 mediante Western blot. Para determinar el papel del GR se utilizó el antagonista RU486 10 μM . También, se evaluó la expresión de las proteínas G6P, PEPCCK1, GAPDH y los niveles de FKBP51 por Western blot.

Objetivo 2: Estudiar si la sobreexpresión de FKBP51 induce desensibilización en la señalización de insulina.

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de FKBP51 se transfectó el plasmidio FKBP5 Myc-DDK-tagged, con el fin de determinar si el aumento de la expresión de FKBP51 afecta la respuesta de la cascada de insulina mediante la evaluación de los niveles de la forma fosforilada y total de Akt por Western blot. También, se estimuló la línea celular HepG2 con dexametasona 1 μM por 24 h y en los 30 minutos finales se estimuló con insulina 100 nM con el fin de determinar si FKBP51 disminuye la respuesta de la insulina mediante la evaluación de los niveles de la forma fosforilada y total de Akt y GAPDH por Western blot.

5.4 Definición de Conceptos y Variables

	Tipo de Variable	Método
Variables independientes		
Dexametasona	Categórica	Western blot
Insulina (INS)	Categórica	Western blot
Plasmidio FKBP51	Categórica	Western blot
RU486	Categórica	Western blot
Variables dependientes		
FKPB51	Cuantitativa continua	Western blot
p-Akt	Cuantitativa continua	Western blot
Akt-total	Cuantitativa continua	Western blot
G6P	Cuantitativa continua	Western blot
PEPCK	Cuantitativa continua	Western blot

5.5 Métodos

5.5.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron de Thermo Fisher Scientific: medio modificado de Dulbecco (DMEM), medio de suero reducido Opti-MEM, Lipofectamine 2000, gelatina, tripsina-EDTA 1x anticuerpo anti GAPDH (cat. G9545), o-fenilendiamina (OPD), dodecilsulfato de sodio (SDS), acrilamida, bis-acrilamida, glicina, glucosa, Tris base (tris (hidroximetil) aminometano) y Kit BCA. Los anticuerpos secundarios policlonales tanto de ratón (#402335) como de conejo (#401315) se obtuvieron en Calbiochem. Los anticuerpos para p-AKT Ser473 (#9271), AKT (#9272), FKBP51 (#12210), G6P (#8866), PEPCK se obtuvieron en Cell Signaling. De Gibco BRL se obtuvo el suero fetal bovino (FBS). La insulina, Dexametasona, RU486 provendrán de Sigma-Aldrich Corp. El plásmido control pCMV6-Entry y el plásmido FKBP5-Myc-DDK fueron obtenidos en Origene. Todos los otros compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck.

5.5.2 Cultivo Celular

La línea celular HepG2 fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, CRL-2254). Éstas se cultivaron en DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino (FBS por sus siglas en inglés) más 1% de antibióticos. Las células se mantuvieron en placas de cultivo de 100 mm a 37°C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y 95% de aire, cambiando el medio cada 3-4 días hasta que las células alcanzaron una confluencia aproximada del 90%. Una vez alcanzada esta densidad, se removió el medio y se lavó con 2 mL de Tampón fosfato salino (PBS). Luego, las células se incubaron con 2 mL de tripsina-EDTA al 0,05% durante 10 min, para posteriormente centrifugarlas a 12.000 rcf por 5 min. Después se eliminó el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en una placa de cultivo.

5.5.3 Estimulación con Dexametasona

Para la estimulación con Dexametasona (SIGMA D2915-100mg), se pesaron 85,28 mg de dexametasona soluble en agua y se diluyó en 10 mL de PBS estéril para obtener una solución de 1 mM, se alicuotó en tubos eppendorf ámbar de 1.5 mL y se almacenó a 4°C para su posterior utilización. Se sembraron las células HepG2 en placas de cultivo de 35 mm con DMEM + 10% SFB, hasta que las células alcanzaron una confluencia aproximada al 80%. Una vez alcanzada la confluencia deseada, se lavó con PBS 1x estéril 3 veces y se colocó nuevo medio de cultivo. Se rocío con etanol (alcohol 70%) un tubo ámbar con el preparado de Dexametasona 1 mM y se dejó dentro de la campana. De este tubo de DEX 1 mM, 1 µL de Dex por 1 mL de medio nos dejará con un estímulo de 100 µM de DEX. Entonces, se incorporó 1 uL por cada 1 mL de medio, se incorporó al centro y se cerró la placa de cultivo, se movió suavemente y se rotuló escribiendo DEX, se dejaron las placas en el incubador por un período de estimulación de 24 h. Una vez terminado el estímulo se sacó la placa del incubador, se lavó fuera de la campana 3 veces con PBS frío.

5.5.4 Estimulación con Insulina

Para la estimulación con Insulina (SIGMA I0516-5mL (10 mg/ml)), se rociaron con etanol todos los implementos a utilizar para su preparación, entre estos una gradilla para tubos eppendorf de 200 μ L, 40 tubos eppendorf y finalmente la insulina que se guarda en refrigerador a 4°C, se ingresaron en la campana. Se tiene una solución stock de insulina de 1.722 mM, la cual llevaremos a una solución de trabajo de 166.7 μ M, para esto tomaremos 97 μ L de la solución stock y lo disolveremos en 1000 μ L de PBS 1x estéril en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Alicuotaremos en los tubos eppendorf de 200 μ L una cantidad de 25 μ L de la solución de trabajo (lo que dejará un total de 40 tubos eppendorf). Almacenaremos los tubos preparados dentro de un tubo falcon de 50 μ L a -20°C para su posterior utilización y se rotulará con la inscripción insulina. Para la estimulación, se sembraron las células HepG2 en placas de cultivo de 35 mm con DMEM + 10% SFB, hasta que las células alcanzaron una confluencia aproximada al 80%. Una vez alcanzada la confluencia deseada, se lavó con PBS 1x estéril 3 veces y se colocó DMEM sin SFB, ya que el suero interfiere en la señalización de insulina por poseer factores de crecimiento, entre otros. Luego para estimular, se tomó un tubo eppendorf de 25 μ L y se descongeló a temperatura ambiente. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se agregaron 980 μ L de PBS 1x. Del tubo de insulina ya descongelado se incorporaron 20 μ L y se disolvió en el tubo con PBS, se disgregó la solución para que se mezclará. Ahora, en mis placas a estimular incorporé 30 μ L de la mezcla preparada por cada mL de medio, para obtener una concentración de 100 nM. Después de estimular, lo que sobra del tubo preparado se debe botar. Se estimuló fuera de la campana por un período de 30 minutos, se cerró y rotuló la placa, se dejó en la incubadora por el tiempo indicado. Una vez terminado el estímulo, se sacó la placa del incubador, se lavó fuera de la campana 3 veces con PBS frío.

