



Universidad de Valladolid

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA

TESIS DOCTORAL:

**Papel de la enzima
degradadora de insulina (IDE)
en el metabolismo hepático**

Presentada por PATRICIA CÁMARA TORRES
para optar al grado de
Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Germán Perdomo Hernández
Dr. Andrés Alonso García

Valladolid
2024

FINANCIACIÓN

Esta investigación se desarrolló en el Instituto de Biomedicina y Genética Molecular de Valladolid (IBGM) en cooperación con la Universidad de Valladolid (UVa). Esta investigación ha sido financiada por:

- Proyectos del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.
MCIN/AEI/10.13039/501100011033 “ERDF A way of making Europe”.
PID2019-110496RB-C21, PID2022-136605OB-C21
PID2019-110496RB-C22, PID2022-136605OB-C22

- Universidad de Valladolid.
Contrato predoctoral 2020 cofinanciado por el Banco Santander.

- Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes (EASD)
Beca de transporte 60º Congreso Anual EASD.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	9
2. RESUMEN	13
3. INTRODUCCIÓN	17
3.1 DIABETES MELLITUS	19
3.1.1 Clasificación de la Diabetes.....	19
3.2 METABOLISMO HEPÁTICO	21
3.2.1 Homeostasis de la glucosa	21
3.2.2 Homeostasis de la glucosa y Diabetes Mellitus Tipo 2.....	23
3.2.3 Regulación hormonal en el metabolismo hepático	24
3.3 MITOCONDRIA	29
3.3.1 Estructura mitocondrial.....	30
3.3.2 Ciclo de Krebs	31
3.3.3 Cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa: ETC y OXPHOS	33
3.3.4 Dinámica mitocondrial	35
3.3.5 Citoesqueleto y retículo endoplásmico.....	40
3.4 ENZIMA DEGRADADORA DE INSULINA (IDE)	42
3.4.1 Estructura y localización.....	43
3.4.2 Isoformas de IDE.....	45
3.4.3 Funciones de IDE.....	46
3.4.4 IDE en la progresión de Diabetes Mellitus Tipo 2.....	47
3.4.5 Modelos preclínicos	48
3.4.6 IDE como diana farmacológica	53
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
4.1 HIPÓTESIS	59
4.2 OBJETIVOS	59
5. MATERIAL Y MÉTODOS	61
5.1 ANIMALES EXPERIMENTALES	63
5.1.1 Instalaciones animales	63
5.1.2 Modelos animales	63
5.1.3 Genotipado de ratones	64
5.1.4 Aislamiento de hepatocitos	65

5.2 CULTIVOS CELULARES	66
5.2.1 Línea celular HepG2.....	66
5.2.2 Línea celular AML12.....	67
5.2.3 Hepatocitos primarios.....	67
5.3 GENERACIÓN DE HepG2-IDE-KO	67
5.3.1 Diseño de RNA guías.....	69
5.3.2 Diseño del plásmido donante.....	69
5.3.3 Selección de clones editados.....	71
5.4 AML12-shRNA-IDE	71
5.5 ENSAYOS CELULARES	73
5.5.1 Transfección celular.....	73
5.5.2 Estimulación con insulina.....	75
5.5.3 Estimulación con glucagón.....	75
5.6 BIOLOGÍA MOLECULAR	75
5.6.1 Vectores plasmídicos.....	75
5.6.2 PCR cuantitativa.....	79
5.6.3 Digestión enzimática.....	79
5.6.4 Ligación.....	80
5.6.5 Transformación bacteriana.....	81
5.6.6 Extracción de plásmido en bacterias.....	82
5.7 CLONACIÓN DE GFP-IDE	82
5.7.1 Generación del vector recombinante.....	82
5.7.2 Mutagénesis dirigida de la isoforma mitocondrial de IDE.....	85
5.8 PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL	86
5.8.1 Purificación de ARN.....	86
5.8.2 Síntesis de ADNc.....	87
5.8.3 qPCR.....	87
5.9 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE IDE	88
5.10 ESTUDIO METABÓLICO EN TIEMPO REAL	89
5.11 ANÁLISIS PROTEICO POR WESTERN BLOT	91
5.11.1 Extracción de proteínas.....	91
5.11.2 Electroforesis y Western Blot.....	92
5.12 MICROSCOPIA CONFOCAL	93
5.13 ANÁLISIS de MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL	94
5.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	94

6. RESULTADOS	97
6.1 CRISPR/CAS9 EN HEPG2.....	99
6.2 CLONACIÓN DE IDE	101
6.2.1 Vectores recombinantes de IDE.....	101
6.2.2 Mutagénesis dirigida en la isoforma mitocondrial de IDE.....	106
6.3 SEÑALIZACIÓN DE INSULINA.....	109
6.3.1 HepG2-IDE-KO.....	109
6.3.2 Reconstitución de IDE en HepG2-IDE-KO	111
6.4 SEÑALIZACIÓN DE GLUCAGON.....	113
6.4.1 Acción del glucagón en la generación de ATP	113
6.4.2 Expresión de genes gluconeogénicos.....	114
6.4.3 Producción de glucosa	116
6.5 BIOENERGÉTICA EN HEPATOCITOS.....	117
6.5.1 Estudio metabolómico	117
6.5.2 Actividad mitocondrial.....	119
6.5.1 Reconstitución de IDE	121
6.5.2 Expresión de complejos de la ETC y OXPHOS.....	125
6.5.3 Estudio transcriptómico	127
6.6 MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL.....	129
6.6.1 Estudio de histomorfometría mitocondrial.....	129
6.6.2 Estudio de la maquinaria proteica.....	135
7. DISCUSIÓN	137
8. CONCLUSIONES	163
9. BIBLIOGRAFÍA	167

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AC	Adenilato ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Proteína quinasa B
Alb-Cre	Albumina-Cre
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
cADN	ADN complementario
CaM	Calmodulina
CEACAM1	Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario
CPT-I	Carnitina palmitoiltransferasa I
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
DM	Diabetes Mellitus
DM1 / DM2	Diabetes Mellitus Tipo 1 / Tipo 2
DPP-4	Dipeptidil peptidasa-4
Drp1	Proteína 1 relacionada con la dinamina (
ECAR	Tasa de acidificación extracelular
ETC	Cadena de transporte de electrones
FADH2	Dinucleótido de flavina y adenina
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
Fis1	Proteína de fisión 1
G6P	Glucosa-6-fosfato
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
GCGR	Receptor de glucagón
GFP	Proteína fluorescente verde
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GLUT1/2	Transportador de glucosa 1 / 2
HFD	Dieta alta en grasas
IDE	Enzima degradadora de insulina
INF2	Formina 2 invertida
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
KO	<i>Knock out</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAMs	Membranas asociadas a mitocondrias
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos
mARN	ARN mensajero
Mfn1/2	Mitofusinas 1/2
MID49/51	Proteínas de dinámica mitocondrial 49/51
MMF	Factor de fisión mitocondrial
MT	Microtúbulos
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina

NAFLD	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
NASH	Esteatosis no alcohólica
OAA	Oxalacetato
OCR	Tasa de consumo de oxígeno
Opa1	Proteína de atrofia óptica 1
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PCR	Rección en cadena de la polimerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PGC1 α	Coactivador del receptor 1 α activado por el proliferador de peroxisomas
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIF	Factor de preimplantación
PKA	Proteína quinasa A
PLC	Fosfolipasa C
qPCR	PCR cuantitativa
RE	Retículo endoplasmático
RFP	Proteína fluorescente roja
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rot/AA	Rotenona/Antimicina
SD	Dieta estándar
SEM	Error estándar de la media
SGLT2	Cotransportador sodio-glucosa 2
shRNA	ARN de horquilla corta
TCA	Ciclo de ácidos tricarboxílico
TFAM	Factor de transcripción mitocondrial A
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
WT	<i>Wild type</i>

RESUMEN

RESUMEN

La enzima degradadora de insulina (IDE) es una metaloproteasa dependiente de Zn^{2+} , altamente conservada entre especies y expresada de manera ubicua. Estudios en humanos han demostrado una asociación entre los polimorfismos genéticos en el locus del gen *Ide* y la susceptibilidad a desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Históricamente se ha considerado una proteasa de insulina, sin embargo, evidencias recientes sugieren funciones no-proteolíticas de IDE.