5.5.5 Estimulación con RU486

Para estimular con RU486 (SIGMA M8046), se deben pesar 42.96 mg de RU en balanza analítica en un tubo eppendorf. Bajo la campana agregar 100 μ L de DMSO y se debe resuspender. Luego, pasar el contenido a un tubo ámbar y rotular como

RU 10 mM, guardar a -20°C . Se sembraron las células HepG2 en placas de cultivo de 35 mm con DMEM + 10% SFB, hasta que las células alcanzaron una confluencia aproximada al 80%. Una vez alcanzada la confluencia deseada, se lavó con PBS 1x estéril 3 veces y se colocó nuevo medio de cultivo. Se roció con etanol (alcohol 70%) un tubo ámbar con el preparado de RU 10 mM y se dejó dentro de la campana. De este tubo se utilizó una concentración de 10 μM de RU por un período de tiempo de 24 horas. Después de estimular, se cerró y rotuló la placa como RU, se dejó en la incubadora por el tiempo indicado. Una vez terminado el estímulo, se sacó la placa del incubador, se lavó fuera de la campana 3 veces con PBS frío.

5.5.6 Transfección de Plásmido

Para la transfección se utilizó el protocolo con Lipofectamine® 2000, para esto se sembraron las células HepG2 en placas de cultivo de 35 mm con DMEM + 10% SFB, hasta que las células alcanzaron una confluencia aproximada al 60%. Una vez alcanzada esta densidad, 1 hora antes de transfectar se lavó con PBS 1x estéril y se cambió el medio normal a medio sin suero (ya que suero y antibióticos interfieren con la transfección) Opti-MEM (Thermo Fisher 31985062). Bajo la campana se preparó la mezcla de reactivos a utilizar para obtener una concentración de plásmido 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, compuesta por la Solución A (5 μg de DNA + 250 μL OptiMEM) que se dispuso en un tubo eppendorf de 1.5 mL y la Solución B (6 μL Lipofectamine + 250 μL OptiMEM) que también se dispuso en un tubo eppendorf de 1.5 mL, tubos que se resuspendieron de forma suave 3 veces y se dejaron incubar por 5 minutos dentro de la campana. Por otro lado, se dejó el OptiMEM en baño termoregulado a 37°C , ya que se utiliza nuevamente. Pasado los 5 minutos, se tomó el contenido del tubo con la solución B y se colocó en el tubo con la solución A, se resuspendió 3 veces de forma suave y se dejó incubando 20 minutos. Mientras pasa el tiempo de incubación, se lavaron los cultivos celulares 3 veces con PBS 1x estéril, se agregó a cada pocillo 500 μL de OptiMEM. Una vez transcurrido el tiempo de incubación del plásmido, se agregó de la mezcla 80 μL a cada pocillo, moviendo suavemente la placa para una mejor distribución de la mezcla de plásmido, luego se incubó por toda una noche, y por la mañana se aspiró el medio OptiMEM y se dejó con medio normal (DMEM + 10% FBS + A) por 3 horas para que las células se recuperan.

5.5.7 Cuantificación de proteínas

Luego de que se realizaron las estimulaciones en los cultivos, las células se lavaron 3 veces con PBS 1x frío (NaCl 137 mM (Winkler SO-1455); KCl 2,7 mM (Winkler PO-1260); Na₂HPO₄ 10 mM (Merk 106586); KH₂PO₄ 2 mM (Merk 104873); pH 7,4) sobre hielo para mantener frías las muestras, y se aspiró todo el volumen para evitar la dilución de la muestra. Se lisaron las muestras con 50 µL de buffer de lisis T-PER (Tissue Protein Extraction, Thermo Scientific 78510) que se encuentra alicuotado y guardado -20°C, este se encuentra suplementado con un inhibidor de fosfatasas (Roche 04906845001) y un inhibidor de proteasas (Roche 04693159001). Se procedió a raspar las placas con rastrillo para células, se extrajo el contenido de cada placa de cultivo transfiriendo el lisado a un tubo eppendorf. Las muestras se mantuvieron sobre hielo, luego se centrifugaron a 12.000 RPM por 10 min a 4°C para eliminar la fracción nuclear, donde se retiró el sobrenadante que fue traspasado a un nuevo tubo eppendorf y se descartó el pellet en cada ocasión. Para la cuantificación de proteínas se utilizará el Kit de análisis de proteínas BCA (Thermo Fisher 23227) siguiendo las indicaciones del fabricante. La solución de trabajo de BCA (ácido bicinconínico) se debe preparar en un tubo falcon de 15 o 50 mL dependiendo de las muestras que yo tenga para analizar. Se debe realizar una mezcla, donde en cada pocillo se debe incorporar 200 µL de BCA stock más 4 µL de sulfato de cobre por muestra, entonces según mi número de muestras a cuantificar debo calcularlo. Luego en el tubo se debe incorporar BCA primero y luego el cúprico, mezclar 3 veces y dejarlo en hielo. Ahora, en una placa de 96 pocillos se agregan 2 µL de muestra, 200 µL de la solución de trabajo y 23 µL de buffer de lisis (T-PER sin inhibidor de proteasas y fosfatasas) por duplicado para cada muestra y para el blanco se agregan 200 µL de solución de trabajo y 25 µL de buffer de lisis. Incubar la placa por 30 minutos a 37°C envuelta en alusa foil. Finalmente, medir la absorbancia de las muestras en espectrofotómetro a 562 nm. Se diseñó una curva de calibración para los cultivos celulares cada un mes, donde se pesó 2 mg de albúmina en polvo (almacenada a 4°C) en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se diluyó en 1 mL de agua destilada y se eligieron los puntos de calibración 0-0.5-1.0-1.5-2.0, donde utilizando el protocolo de 200 µL de solución de trabajo BCA más 25 µL se

midió la absorbancia (562 nm) de cada punto con cada concentración conocida de albúmina y se realizó por duplicado. Se determinó en una hoja de cálculo Excel el promedio de duplicados y se restaron los blancos, se graficó la curva de calibración para obtener la ecuación de la recta y con esta poder conocer la concentración de proteínas de cada muestra.

5.5.8 Western Blot

Las muestras fueron llevadas a un volumen final de 100 μ L y 3,5 μ g/ μ L concentración de proteínas que contiene la muestra de células, en buffer de carga amortiguador SDS-PAGE 5% de gel concentrador y 10% de gel separador. Luego, se deben desnaturar las muestras por 5 minutos a 95°C en placa calefactora. Las proteínas se separan en base a su masa molecular por medio de electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10 o 12%, según corresponda, los cuales se cargaron con alrededor de 30 μ g de extracto de proteínas, y se realiza la migración de las proteínas en la cámara de Western Blot Bio-Rad® (Mini-Vertical PAGE/Blotting System, California, USA) a 80 V constante. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfieren a una membrana de PVDF previamente activada con metanol, luego se programa el equipo Transblot (BioRad, Hercules, Ca, EEUU) según el peso molecular de la proteína de interés. Posteriormente, se agrega solución de bloqueo (5% de leche semidescremada en TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente y se elimina la solución de bloqueo. Se incubaba con anticuerpo primario según mi proteína de interés se utilizaron los siguientes anticuerpos: FKBP51 (1:1000, #12210S, Cell Signaling), G6P (1:500, #83690, Abcam), PEPCK1 (1:1000, #12940, Cell Signaling), Phospho-Akt Ser⁴⁷³ (1:1000, #9271, Cell Signaling), Akt-T (1:1000, #9272, Cell Signaling) y GAPDH (1:5000, #MAB374, Sigma) a 4°C en agitación durante toda la noche. Luego, la membrana se lavó con 3 veces TBS-T y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (1:5.000, #402335, Calbiochem) o anti-IgG de conejo (1:5.000, #401315, Calbiochem) según corresponda. Una vez incubada la membrana, prepararse para revelarla. En un tubo eppendorf de 2 mL agregar soluciones quimioluminiscentes, realizar mezcla de solución A (BI 20-500-1000A) y B (BI 20-500-1000B) (4°C), 1 mL cada uno. Colocar

membrana y agregar la mezcla (1:1 de A:B). La intensidad de la banda es determinada por C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR, USA) y se cuantifica a través del software Image Studio Lite.

5.6 Análisis estadístico

Se realizaron entre 3 a 5 experimentos independientes, donde todos los datos son presentados como media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un análisis estadístico por ANOVA de una vía, seguido de un test post-hoc de Tukey. Se determinó un nivel de significancia estadística con un valor $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 7.0, San Diego, CA, USA.

6. RESULTADOS

La presente tesis estudió el efecto de la inducción de la proteína de respuesta al estrés FKBP51 por glucocorticoides sobre la señalización de insulina hepática en la línea celular HepG2.

Para estudiar el efecto de los glucocorticoides en la expresión de la proteína FKBP51, las células fueron expuestas a condición control (CO) o al agonista del receptor de glucocorticoides (GR) sintético dexametasona por 24 h a una dosis de 1 μ M (DEX) o en presencia del antagonista del GR RU486 por 24 h a una dosis de 10 μ M (RU) o a la combinación de dexametasona y RU486 (DEX+RU) (**Figura 2**). Se evaluó la expresión de las proteínas FKBP51, PEPCK1, G6P y GAPDH en células hepáticas HepG2 mediante Western blot (**Fig. 2A**). En los resultados se observa un aumento significativo del nivel de la proteína de estrés FKBP51 en presencia de dexametasona ($p < 0.0001$) (**Fig. 2B**). Sin embargo, dexametasona no modificó los niveles proteicos de las proteínas G6P y PEPCK1 (**Fig. 2C-D**). También, se evidencia que la expresión de FKBP51 es inducida por la activación del GR, ya que el uso de RU486 previene el aumento de expresión de FKBP51 inducido por dexametasona (**Fig. 2B**). En resumen, los resultados indican que el GC sintético dexametasona logra aumentar de forma significativa la expresión de la proteína FKBP51 a través del GR, aumento que es capaz de ser prevenido por el uso del antagonista RU486.

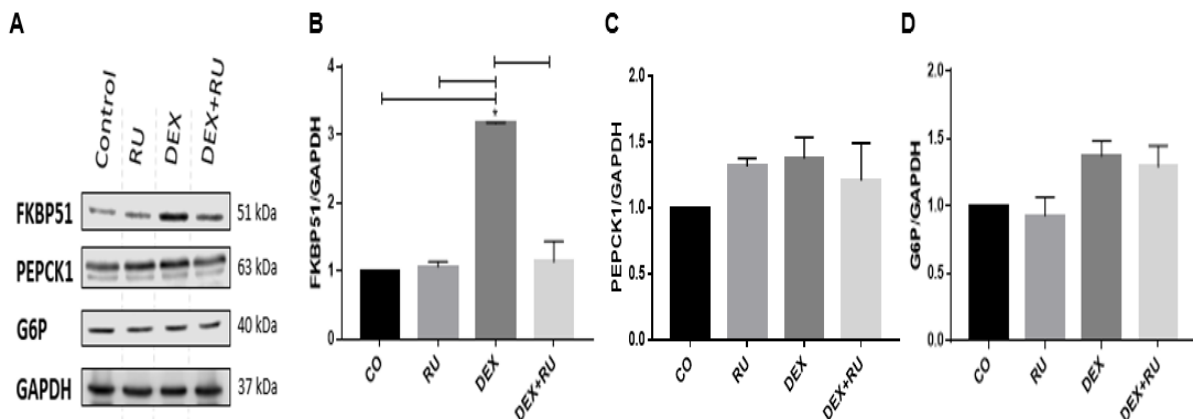


Figura 2. Los GCs aumentan la expresión de FKBP51 a través del GR. (A) Western Blot representativos de los niveles de PEPCK1, FKBP51, G6P y GAPDH en los lisados de células HepG2, expuestas a dosis de 10 μ M de RU486 (antagonista del GR), en presencia y ausencia de 1 μ M de DEX estimuladas por 24 h. **(B,C,D)** Cuantificaciones de los Western Blot mostrados en A. Datos expresados como promedio \pm EEM. ANOVA de una vía, post Hoc de Tukey's. * $p < 0.0001$ n=3-5.