El objetivo del presente estudio es profundizar en el conocimiento del papel fisiológico de las isoformas citoplasmática (IDE-Met⁴²) y mitocondrial (IDE-Met¹) de IDE en el hígado. Para ello, se han llevado a cabo estudios *ex vivo* en los modelos murinos IDE-KO y L-IDE-KO, e *in vitro* en modelos celulares deficientes de IDE (HepG2-IDE-KO y AML12-shRNA-IDE). Por otro lado, también se han desarrollado herramientas específicas que permiten diferenciar dichas isoformas, además de mutantes sin actividad catalítica que facilitan el estudio de sus funciones no proteolíticas.

Los estudios realizados evidencian que la pérdida de IDE induce resistencia a la insulina y activa la señalización del glucagón en células hepáticas. Además, implica una desregulación de genes asociados a estas funciones celulares, mitocondriales y a la estabilización del citoesqueleto. Asimismo, IDE-Met⁴² es la responsable de regular la producción de glucosa, mientras que IDE-Met¹ desempeña un papel fundamental en la regulación de la señalización de insulina, el consumo de oxígeno, la producción de ATP y la dinámica mitocondrial.

Estos descubrimientos amplían las fronteras del conocimiento existente sobre la función de las isoformas de IDE, demostrando que ambas pueden actuar de forma coordinada en la regulación de la homeostasis de la glucosa celular. No obstante, es fundamental continuar la investigación en IDE como una potencial diana terapéutica, ya que podría generar nuevo conocimiento para el desarrollo de terapias más específicas y efectivas dirigidas a los sujetos que sufren DM2.

INTRODUCCIÓN

3.1 DIABETES MELLITUS

Según la Organización Mundial de la Salud, la diabetes se define como una enfermedad crónica caracterizada por la insuficiente producción de insulina por parte del páncreas o por la incapacidad del organismo para utilizar de manera efectiva la insulina que se produce [1].

En las últimas décadas, la prevalencia de la diabetes ha aumentado significativamente a nivel mundial, considerándose como una de las mayores crisis sanitarias del siglo XXI. En 2021 se diagnosticó la enfermedad a 537 millones de personas. Se estima que esta cifra ascenderá a 643 millones en 2030 y alcanzará los 783 millones en 2045 [2].

Estas preocupantes cifras destacan la urgente necesidad de reducir los factores de riesgo, optimizar el diagnóstico y los tratamientos, y fomentar investigaciones de alta calidad para profundizar en el conocimiento de la enfermedad, con el objetivo central de mejorar la calidad de vida de los pacientes con diabetes mellitus.

3.1.1 Clasificación de la Diabetes

La diabetes mellitus (DM) se presenta predominantemente en dos formas principales: Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) y Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2), siendo esta última la más prevalente a nivel global [2]. Otras variantes de DM son menos comunes o están asociadas a estados metabólicos transitorios, como la diabetes gestacional [3].

DIABETES MELLITUS TIPO I

La DM1 es una enfermedad autoinmune que provoca la destrucción específica de las células productoras de insulina: las células beta pancreáticas. Esta destrucción conduce a una secreción baja o nula de insulina en el torrente sanguíneo, con el consiguiente aumento de los niveles de glucosa en sangre [4]. Este tipo de diabetes representa entre el 5% y el 10% del total de casos de la enfermedad [4]. Su aparición está influenciada por una combinación de factores

genéticos y ambientales; sin embargo, la causa subyacente de este proceso destructivo permanece desconocida y, por ende, no es posible prevenirla en la actualidad. Los pacientes DM1 requieren la administración diaria de insulina exógena para mantener niveles de glucosa estables y evitar las complicaciones asociadas con la hiperglucemia.

DIABETES MELLITUS TIPO II

La DM2 se caracteriza por una disfunción en la sensibilidad de los tejidos periféricos, que se denomina resistencia a la insulina, así como por una deficiencia en la producción de insulina por parte de las células β pancreáticas [5]. Dicha insuficiencia se debe a la demanda prolongada de una mayor secreción de insulina para contrarrestar la resistencia producida en el organismo, lo que resulta en una alteración del control de la glucemia y del metabolismo. Se ha evidenciado que, en esta condición, se produce una desregulación de la secreción de glucagón, que ocasiona hiperglucagonemia. Los niveles elevados de glucagón exacerban la enfermedad debido a los efectos hiperglucémicos de esta hormona.

Su aparición está vinculada a diversos factores genéticos [6-8] así como a hábitos de vida poco saludables, tales como una dieta rica en grasas y la falta de ejercicio, costumbres que conducen al sobrepeso y a la obesidad. A pesar de que la DM2 ha sido asociada a la mediana edad o etapas posteriores, recientes investigaciones han identificado un número creciente de casos en jóvenes y niños. Asimismo, la DM2 representa más del 90% de todos los casos de diabetes a nivel global [9].

Por otro lado, el tratamiento para pacientes DM2 se fundamenta en modificaciones en el estilo de vida y en el uso de medicamentos orales hipoglucemiantes. La metformina es el agente antidiabético oral más empleado a nivel mundial [10]. Esto se debe a su capacidad para promover la captación de glucosa en los tejidos [11], a la reducción de la gluconeogénesis hepática [12] y, en menor medida, a la disminución de la absorción intestinal de nutrientes [13]. Además de la metformina, se utilizan otros fármacos como: las sulfonilureas, los agonistas del receptor de péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), los inhibidores

de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4), las tiazolidinedionas y los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa 2 (SGLT2) [14]. Estos medicamentos tienen como objetivo incrementar la producción de insulina, mejorar la absorción de glucosa o aumentar la sensibilidad de los tejidos a la insulina.

Sin embargo, a pesar de los avances aún no se ha logrado un tratamiento curativo definitivo. La falta de comprensión de la fisiopatología de la enfermedad subraya la necesidad de una investigación continua que amplíe el conocimiento y que permita desarrollar enfoques terapéuticos más efectivos.

3.2 METABOLISMO HEPÁTICO

El hígado es un órgano con una notable plasticidad metabólica, capaz de adaptarse dinámicamente a las variaciones en las señales nutricionales, hormonales y neuronales. Esta capacidad le permite alternar entre el almacenamiento y la provisión de energía según las necesidades del organismo. Debido a esta función adaptativa, el hígado es fundamental para el mantenimiento del equilibrio energético y desempeña un papel crucial en diversas funciones fisiológicas, tales como el metabolismo de los macronutrientes, la inmunomodulación, el metabolismo de lípidos y la homeostasis del colesterol [15].

3.2.1 Homeostasis de la glucosa

El hígado es el órgano responsable de la homeostasis de la glucosa mediante el control del equilibrio entre la salida de glucosa en periodos de ayuno y su captación en periodos de alimentación. Además, modula las concentraciones periféricas de insulina, una de las principales hormonas glucorreguladoras, al eliminar la mayor parte de la insulina producida por el páncreas [16].

En condiciones fisiológicas, tras la ingesta de alimentos, los nutrientes son absorbidos. Los niveles de glucosa en sangre alcanzan un umbral a partir del

que se estimula la secreción de la hormona insulina por las células β del páncreas endocrino. Asimismo, la sensibilidad de las células β pancreáticas a la hiperglucemia viene determinada por el predominio del transportador de glucosa GLUT2 en la membrana plasmática, que tiene una baja afinidad por el sustrato [17].

La insulina secretada se transporta a través del torrente sanguíneo a sus órganos diana: el hígado, el músculo, el tejido adiposo y el cerebro. Tanto en el hígado como en el riñón se produce la estimulación de varios procesos metabólicos que desencadenan en el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno (glucogénesis) y la oxidación de glucosa para la obtención de energía (glucólisis) [18]. Finalmente, esto conduce a un aumento de la captación de glucosa y a su utilización por las células implicadas, con la consiguiente disminución de los niveles en sangre (**Figura 1**). La insulina circulante es eliminada principalmente por el hígado y, en menor medida, por el riñón [19].