En relación con la señalización de insulina se determinó si la expresión de FKBP51 afecta la respuesta de insulina. En este sentido, se determinaron los niveles proteicos de las proteínas FKBP51, la forma fosforilada y total de Akt y GAPDH en células hepáticas HepG2 mediante Western blot (**Fig. 3A**), las que fueron expuestas a condición control (CO) o insulina estimuladas en los 30 minutos finales con una concentración de 100 nM (INS) o al agonista del GR dexametasona estimuladas por 24 h a una dosis de 1 μ M (DEX) o expuestas a dexametasona 1 μ M por 24 h y en los 30 min finales con insulina 100 nM (DEX+INS) (**Figura 3**). Los resultados muestran que el incremento de la fosforilación de Akt inducida por insulina se ve significativamente disminuida en presencia de dexametasona ($p < 0.0001$) (**Fig. 3C**), esto asociado a un aumento significativo en los niveles de la proteína FKBP51 ($p < 0.0001$) (**Fig. 3B**), lo que muestra que el aumento de la proteína FKBP51 es concomitante con una menor señalización de insulina en las células HepG2.

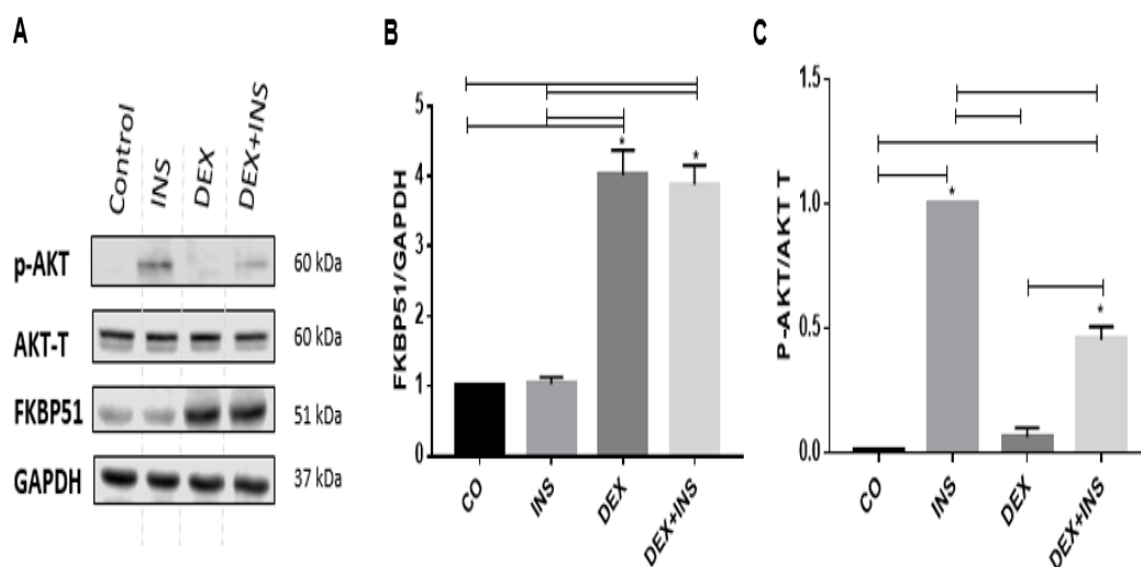


Figura 3. Los glucocorticoides inducen desensibilización del receptor de insulina coincidente con un aumento de la expresión de FKBP51. (A) Western Blot representativos de los niveles de p-AKT, AKT-T, FKBP51 y GAPDH en los lisados de células HepG2, expuestas a dosis de 100 nM de insulina por 30 minutos finales, en presencia y ausencia de dexametasona (1 μ M por 24 h). **(B, C)** Cuantificaciones de los Western Blot mostrados en A. Datos expresados como promedio \pm EEM. ANOVA de una vía, post Hoc de Tukey's. * $p < 0.0001$ n=4.

Por otra parte, para determinar el efecto de la proteína FKBP51 sobre la señalización de insulina independiente de otros efectos inducidos por dexametasona, se realizó la sobreexpresión de FKBP51 mediante la transfección del plasmidio FKBP5 Myc-DDK-tagged y se utilizó como control la transfección del plasmidio pCMV6-vacío. Para corroborar si la transfección del plasmidio aumentó los niveles de FKBP51, se determinaron los niveles de FKBP51 por Western blot (**Fig. 4A**). Para evaluar el efecto sobre la señalización de insulina, las células transfectadas fueron estimuladas con insulina y se determinó la forma fosforilada y total de Akt por Western blot (**Fig. 4B**). Los resultados muestran que la sobreexpresión de FKBP51 induce una disminución significativa en la respuesta a insulina determinada por la fosforilación de Akt ($p < 0.008$) (**Fig. 4B**).