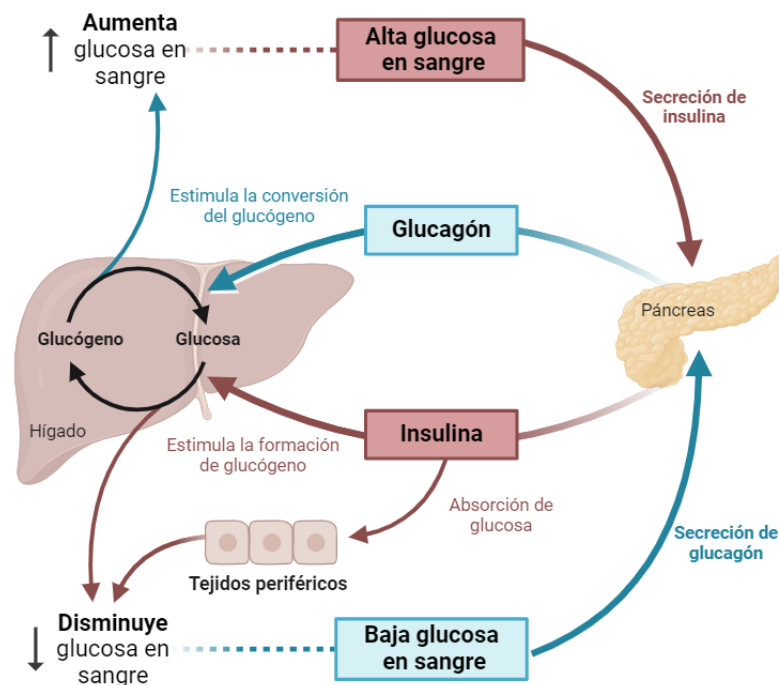


Figura 1. Mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. En el estado postprandial, la insulina es *secretada* por las células β del páncreas y eliminada principalmente por el hígado. Durante el ayuno y en condiciones de hipoglucemia, el páncreas secreta glucagón, que aumenta la producción hepática de glucosa estimulando la gluconeogénesis y la glucogenólisis.

En condiciones de ayuno, los niveles de glucosa en sangre son más bajos que en condiciones prandiales, lo que promueve la estimulación de las células α

pancreáticas, en las que el transportador de glucosa de alta afinidad GLUT1 está altamente expresado. Las células α pancreáticas son responsables de la síntesis y secreción de glucagón, una hormona de naturaleza peptídica con acciones contrarias a la insulina, que da lugar a la estimulación de sus tejidos diana. Esto impulsa al metabolismo hepático a la producción de glucosa a partir del glucógeno almacenado (glucogenólisis) y a la producción *de novo* de glucosa utilizando glicerol, lactato y ciertos aminoácidos (gluconeogénesis) [20]. Como resultado se produce un aumento de la glucemia y se restablece la homeostasis de la glucosa (**Figura 1**).

El suministro continuo de glucosa al organismo es indispensable. En este sentido, la acción opuesta de estas dos hormonas, la insulina y el glucagón, constituye el núcleo central de la regulación del metabolismo de la glucosa y permite mantener los niveles de glucosa en sangre dentro de un rango muy estrecho (4-6 mM) [21]. Sin embargo, las alteraciones de este entramado metabólico pueden dar lugar a trastornos metabólicos graves como las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad renal crónica, la obesidad y la DM2, cuya prevalencia, comorbilidades y costes médicos han ido aumentando peligrosamente en las últimas décadas [15].

3.2.2 Homeostasis de la glucosa y Diabetes Mellitus Tipo 2

En el contexto de la DM2, los mecanismos reguladores homeostáticos se encuentran comprometidos, lo que da lugar a un desequilibrio en el metabolismo celular. Un aspecto fundamental en la patogenia de esta enfermedad es la presencia de hiperglucemia, es decir, niveles elevados de glucosa en sangre debido a la incapacidad de la insulina para mantener la homeostasis del metabolismo de la glucosa. Además, otras alteraciones hormonales, como la hiperglucagonemia, pueden contribuir al cuadro clínico característico de la enfermedad.

La DM2 se caracteriza por una respuesta insuficiente de los tejidos periféricos a la insulina, que se denomina resistencia a la insulina. Existe una retroalimentación entre los tejidos sensibles a la insulina y las células β : la resistencia a la insulina provoca un aumento de las necesidades de insulina, lo

que conduce a una respuesta exagerada de las células β pancreáticas [22]. El aumento de la demanda de secreción de insulina y la hiperfunción de las células β se traduce a su vez en una disminución de la masa de células β funcionales [23].

En esta afección, eventualmente ocurre una desregulación en la secreción de glucagón, lo que contribuye a la hiperglucagonemia. Este aumento en los niveles de glucagón agrava la hiperglucemia característica de la DM2 debido a su efecto estimulador de la gluconeogénesis y a la glucogenólisis hepática, lo que exacerba el descontrol glucémico. Diversos estudios han demostrado que la alteración en la regulación del glucagón juega un papel crucial en la patogénesis y progresión de la DM2 [24].

3.2.3 Regulación hormonal en el metabolismo hepático

La regulación hormonal del metabolismo hepático es un proceso fundamental que asegura el mantenimiento de la homeostasis energética del organismo. El hígado, como órgano central en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, responde a señales hormonales clave que coordinan la síntesis, almacenamiento y liberación de nutrientes según las necesidades fisiológicas. Hormonas como la insulina y el glucagón actúan sobre el hígado modulando rutas metabólicas críticas, como la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la lipogénesis, lo que ajusta así el equilibrio entre el almacenamiento y la movilización de reservas energéticas.

Este apartado explora los mecanismos mediante los cuales las hormonas regulan estas funciones hepáticas esenciales.

SEÑALIZACIÓN DE INSULINA

La señalización de la insulina regula la homeostasis de la glucosa, los lípidos y la energía, principalmente a través de su acción en el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo [25]. Una vez secretada por las células β , la insulina se une al receptor de insulina (IR). Este receptor está formado por dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembrana que están

unidas por enlaces disulfuro. En las subunidades β hay un dominio tirosina quinasa, que se activa por autofosforilación cuando la insulina se une a IR [26]. La activación de IR induce el reclutamiento de sustratos del receptor de insulina (IRS), vía fosforilación de ciertos residuos de tirosina por la actividad quinasa del IR activado. El IRS-1 es el principal IRS responsable del control de la acción de la insulina en el músculo, mientras que el IRS-2 es esencial para la señalización de la insulina en el hígado [27]. Las proteínas IRS fosforiladas desempeñan un papel fundamental en la activación de las dos principales vías de señalización de la insulina (**Figura 2**): la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), que es esencial para el crecimiento y el desarrollo celular; y la vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y proteína quinasa B (AKT), que es crucial para la regulación de funciones metabólicas, principalmente el metabolismo de la glucosa y los lípidos [28].

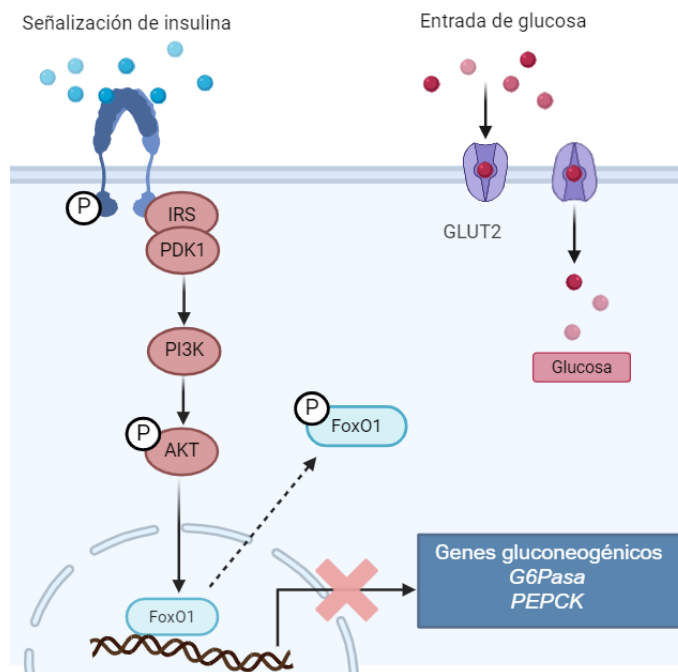


Figura 2. Metabolismo hepático en respuesta a insulina. En el hígado, la insulina reduce la expresión de genes gluconeogénicos y, activa la glucólisis y la síntesis de glucógeno. Esto resulta en la inhibición de las tasas de glucogenólisis y gluconeogénesis hepáticas, contribuyendo al control de los niveles glucosa.