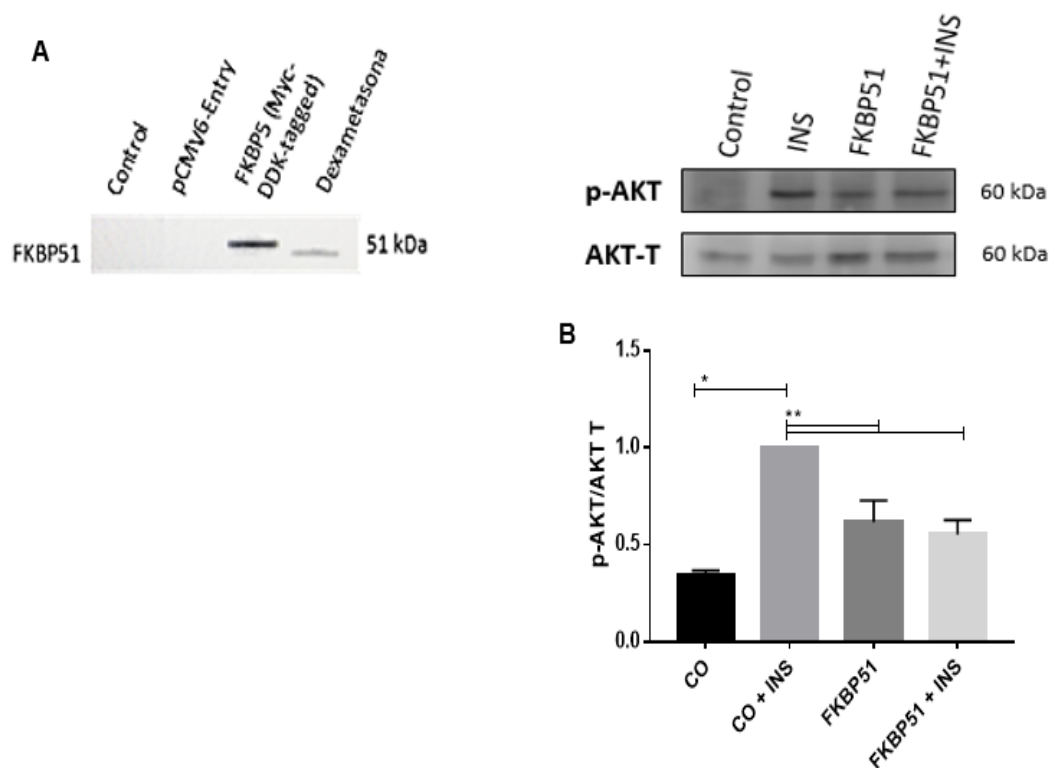


Figura 4. La sobreexpresión de FKBP51 induce una disminución en la respuesta a insulina. Sobreexpresión de la proteína FKBP51 mediante la transfección de un plasmidio (FKBP5 Myc-DDK-tagged). **(A)** Western Blot representativos de los niveles de p-AKT y AKT-T en los lisados de células HepG2. **(B)** Cuantificaciones de los Western Blot mostrados en A. Datos expresados como promedio \pm EEM. ANOVA de una vía, post Hoc de Tukey's. * $p < 0.0001$ ** $p < 0.05$ $n = 4$.

7. DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado las consecuencias fisiopatológicas de los niveles plasmáticos elevados de GCs en el organismo (45,46). El estrés crónico es un factor de riesgo importante para la obesidad y las enfermedades metabólicas. En este sentido, los GCs se utilizan ampliamente como tratamiento en la práctica clínica de trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunitarias y estrés. La exposición crónica a GCs produce una mala adaptación metabólica y consecuentemente una desregulación homeostática de la glucosa. Además, en humanos aumenta la ingesta de alimentos causando obesidad lo que altera la composición corporal, incluyendo la expansión de los depósitos de tejido adiposo, alteración del metabolismo y acción de la insulina, eventos que producen hiperglucemia y dislipidemia. Los GCs inducen liberación sustratos energéticos y así asegurar su disponibilidad para la oxidación mitocondrial durante el estrés, donde mejora la degradación de proteínas musculares, la lipólisis del tejido adiposo, la gluconeogénesis hepática y la reducción de la utilización de glucosa, efectos que elevan las concentraciones de glucosa circulante. Por lo que, estas vías metabólicas conducen a un depósito excesivo de triglicéridos hepáticos (47,48). Asimismo, NAFLD proviene de un desequilibrio entre síntesis, catabolismo y transporte de TAG. El influjo excesivo de ácidos grasos hacia el hígado y la RI juegan un papel fundamental en la patogénesis de NAFLD (8-11). NAFLD se asocia a los diferentes componentes del síndrome metabólico especialmente obesidad, DT2, RI y dislipidemia, de manera que es considerado como el componente hepático y está aumentando en todo el mundo en paralelo con el incremento de estas enfermedades (1,2,10). Estos antecedentes nos llevaron a la investigación del vínculo entre la proteína de respuesta a estrés FKBP51 y el metabolismo de carbohidratos, a través de la cascada de señalización de la insulina. Sobre estas bases, el objetivo principal de esta tesis fue evaluar si la inducción de FKBP51 por GCs producía desensibilización en la señalización de la insulina hepática.

El primer resultado obtenido fue el efecto de los GCs en la expresión de la proteína FKBP51, que demostró una asociación significativa entre la exposición al GC dexametasona y el aumento en la expresión de la proteína de estrés FKBP51 en

células HepG2. Este resultado está en concordancia con el de otros estudios, donde se ha descrito que los GCs aumentan la expresión de la proteína FKBP51 (49,50). Un estudio demostró que el tratamiento con dexametasona produce una inducción mucho más prominente de la expresión de FKBP51 en tejidos donde su expresión basal es típicamente baja, como el núcleo paraventricular hipotalámico o la amígdala central (51). De igual modo, otro estudio demostró que el ARNm de FKBP51 está regulado positivamente en la corteza, hipocampo, amígdala e hipotálamo de ratones, a 4 y 8 h después de la estimulación con dexametasona (52). También, en otro estudio se encontró que la expresión del gen de FKBP51 en tejido pulmonar aumentó marcadamente después del tratamiento con dexametasona en un modelo murino de asma (53). Del mismo modo, en otro estudio la exposición a la dexametasona demostró la expresión de FKBP51 en el tejido adiposo subcutáneo y omental (37). Concordantemente, se demostró que animales expuestos a un procedimiento de estrés crónico mostraban una alteración un aumento del GR y FKBP51 (54).

Para determinar si la expresión de la proteína FKBP51 es inducida por la activación del GR, se demostró que el uso del antagonista del GR RU486 (mifepristona) previno el aumento de la expresión de la proteína FKBP51 inducido por dexametasona en células HepG2. El antagonismo del GR con RU486 se ha utilizado en pacientes con síndrome de Cushing, mejorando la hiperglicemia, la RI y disminuyendo la adiposidad en estos sujetos (55,56). En otro estudio, se evidenció que el tratamiento con RU486 en ratas pudo normalizar los parámetros inducidos por el estrés crónico (57). Asimismo, se sabe que FKBP51 al regular negativamente GR reduce la unión de GCs, se retrasa la traslocación nuclear y en consecuencia se disminuye la actividad transcripcional dependiente de GR (58). En este sentido, los efectos de FKBP51 sobre la señalización de GR tienen implicaciones importantes para la regulación de la respuesta al estrés, ya que GR media la terminación de la respuesta al estrés. Por esto, niveles más altos de ARNm de FKBP51 se asocian con niveles más altos de cortisol circulante y una inhibición por retroalimentación negativa reducida de la respuesta al estrés (59). En este estudio, hemos mostrado que en la línea celular HepG2 la proteína de estrés FKBP51

aumenta su expresión en respuesta al GC sintético dexametasona mediante la activación del GR.

Posteriormente, con el antecedente de que la unión GC-GR activa la expresión de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos, entre los que se encuentran los genes de las enzimas PEPCK1 y G6P, enzimas claves que regulan la gluconeogénesis. Quisimos determinar si la expresión de ambas proteínas eran inducidas por el GC sintético dexametasona, donde se demostró que dexametasona no modificó significativamente ni los niveles proteícos de PEPCK1 y tampoco de la proteína G6P en células HepG2. También, quisimos determinar si la expresión de las proteínas PEPCK1 y G6P eran inducidas por la activación del GR, se demostró que no hubieron diferencias significativas en ambas proteínas. Nuestros resultados difieren con la literatura, en donde un estudio nos muestra que los GCs estimulan la gluconeogénesis mediante la inducción de PEPCK1 y G6P (48). Asimismo, en otro estudio realizado en tejido de ratón donde se analizó la expresión de las proteínas PEPCK1 y G6P, se evidenció que ambas proteínas se expresaron más en el grupo tratado con dexametasona que en el grupo control ($p < 0.01$) (60). Igualmente en otro estudio, se demostró que los GCs activan la transcripción de las enzimas PEPCK1 y G6P (61).

Ahora, basándonos en el hallazgo de que la proteína FKBP51 actúa como regulador negativo de la Akt, un nodo central de la vía de señalización de la insulina (40), examinamos la cascada de señalización de la insulina hepática, donde encontramos que la inducción de la proteína FKBP51 por dexametasona se asocia a una disminución de la fosforilación de Akt inducida por insulina. En contraste, un estudio mostró que la proteína FKBP51 regula el metabolismo de la glucosa en ratones, a través de la regulación de la señalización de AKT2-AS160, la expresión del transportador de glucosa y la captación de glucosa en miotubos (42). Puesto que, es bien sabido que la vía de señalización de Akt es un actor fundamental en el control de la función celular y su actividad puede ser modulada por el estado de fosforilación de dos sitios Ser⁴⁷³ y Thr³⁰⁸, en un estudio se mostró que FKBP51 regula la actividad de Akt y funciona interfiriendo con su fosforilación a través de un mecanismo de andamiaje (40,62). Como se sabe, la actividad de Akt está

estrictamente regulada en condiciones normales; Sin embargo, en otro estudio se demostró que la proteína FKBP51 a través de múltiples dominios interactúa con la quinasa Akt en un modelo celular HEK293 (63). Para determinar si FKBP51 disminuye la señalización de insulina en las células HepG2, sobreexpresamos la proteína FKBP51 y observamos una disminución a la respuesta a insulina en las células HepG2. Por lo tanto, la presencia de GCs disminuye la respuesta de insulina, lo que indica que el aumento de la proteína de respuesta a estrés FKBP51 podría afectar la vía de señalización de la insulina en células HepG2.

Sin embargo, existen experimentos que no fueron posibles de realizar, debido a diversas circunstancias no se pudieron llevar a cabo. Estos nos hubieran permitido tener un panorama más específico acerca de los efectos inducidos por los GCs. Uno de ellos era probar el inhibidor químico selectivo SAFit2, para saber si los efectos inducidos por el GC dexametasona eran dependientes de la proteína FKBP51. En relación a lo expuesto, es importante decir que el antagonista del GR SAFit2 tiene una alta selectividad para FKBP51 (43). En este contexto, un estudio sugirió que el inhibidor selectivo SAFit2 modula la regulación de FKBP51 a través de la sensibilidad de GR, donde la inhibición farmacológica de FKBP51 protege del aumento de peso inducido por una dieta alta en grasas y además muestran una mejor tolerancia a la glucosa (43,64). Además, se sabe que la proteína FKBP51 es un regulador negativo de la vía de señalización del GR que regula el circuito de retroalimentación de GCs inducido por el estrés (25-27,65). Por esto, en otro estudio realizado en un modelo de ratón se utilizó la inhibición farmacológica selectiva de FKBP51 con SAFit2, donde se mostró reducción del consumo de alcohol y sus efectos (66).

La insulina es una hormona clave que controla la homeostasis de la glucosa, por lo que, un experimento relevante por hacer, sería profundizar en la respuesta de la insulina sobre la producción hepática de glucosa (HGP), que nos entregaría un mejor panorama de la acción de insulina sobre la regulación del metabolismo de la glucosa en las células hepáticas. En este sentido, un estudio en modelo animal nos muestra que la delección del receptor de insulina hepático conduce a intolerancia a la glucosa y RI en ratones. Como sabemos, en el hígado la insulina suprime la

gluconeogénesis al inhibir las transcripciones de los genes PEPCK1 y G6P. Por consiguiente, la pérdida genética de la insulina hepática es esencial para la regulación del metabolismo de la glucosa (14,67).