La vía PI3K-AKT promueve la fosforilación y activación de enzimas clave involucradas en la glucólisis, como la fosfofructoquinasa-2 (PFK-1), que aumenta la producción de fructosa-1,6-bisfosfato, un potente activador de la glucólisis [29]

(Figura 3). Simultáneamente, la vía AKT inhibe la expresión de genes gluconeogénicos, como los que codifican para la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK; *Pck1*) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa; *G6pc*), mediante la inactivación del factor de transcripción FOXO1 [30] (Figura 2). Este doble efecto de la señalización de la insulina asegura que, en condiciones postprandiales, el hígado reduzca la producción de glucosa a través de la gluconeogénesis (Figura 3) mientras se favorece su utilización a través de la glucólisis, lo que contribuye al mantenimiento de niveles normales de glucosa en sangre.

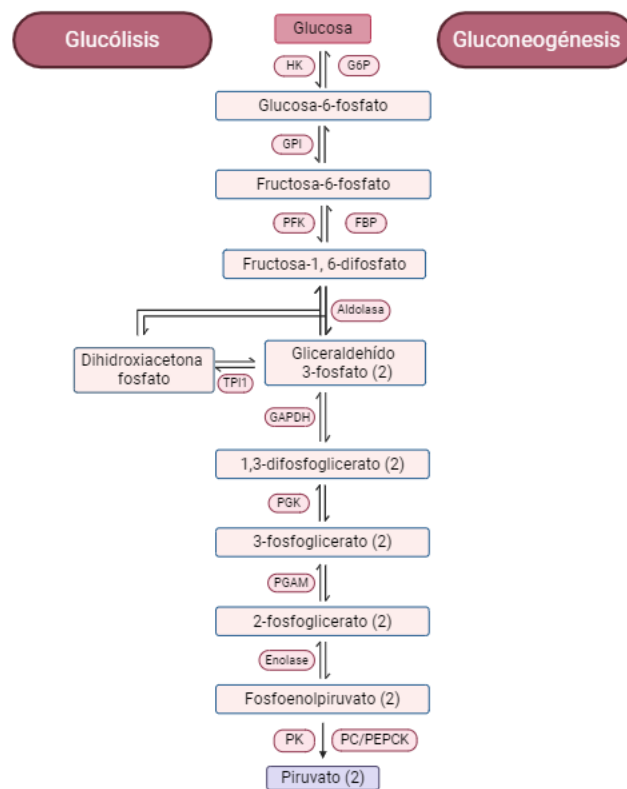


Figura 3. Glucólisis y gluconeogénesis. En el hígado, la insulina activa la glucólisis, proceso que transforma la glucosa en piruvato y, activa la síntesis de glucógeno para su almacenamiento. Esto resulta en la inhibición de las tasas de glucogenólisis y gluconeogénesis hepáticas, contribuyendo al control de los niveles de glucosa. Por el contrario, la gluconeogénesis, que sintetiza glucosa a partir de precursores no carbohidratos, es activada en condiciones de ayuno, lo que favorece un control de la homeostasis glucémica.

Asimismo, la insulina juega un papel fundamental en la regulación del metabolismo lipídico hepático. Esta hormona inhibe la lipólisis y la beta-oxidación al promover la síntesis de malonil-CoA y, por lo tanto, inhibir la actividad de la

carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-I) [31, 32]. A su vez, la insulina favorece la lipogénesis, lo que estimula la conversión de glucosa en triglicéridos [33].

En condiciones fisiopatológicas, como en la DM2, la resistencia a la insulina provoca una alteración significativa en la regulación de esta vía de señalización. Esta disfunción lleva a la activación inadecuada de procesos metabólicos como la gluconeogénesis hepática, lo que contribuye a un aumento anormal de la producción de glucosa endógena. Como resultado de esta resistencia, se produce una hiperinsulinemia compensatoria, en un esfuerzo del organismo por contrarrestar la hiperglucemia persistente.

SEÑALIZACIÓN DE GLUCAGÓN

La señalización del glucagón juega un papel crucial en la regulación del metabolismo de la glucosa, especialmente en condiciones de ayuno. Una vez secretado por las células α pancreáticas, el glucagón se une a su receptor específico (GCGR). Estos receptores son proteínas transmembrana de aproximadamente 60 kDa, que se caracterizan por sus siete dominios en hélice y pertenecen a la clase B de los receptores acoplados a proteínas G. El receptor GCGR está acoplado principalmente a la proteína Gs, y en menor medida, a la proteína Gq [34].

Por un lado, la unión del glucagón a su receptor activa la proteína Gs y la adenilato ciclasa (AC), enzima que cataliza la formación de AMP cíclico (AMPC) (**Figura 4**). Este segundo mensajero estimula la proteína quinasa A (PKA), que a su vez fosforila, entre otros sustratos, al factor de transcripción CREB. Este es transportado al núcleo donde se activa la transcripción de enzimas clave como la fosforilasa quinasa, lo que promueve la glucogenólisis y por tanto, la liberación de glucosa almacenada en forma de glucógeno [35]. Asimismo, la fosforilación de CREB facilita su unión al promotor de PGC-1 α , lo que eleva su expresión. A su vez, PGC-1 α actúa como coactivador transcripcional e incrementa la expresión de genes fundamentales como PEPCK y G6Pasa, lo que resulta en un aumento en la producción de glucosa en el hígado (**Figura 4**). Este proceso es esencial para mantener niveles adecuados de glucosa en sangre durante el ayuno y en condiciones de baja disponibilidad de carbohidratos.

Por otro lado, la activación de la proteína Gq activa la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) para generar los mensajeros secundarios inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) [36]. La producción de IP₃ induce la liberación de calcio intracelular desde el retículo endoplásmico. Además, el aumento en los niveles de Ca²⁺ activa los canales de Ca²⁺ sensibles a IP₃, lo que provoca la translocación del factor de transcripción FoxO1 al núcleo mediante la calmodulina (CaM) (**Figura 4**). En conclusión, FoxO1 en el núcleo estimula la transcripción de los genes involucrados en la gluconeogénesis [37].

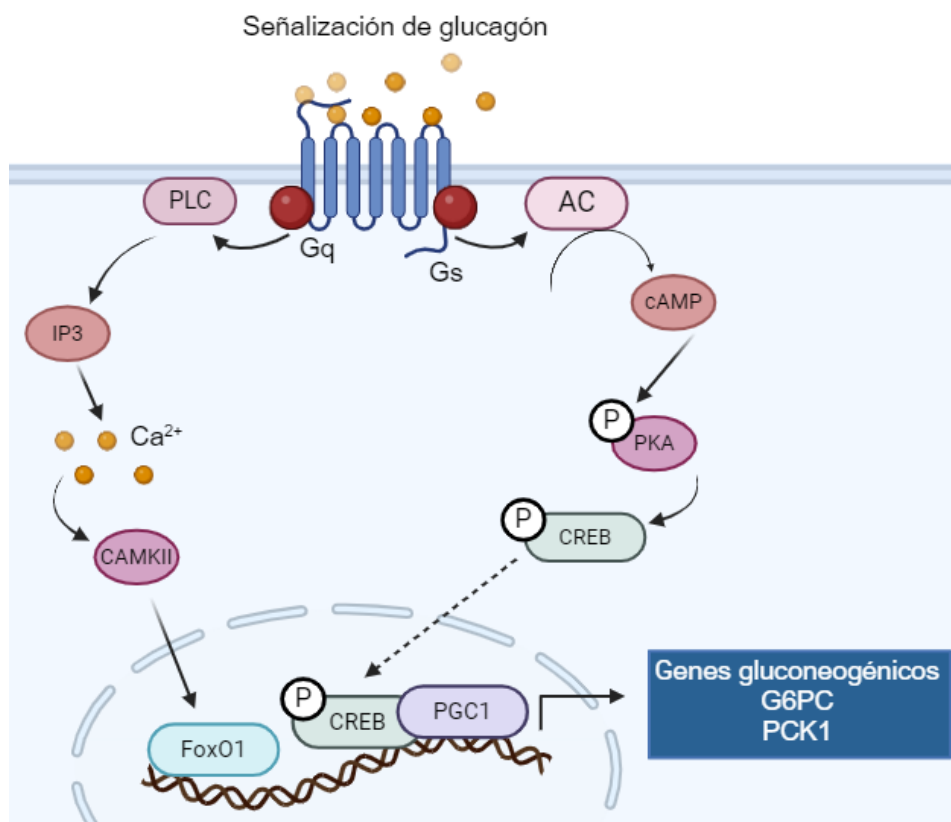


Figura 4. Metabolismo hepático en respuesta a glucagón. En el hígado, la activación del receptor de glucagón conduce a un aumento de la transcripción de genes gluconeogénicos por la acción sinérgica de las vías de IP₃ y AMPc.

Asimismo, el glucagón juega un papel fundamental en la regulación del metabolismo lipídico hepático. Esta hormona estimula la movilización de ácidos grasos mediante la activación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) a través de un mecanismo de señalización que involucra el AMP cíclico y PKA. De esta manera, se facilita la liberación de ácidos grasos libres y glicerol al torrente sanguíneo y, por lo tanto, la activación de la lipólisis y la inhibición de la

lipogénesis. Además, el glucagón promueve la beta-oxidación de ácidos grasos al activar la CPT-I mediante la inhibición de la expresión de malonil-CoA [38], esencial para el transporte de ácidos grasos a las mitocondrias.

Uno de los aspectos significativos de la DM2 es la hiperglucagonemia aunque la alteración en la regulación de la secreción de glucagón por las células α -pancreáticas y sus efectos perjudiciales sobre la gluconeogénesis hepática no se comprenden completamente [39, 40]. Esta condición patológica compromete la funcionalidad del páncreas y del hígado, lo que contribuye de manera significativa a la patogenia de la DM2.

3.3 MITOCONDRIA

Las vías metabólicas de la célula están interconectadas y reguladas en gran medida por la mitocondria. Este orgánulo, presente en todos los organismos eucariotas, es considerado el centro principal del metabolismo celular debido a su papel en la producción de la mayor parte del ATP, principal fuente de energía para la célula [41]. Además, las mitocondrias están involucradas en diversos procesos biológicos. Entre ellos, se destacan la generación de NADH y guanosina trifosfato (GTP) a través del ciclo de Krebs, que facilita la biosíntesis de aminoácidos, grupos hemo y complejos hierro-azufre (Fe-S) [42]. Asimismo, participan en la producción de fosfolípidos necesarios para la formación de membranas celulares, regulan la señalización y homeostasis del calcio, controlan los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estimulan respuestas inmunitarias [41, 43].

En consecuencia, las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la homeostasis celular y en la adaptación a cambios metabólicos, lo que destaca su implicación en diversas patologías.

La DM2 está estrechamente relacionada con la actividad mitocondrial, dado que la resistencia a la insulina y la desregulación del metabolismo de la glucosa inducen alteraciones en la función mitocondrial. En las células β

pancreáticas, la mitocondria desempeña un papel fundamental en la regulación de la secreción de insulina [44, 45]. Las alteraciones en la función mitocondrial producen un incremento en la secreción de ROS, así como un aumento del estrés oxidativo [46-48]. Además, el deterioro en la capacidad de las mitocondrias para llevar a cabo la β -oxidación de ácidos grasos contribuye a la acumulación de metabolitos lipídicos, que interfieren con la señalización de la insulina y agravan el cuadro clínico de la enfermedad.

3.3.1 Estructura mitocondrial

Las mitocondrias se originaron hace aproximadamente dos mil millones de años en un proceso conocido como endosimbiosis. Este proceso involucró la fusión de una bacteria, específicamente una α -proteobacteria, con un precursor de la célula eucariota moderna [49].

Las mitocondrias están formadas por una membrana lipídica externa y una membrana interna, esta última plegada en forma de crestas, lo que genera dos compartimientos definidos: la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. La membrana externa de la mitocondria contiene porinas capaces de permitir el paso de iones y moléculas pequeñas, lo que le otorga una alta permeabilidad. Por el contrario, la membrana interna presenta una permeabilidad selectiva ya que regula el transporte de moléculas e iones, lo que mantiene el gradiente electroquímico de protones necesario para la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa [41]. Además, esta membrana alberga la cadena respiratoria mitocondrial, que se compone de complejos proteicos esenciales para la respiración celular y la generación de energía.

La matriz mitocondrial alberga el ADN mitocondrial circular, las proteínas necesarias para su replicación y transcripción, los ribosomas y numerosas enzimas implicadas en procesos metabólicos (**Figura 5**), tales como el ciclo de Krebs y la β -oxidación. El genoma mitocondrial codifica 13 proteínas esenciales que constituyen componentes fundamentales de los complejos respiratorios mitocondriales I-IV ubicados en la membrana interna.

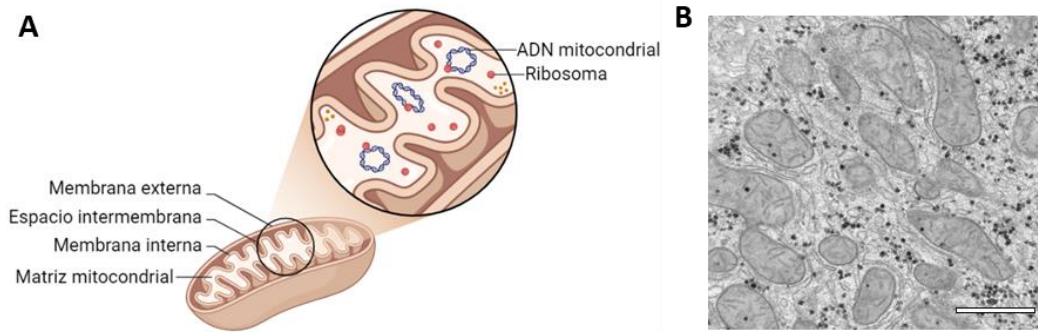


Figura 5. Estructura mitocondrial. (A) Esquema de la composición mitocondrial (B) Imagen representativa de microscopía electrónica de transmisión que muestra mitocondrias de tejido hepático. Imagen tomada de Holland *et al.* [50]. Escala: 1 µm.

3.3.2 Ciclo de Krebs

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), también conocido como ciclo de Krebs, es una vía metabólica que desempeña la función de oxidación de nutrientes para apoyar la bioenergética celular. En este ciclo, los organismos aeróbicos procesan nutrientes específicos a través de una secuencia cíclica de reacciones bioquímicas catabólicas que generan energía y metabolitos esenciales para la viabilidad, proliferación y función celular [51].

En el hígado, la glucosa es captada a través del transportador GLUT2 y posteriormente metabolizada mediante la glucólisis hasta formar piruvato (**Figura 6**). Este piruvato puede seguir dos rutas principales: una vez dentro de la mitocondria, es convertido en acetil-CoA para ingresar al TCA y participar en la producción de ATP, o bien puede ser reducido a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en un proceso conocido como fermentación láctica. Esta conversión a lactato permite la regeneración del NAD⁺ necesario para mantener la glucólisis activa en condiciones donde la capacidad mitocondrial para oxidar piruvato es limitada.

El ciclo de Krebs comienza con la condensación del metabolito de cuatro carbonos oxalacetato (OAA) con la molécula de dos carbonos acetil-CoA, lo que forma el citrato (**Figura 6**). A través de una serie de reacciones enzimáticas, el citrato es oxidado para producir una molécula de ATP. En cada ciclo, se transfieren tres iones hidruro, equivalentes a seis electrones, concretamente a tres moléculas de NAD⁺. Asimismo, un par de átomos de hidrógeno, que

equivalen a dos electrones, se transfieren a una molécula de FAD. Como resultado, se producen cuatro equivalentes reductores: tres moléculas de NADH y una molécula de FADH₂.