Finalmente, el estudio de FKBP51 como vínculo molecular entre el estrés y los trastornos metabólicos es importante, debido a recientes estudios que señalan la participación de esta proteína como un objetivo terapéutico prometedor para el tratamiento de comorbilidades relacionadas tanto con el estrés y los trastornos psiquiátricos y problemas metabólicos relacionados con la obesidad, como la hiperglucemia, RI, diabetes tipo 2, hipertensión, dislipidemia y NAFLD (68). Con estos resultados iniciales podemos sugerir un efecto de FKBP51 sobre la señalización hepática de insulina, donde su aumento se relacionó a una disminución en la respuesta a insulina. En conjunto, estos datos son los primeros en implicar a FKBP51 en la regulación de la señalización de la respuesta de insulina en células HepG2.

8. CONCLUSIÓN

En este trabajo se evaluó si la inducción de la proteína de respuesta a estrés FKBP51 por GC se asocia a desensibilización en la señalización de insulina en la línea celular hepática HepG2. Con los antecedentes expuestos y los resultados obtenidos, podemos concluir que:

- El GC dexametasona agonista del GR, es capaz de aumentar la expresión de la proteína de respuesta a estrés FKBP51 mediante la activación del GR en células HepG2.
- El aumento en los niveles de la proteína FKBP51 inducido por dexametasona es coincidente con la disminución de la fosforilación de Akt.
- Al no poseer resultados del inhibidor químico selectivo para FKBP51 “SAFit2”, no es posible señalar que los efectos inducidos por dexametasona en la respuesta a insulina sean dependientes de la proteína FKBP51.
- La sobreexpresión de FKBP51 indujo una disminución en la respuesta a insulina mediante la p-Akt, por tanto FKBP51 induce desensibilización en la señalización de insulina hepática.

En conclusión, hemos demostrado que el aumento de la proteína de estrés FKBP51 a través de la sobreexpresión se relaciona con una desensibilización en la señalización de insulina en la línea celular hepática HepG2.

9. REFERENCIAS

1. Llorenç Caballería Rovira, Irfan Majeed, Alba Martínez Escudé, Ingrid Arteaga Pillasagua, y Pere Torán Monserrat. Esteatosis hepática: diagnóstico y seguimiento. 2017;24(7):378-89.
2. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64(1):73-84.
3. Rohit Loomba y Arun J. Sanyal. The global NAFLD epidemic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2013;10(11):686–90.
4. Zobair Younossi, Quentin M. Anstee, Milena Marietti, Timothy Hardy, Linda Henry, Mohammed Eslam, Jacob George and Elisabetta Bugianesi. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterol Hepatol* 2018;15(1):11-20.
5. Riquelme A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and its association with obesity, insulin resistance and increased serum levels of C-reactive protein in Hispanics. *Liver Int* 2009;29(1):82-88.
6. MINSAL. Encuesta Nacional De Salud 2016-2017. Primeros resultados. 2017.
7. Hardy T, Oakley F, Anstee QM, Day CP. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2016;11:451-96.
8. Ahmed M. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015. *World J Hepatol* 2015;7(11):1450-9.
9. Arab JP, Arrese M, Trauner M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2018;13(1):321-50.
10. Manne, V., Handa, P., & Kowdley, K. V. Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease* 2018;22(1):23-37.
11. Liu, W., Baker, R. D., Bhatia, T., Zhu, L., & Baker, S. S. (2016). Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2016;73(10):1969–87.

12. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 2005;26(2):19-39.
13. Szosland K, Lewinski A. Insulin resistance - "the good or the bad and ugly". *Neuro Endocrinol Lett* 2018;39(5):355-62.
14. Mendivil CO, & Sierra, ID. Insulin action and resistance: molecular aspects. *Revista de la Facultad de Medicina* 2005;53(4):235-43.
15. Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 1999;103(7):931-43.
16. Le Roith D, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 2001;24(3):588-97.
17. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 2017;169(3):381-405.
18. Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol* 2014;220(2):T1-23.
19. Haeusler, R.A., McGraw, T.E., & Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2017;19(1):31-44.
20. Paul M. Titchenell., Qingwei Chu., Bobby R. Monks & Morris J. Birnbaum. Hepatic insulin signalling is dispensable for suppression of glucose output by insulin in vivo. *Nature Communications* 2015;6:7078.
21. Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* 2008;7(2):95-6.
22. Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A, Kovacs P, Schön MR, Kern M, Stumvoll M, Blüher M. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299(3):506-15.
23. Oakley R, Cidlowski J. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoid. *J Biol Chem* 2011;286(5):3177–3184.
24. Kadmiel, M., & Cidlowski, J. A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 2013;34(9):518–530.

25. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am* 2016;42(1):15-31.
26. Magomedova, L. & C.L. Cummins. Glucocorticoids and Metabolic Control. *Handb Exp Pharmacol* 2016;233:73-93.
27. Rose, A.J., & Herzig, S. Metabolic control through glucocorticoid hormones: An update. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2013;380(1-2):65–78.
28. Vander Kooi, B.T., et al., The glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter contains both positive and negative glucocorticoid response elements. *Mol Endocrinol* 2005;19(12):3001-22.
29. Zhou, P.Z., et al., Relationship Between Glucocorticoids and Insulin Resistance in Healthy Individuals. *Med Sci Monit* 2016;22:1887-94.
30. Abulizi A., Camporez J-P., Jurczak M.J., Høyer K.F., Zhang D., Cline G.W., Vatner D.F. Adipose glucocorticoid action influences whole-body metabolism via modulation of hepatic insulin action. *The FASEB Journal* 2019.
31. Zheng Z, Zhang C, Zhang K. Role of unfolded protein response in lipogenesis. *World J Hepatol* 2010;(6):203-7.
32. Hubel, J.M., et al., Influence of plasma cortisol and other laboratory parameters on nonalcoholic Fatty liver disease. *Horm Metab Res* 2015;47(7):479-84.
33. Targher, G., et al., Associations between liver histology and cortisol secretion in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64(3):337-41.
34. Kumar, R. and E.B. Thompson. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2005;94(5):383-394.
35. Harrell, J.M., et al., Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279(52):54647-54654.
36. Duma, D., C.M. Jewell, and J.A. Cidlowski, Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;102(1-5):11-21.
37. Pereira, M.J., et al. FKBP5 expression in human adipose tissue increases following dexamethasone exposure and is associated with insulin resistance. *Metabolism* 2014;63(9):1198-208.
38. Fries, G.R., Gassen N.C., and Rein T. The FKBP51 Glucocorticoid Receptor Co-Chaperone: Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2017;18(12):2614.
39. Bali, U., et al. FKBP5 mRNA Expression Is a Biomarker for GR Antagonism. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101(11):4305-12.