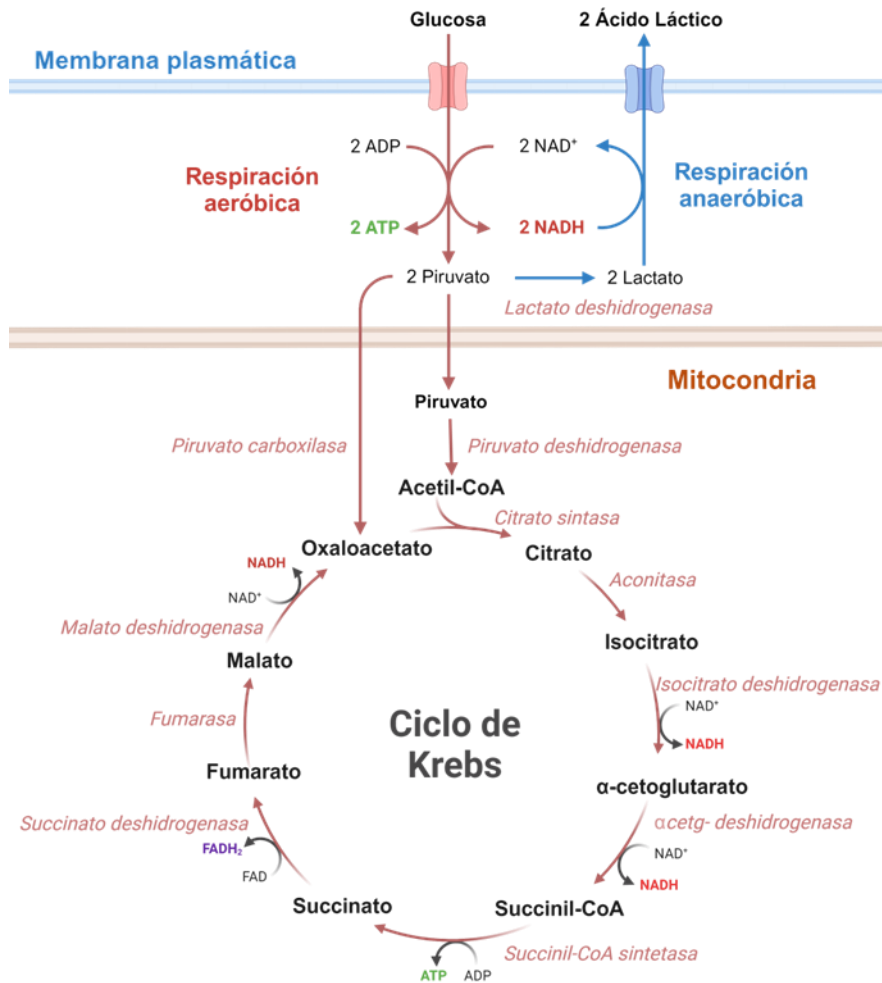


Figura 6. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o ciclo de Krebs. En el hígado, la glucosa es captada a través del transportador GLUT2 y es metabolizada en la glucólisis hasta piruvato. El piruvato puede entrar en la mitocondria, o bien metabolizarse por la LDH a lactato. En el interior de la mitocondria el piruvato se descarboxila para generar acetil-CoA, que cede su grupo carbonilo a OAA para formar citrato y activar el ciclo de Krebs.

El TCA es responsable de la generación de 67% de todos los equivalentes reductores por molécula de glucosa, por lo que los factores que influyen en el flujo del ciclo son cruciales para la fosforilación oxidativa [52].

Cada ciclo finaliza con la regeneración del oxalacetato que actúa como catalizador. Esta regeneración continua asegura la eficiencia del TCA, que conecta y regula el metabolismo energético celular. Además, sus metabolitos

también participan en la regulación de modificaciones de la cromatina, la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de las proteínas, lo que destaca su importancia en la homeostasis y la adaptación metabólica [52, 53].

3.3.3 Cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa: ETC y OXPHOS

El TCA está conectado con la cadena transportadora de electrones (ETC) a través de una de las enzimas del ciclo, la succinato deshidrogenasa. Esta enzima además de catalizar la oxidación de succinato a fumarato actúa como el complejo II de la ETC, lo que facilita la transferencia de electrones.

La fosforilación oxidativa es un proceso bioquímico fundamental para la producción de ATP en las células eucariotas, que integra la ETC y la síntesis de ATP mediante el complejo V, también conocido como ATP sintasa. La cadena de transporte de electrones se compone de cuatro complejos proteicos integrales numerados del I al IV (**Figura 7**). Cada uno de estos complejos contiene grupos prostéticos específicos que actúan como intermediarios en la transferencia de electrones a lo largo de la cadena.

El complejo I, también denominado NADH-ubiquinona oxidorreductasa, cataliza la oxidación de NADH a NAD⁺ y transfiere los electrones generados a la ubiquinona (coenzima Q10 o CoQ), lo que conlleva la translocación de protones a través de la membrana mitocondrial interna.

El complejo II, conocido como succinato deshidrogenasa, participa en la oxidación del succinato a fumarato y transfiere los electrones resultantes a la CoQ, lo que la reduce a ubiquinol [54]. Posteriormente, el ubiquinol se oxida nuevamente a ubiquinona al ceder sus electrones al complejo III, o citocromo c reductasa, que a su vez transfiere estos electrones al citocromo c (Cyt C). El citocromo c cede sus electrones al complejo IV, que se conoce como citocromo c oxidasa, el cual los transfiere finalmente al oxígeno O₂, el aceptor terminal de electrones, lo que produce agua H₂O [55].

A lo largo de esta cadena de transporte de electrones, los complejos I, III y IV bombean protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, lo que genera un gradiente de protones, también denominado fuerza protón-motriz. Este gradiente es el impulsor de la síntesis de ATP en el complejo V, o ATP sintasa, que utiliza la energía derivada del flujo de protones de regreso a la matriz mitocondrial para catalizar la formación de ATP a partir de ADP [56], en un proceso conocido como fosforilación oxidativa (OXPHOS).

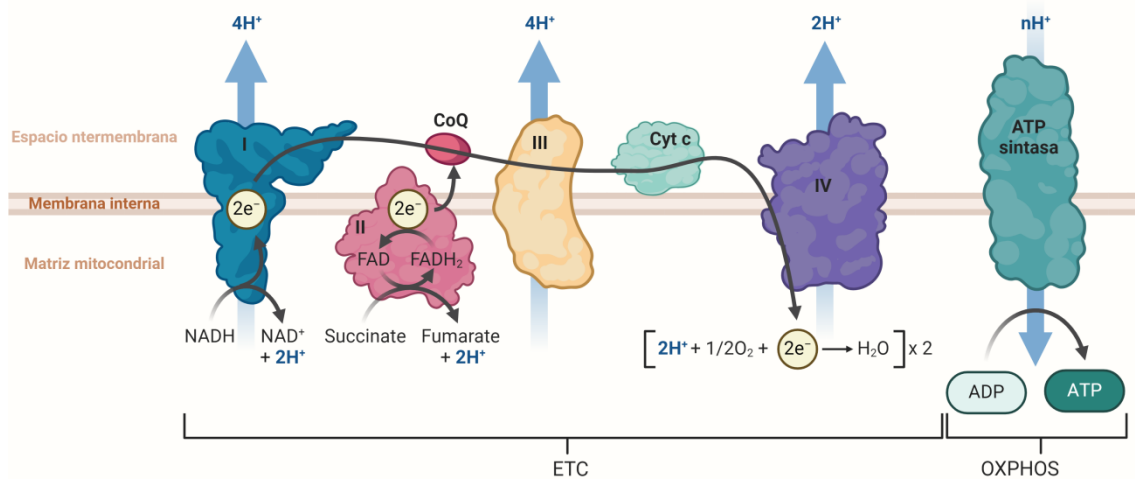


Figura 7. Cadena de transporte de electrones (ETC) y fosforilación oxidativa (OXPHOS). El esquema muestra el flujo de electrones a través de los cuatro complejos proteicos de la ETC (I-IV) y su transferencia a través del transportador de electrones Cyt c hacia el complejo IV. El bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna por los complejos I, III y IV genera un gradiente electroquímico que impulsa la síntesis de ATP en el complejo V.

En la mitocondria se generan la mayoría de las especies reactivas de oxígeno (ROS) como subproducto de la fosforilación oxidativa. En condiciones normales, la ETC convierte la mayoría del oxígeno en agua en el complejo IV, lo que genera ROS en un bajo porcentaje (~4-5%). Sin embargo, entre el 1- 3% del oxígeno no se reduce completamente, lo que produce radicales de oxígeno como el ión superóxido (O_2^-) en los complejos I y III [57]. Estos radicales son neutralizados por enzimas antioxidantes que convierten el O_2^- en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 puede ser transformado en agua por la glutatión peroxidasa (GSH-PX) y la catalasa o, en su defecto, puede atravesar la membrana mitocondrial y generar radicales hidroxilo (OH^-) en el citoplasma [58].

En condiciones patológicas, la producción de ROS excede la capacidad de neutralización y se produce daño oxidativo en el ADN mitocondrial (ADNmt), lípidos de membrana y proteínas mitocondriales, lo que contribuye a la progresión de enfermedades crónicas como la diabetes [59].

3.3.4 Dinámica mitocondrial

Las mitocondrias, además de actuar como centrales energéticas, regulan su integridad y funcionalidad de forma dinámica, lo que incluye procesos de fusión, fisión, biogénesis y mitofagia (**Figura 8**). Estos orgánulos altamente dinámicos y plásticos son esenciales para el metabolismo celular, la respuesta al estrés y el mantenimiento de la homeostasis [60].

La dinámica mitocondrial determina la morfología, calidad, cantidad y distribución de las mitocondrias dentro de las células, así como su función general. Para mantener un funcionamiento óptimo, las mitocondrias, que poseen su propio ADN, requieren una constante reparación y sustitución de sus componentes. Este proceso incluye la eliminación de componentes dañados o de mitocondrias defectuosas a través de la mitofagia, lo que previene la liberación de proteínas proapoptóticas y minimiza el daño celular [61, 62]. La fisión mitocondrial, en particular, facilita la apoptosis en respuesta al estrés celular, mientras que la fusión permite el intercambio de contenido intramitocondrial (entre mitocondrias), lo que ayuda a mantener su funcionalidad [62].

El control de calidad mitocondrial también puede mantenerse mediante vesículas derivadas de las mitocondrias, que eliminan selectivamente secciones disfuncionales de las estructuras mitocondriales sin sacrificar todo el orgánulo [63]. Asimismo, la fusión mitocondrial contribuye a disminuir el estrés al combinar el contenido de mitocondrias parcialmente dañadas.

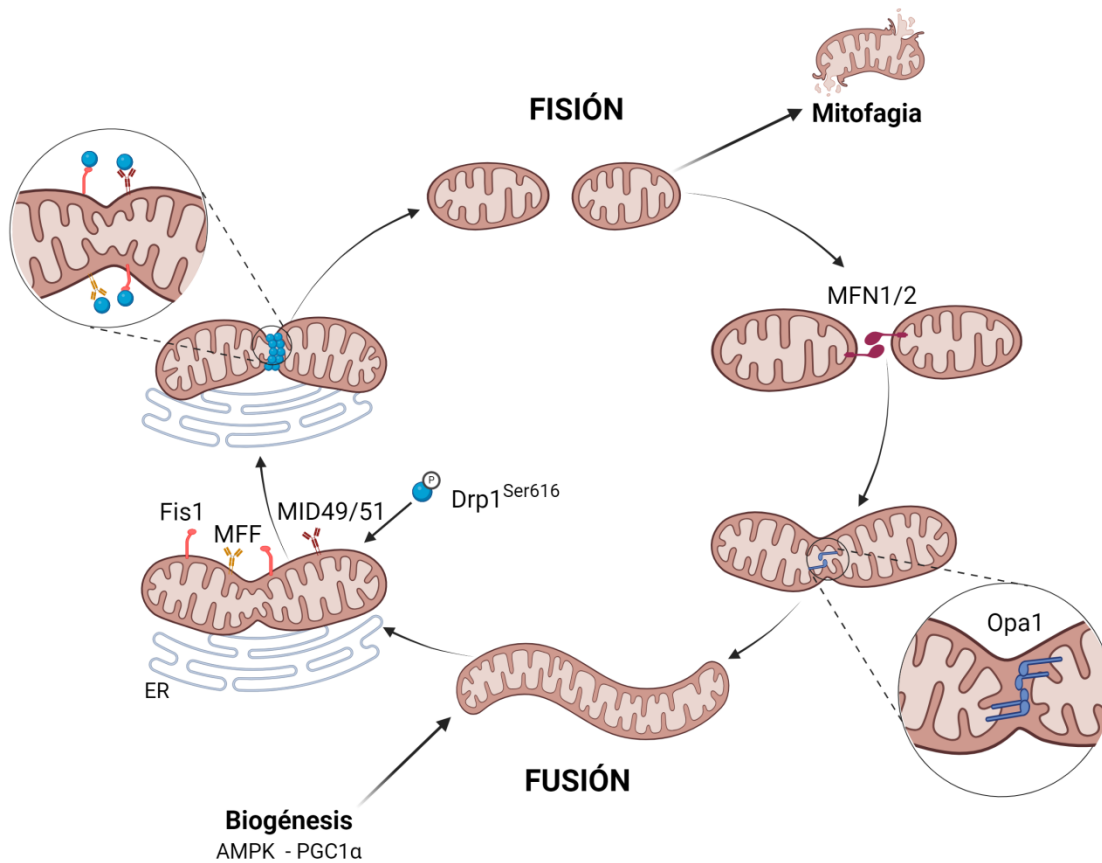


Figura 8. Dinámica mitocondrial. Las mitocondrias experimentan procesos de biogénesis, fusión, fisión y mitofagia. En el proceso de fusión están involucradas las mitofusinas Mfn1 y Mfn2, que se unen a la membrana externa y, la proteína de atrofia óptica 1 (Opa1) en la membrana interna de las mitocondrias. La fisión es mediada principalmente por la proteína 1 relacionada con la dinamina (Drp1). Esta se une a la membrana externa formando un anillo alrededor del orgánulo tras ser reclutada por la proteína 1 de fisión (Fis1), el factor de fisión mitocondrial (MFF) y las proteínas de dinámica mitocondrial (MID49/51). AMPK controla la biogénesis mediante la regulación del factor de transcripción PGC1α.

La maquinaria de la dinámica mitocondrial está muy regulada por interacciones proteína-proteína, interacciones proteína-fosfolípido y modificaciones postraduccionales que permiten una regulación muy precisa en respuesta a diversos cambios en la función mitocondrial y celular. La regulación de la dinámica mitocondrial, el transporte intracelular de las mitocondrias y la capacidad de estos orgánulos para llevar a cabo sus funciones metabólicas, así como para interpretar y responder a señales celulares, depende en gran medida del citoesqueleto de actina [64]. La dinámica de la actina es fundamental para que las mitocondrias mantengan su morfología, se distribuyan eficientemente dentro de la célula y se adapten de manera adecuada a las fluctuaciones en el entorno celular.

BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL

La biogénesis mitocondrial, el proceso mediante el cual se generan nuevas mitocondrias, está controlado por interacciones sinérgicas entre las mitocondrias y el núcleo celular. Un componente clave en esta regulación es el coactivador del receptor 1α activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 α). Cuando las células requieren una mayor producción de energía, PGC1 α se sobreexpresa, lo que desencadena una cascada de eventos que involucran la activación de factores de transcripción como los factores respiratorios nucleares NRF-1 y NRF-2. Estos factores, a su vez, activan la expresión del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), una proteína involucrada en la transcripción y replicación del ADN mitocondrial [65, 66]. Estas proteínas están reguladas por la activación de la quinasa activada por AMP (AMPK). Dicha proteína actúa como un sensor energético que se activa en respuesta a niveles bajos de ATP y ajusta el metabolismo celular al reducir las vías anabólicas que consumen energía, y al aumentar los procesos catabólicos que la generan, lo que ayuda a mantener el equilibrio energético [67].