40. Hartmann, J., et al. The involvement of FK506-binding protein 51 (FKBP5) in the behavioral and neuroendocrine effects of chronic social defeat stress. *Neuropharmacology* 2012;62:332-339.
41. Pei, H., et al. FKBP51 affects cancer cell response to chemotherapy by negatively regulating Akt. *Cancer Cell* 2009;16:259-266.
42. Stechschulte, L.A., et al. FKBP51 Null Mice Are Resistant to Diet-Induced Obesity and the PPAR gamma Agonist Rosiglitazone. *Endocrinology* 2016;157(10):3888-3900.
43. Balsevich, G., et al. Stress-responsive FKBP51 regulates AKT2-AS160 signaling and metabolic function. *Nat Commun* 2017;8(1):1725.
44. Gaali, S., et al. Selective inhibitors of the FK506-binding protein 51 by induced fit. *Nat Chem Biol* 2015;11(1):33–37.
45. Amatruda JM, Livingston JN, Lockwood DH. Cellular mechanisms in selected states of insulin resistance: human obesity, glucocorticoid excess and chronic renal failure. *Diabetes Metab Rev* 1985;1(3):293–317.
46. Cain DW, Cidlowski JA. Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015;29(4):545-56.
47. Rahimi L, Rajpal A, Ismail-Beigi F. Glucocorticoid-Induced Fatty Liver Disease. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2020;13:1133-1145.
48. Geer, E. B., Islam, J., & Buettner, C. Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 2014;43(1):75–102.
49. Vermeer H, Hendriks-Stegeman BI, van der Burg B, van Buul-Offers SC, Jansen M. Glucocorticoid-induced increase in lymphocytic FKBP51 messenger ribonucleic acid expression: a potential marker for glucocorticoid sensitivity, potency, and bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(1):277-84.
50. Reynolds PD, Roveda KP, Tucker JA, Moore CM, Valentine DL, Scammell JG. Glucocorticoid-resistant B-lymphoblast cell line derived from the Bolivian squirrel monkey (*Saimiri boliviensis boliviensis*). *Lab Anim Sci* 1998;48(4):364-70.
51. Galat, A. A note on clustering the functionally related paralogues and orthologues of proteins: A case of the FK506-binding proteins (FKBPs). *Comput Biol Chem* 2004;28:129–140.
52. Elisabeth B. Binder. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34:186-195.
53. Eunyong Chun, et al. Dexamethasone-Induced FKBP51 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells Could Play a Role in Predicting the Response of Asthmatics to Treatment with Corticosteroids. *Journal of Clinical Immunology* 2011;31(1):122-7.
54. Guidotti, G., Calabrese, F., Anacker, C., Racagni, G., Pariante, C. M., & Riva, M. A. Glucocorticoid receptor and FKBP5 expression is altered following exposure to chronic stress: modulation by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology* 2013;38(4):616–627.

55. Maria Fleseriu, et al. Mifepristone, a glucocorticoid receptor antagonist, produces clinical and metabolic benefits in patients with cushing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2012;97(6):2039–2049.
56. Castinetti F, Conte-Devolx B, Brue T. Medical treatment of Cushing's syndrome: glucocorticoid receptor antagonists and mifepristone. *Neuroendocrinology* 2010;92(1):125-30.
57. Jinlan Ding, et al. Effects of RU486 treatment after single prolonged stress depend on the post-stress interval. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2020.
58. Wesley B. Denny, Donna L. Valentine, Philip D. Reynolds, David F. Smith, Jonathan G. Scammell. Squirrel Monkey Immunophilin FKBP51 Is a Potent Inhibitor of Glucocorticoid Receptor Binding. *Endocrinology* 2000;141(11):4107–13.
59. Binder EB, Bradley RG, Liu W, et al. Association of FKBP5 Polymorphisms and Childhood Abuse With Risk of Posttraumatic Stress Disorder Symptoms in Adults. *JAMA* 2008;299(11):1291–1305.
60. Shang F, et al. The anti-angiogenic effect of dexamethasone in a murine hepatocellular carcinoma model by augmentation of gluconeogenesis pathway in malignant cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;77(5):1087-96.
61. Xu H, et al. Dual specificity MAPK phosphatase 3 activates PEPCK gene transcription and increases gluconeogenesis in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 2005;280(43):36013-8.
62. Wang L. FKBP51 regulation of AKT/protein kinase B phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11(4):360-4.
63. Anne-Katrin Fabian, et al. InterAKTions with FKBP5 - Mutational and Pharmacological Exploration. *PLoS One* 2013;8(2).
64. Maiarù, M., et al. The stress regulator FKBP51: a novel and promising druggable target for the treatment of persistent pain states across sexes. *Pain* 2018;159(7):1224–1234.
65. Grad I, Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol* 2007;15:275(1-2):2-12.
66. Loretta König, et al. The selective FKBP51 inhibitor SAFit2 reduces alcohol consumption and reinstatement of conditioned alcohol effects in mice. *Addiction Biology* 2020;25(3).
67. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 2000;6(1):87-97.
68. Alexander S.H., et al. Focus on FKBP51: A molecular link between stress and metabolic disorders. *Molecular Metabolism* 2019;29:170-181.

10. ANEXOS

Anexo 1. Prevalencia mundial estimada de NAFLD (%).