Este sistema de regulación subraya la importancia de la comunicación mitonuclear en la modulación de la dinámica mitocondrial, integrando señales internas y externas para asegurar una respuesta adecuada a las demandas del entorno celular.

FUSIÓN MITOCONDRIAL

La fusión mitocondrial es un proceso de dos pasos en el que las membranas mitocondriales externas e internas se fusionan mediante eventos separados [68]. La fusión mitocondrial es facilitada por las mitofusinas Mfn1 y Mfn2, presentes en la membrana externa, y por Opa1, que se localiza en la membrana interna de las mitocondrias (**Figura 8**).

Las proteínas Mfn1 y Mfn2 son GTPasas, similares a la dinamina, que poseen dominios específicos que permiten su inserción en la membrana mitocondrial. Las Mfns se insertan en la membrana mitocondrial externa a través de dos regiones transmembrana, lo que expone tanto el extremo N-terminal

como el C-terminal hacia el citoplasma, con un pequeño bucle orientado hacia el espacio intermembrana [69].

Para la fusión de las membranas externas mitocondriales es necesaria la interacción entre las Mfns presentes en mitocondrias adyacentes. En primer lugar, el dominio citoplasmático de las Mfns facilita el acercamiento de las mitocondrias mediante la formación de complejos diméricos antiparalelos que se estabilizan por interacciones hidrofóbicas [70]. A continuación, se produce una distorsión en las membranas mediada por la hidrólisis de GTP, que finalmente permite la fusión de las membranas externas. Sin embargo, los mecanismos exactos de regulación de este proceso aún no se comprenden completamente.

La proteína OPA1 se localiza en el espacio intermembrana de las mitocondrias en formas solubles o adherida a la membrana mitocondrial interna [71]. Esta proteína no solo es esencial para la fusión, sino también para el mantenimiento de la organización de las crestas mitocondriales, la función de la cadena respiratoria y la integridad del ADN mitocondrial.

Un análisis genético reveló que OPA1 requiere de MFN1 para inducir la fusión mitocondrial [72]. Durante este proceso, OPA1 forma complejos helicoidales que actúan como anillos en la membrana y contribuye a la mecánica de la remodelación de esta a través de su actividad GTPasa. Además, OPA1 regula el equilibrio entre la fusión y la fisión mitocondrial, colaborando con otras proteínas mitocondriales para mantener la homeostasis celular.

FISIÓN MITOCONDRIAL

La fusión mitocondrial está estrechamente regulada y coordinada con la fisión mitocondrial para asegurar un equilibrio dinámico. Este proceso de fisión está regulado principalmente por las proteínas Drp1 y Fis1 (**Figura 8**).

Por un lado, en su estado inactivo, DRP1, proteína similar a la dinamina, se encuentra en el citoplasma. Por otro lado, en respuesta a señales celulares que desencadenan la fisión mitocondrial, DRP1 se transloca a la membrana mitocondrial externa. En la membrana, esta proteína forma complejos oligoméricos que se ensamblan en estructuras en anillo alrededor del sitio de

fisión. La actividad GTPasa de DRP1 induce la contracción de estos anillos, facilitando la escisión de la mitocondria. La actividad de esta proteína está regulada por modificaciones postraduccionales, como la fosforilación y la sumoilación [73-75]. En particular, la fosforilación de la Ser637 por la PKA inhibe la actividad de DRP1 al bloquear su translocación a la membrana mitocondrial, mientras que la desfosforilación de este residuo o la fosforilación de la Ser616 por la CAMK promueve la fisión mitocondrial [76-78]. Asimismo, DRP1 requiere de proteínas adaptadoras como FIS1, MFF y MID49/51 para su unión eficiente a la membrana mitocondrial (**Figura 8**).

Además de su papel en la fisión mitocondrial, DRP1 desempeña funciones clave en varios procesos celulares, incluyendo el ciclo celular, la diferenciación cardíaca y muscular, así como en la apoptosis.

El retículo endoplásmico (RE) también juega un papel importante en la fisión mitocondrial, ya que los túbulos pueden envolver las mitocondrias y provocar su constricción [79], lo que facilita la formación de los anillos de Drp1.

FIS1 es una proteína transmembrana que se encuentra en la membrana externa mitocondrial. Su dominio citosólico permite la interacción y reclutamiento de DRP1 a la membrana, lo que facilita la formación de complejos Drp1 que inducen la fisión mitocondrial [80, 81]. En conjunto, DRP1 y FIS1 son componentes clave en la dinámica mitocondrial. La regulación adecuada de estos componentes es esencial para mantener la calidad y funcionalidad de las mitocondrias, lo que evita la acumulación de mitocondrias disfuncionales y contribuye a la salud celular.

Los desequilibrios en los procesos de fusión y fisión mitocondrial están asociados con diversas patologías, incluidas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, y trastornos metabólicos, como la diabetes tipo 2 [82, 83]. Mejorar la función mitocondrial representa una prometedora área de investigación para el tratamiento y la prevención de la DM2.

3.3.5 Citoesqueleto y retículo endoplásmico

MITOCONDRIA Y CITOESQUELETO

El citoesqueleto está compuesto por microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios. Este proporciona un soporte estructural a la célula y favorece la comunicación entre orgánulos. Dicha estructura es esencial para las mitocondrias ya que facilita su localización y movilidad dentro de la célula [83].

La interacción de las mitocondrias con los microtúbulos (MT) depende de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs) [84]. Las MAPs regulan la polimerización y función de los MT y actúan como motores moleculares responsables del movimiento de las mitocondrias a lo largo de los mismos [85]. El transporte mitocondrial es mediado por proteínas motoras pertenecientes a las superfamilias de la quinesina, dineína citoplasmática y miosina [86]. Estas proteínas utilizan las fibras del citoesqueleto como vías para trasladar las mitocondrias a diferentes compartimentos celulares según las necesidades energéticas. Por un lado, las dineínas mueven las mitocondrias hacia el extremo negativo de los MT, es decir, hacia el centro de la célula. Por otro lado, la mayoría de las quinesinas las transportan hacia el extremo positivo, en dirección a la periferia [87]. Estos movimientos permiten que las mitocondrias se ubiquen en zonas de alta demanda energética, tal y como ocurre en la polarización de los hepatocitos [88], y aseguran su correcta localización para participar en procesos esenciales como la señalización del calcio y la distribución de ATP en áreas específicas de la célula.

En otro orden de cosas, los filamentos de actina son esenciales para el anclaje y la redistribución local de las mitocondrias. La actina se organiza en redes densas que facilitan la fijación de estos orgánulos cerca de regiones con demanda energética o de señalización. Además, la actina es fundamental para la fisión mitocondrial. Durante este proceso la actina participa activamente en la formación de filamentos en la superficie mitocondrial, lo que ayuda a identificar los sitios donde comenzará la fisión [89]. La proteína Drp1 es reclutada a los puntos de constricción en la membrana mitocondrial, donde interactúa con los filamentos de actina para facilitar la separación de las mitocondrias. De esta

manera se asegura una correcta distribución y función mitocondrial dentro de la célula.

Tanto los MT como los filamentos de actina juegan un papel fundamental en la dinámica, distribución y transporte de las mitocondrias. Esto permite la redistribución de dichas estructuras en condiciones adversas, como el daño oxidativo, la carencia de nutrientes o la hipoxia. Así, las células pueden mantener su capacidad de producir energía y adaptarse a entornos difíciles, lo que garantiza su supervivencia y funcionalidad.

MITOCONDRIA Y RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

El retículo endoplasmático (RE) participa en la regulación de la dinámica mitocondrial. Estos orgánulos están conectados mediante estructuras llamadas membranas asociadas a mitocondrias (MAMs) [90]. Dichas interacciones son esenciales para diversas funciones como: la regulación de la homeostasis del calcio, la transferencia de lípidos y la modulación de las funciones metabólicas.

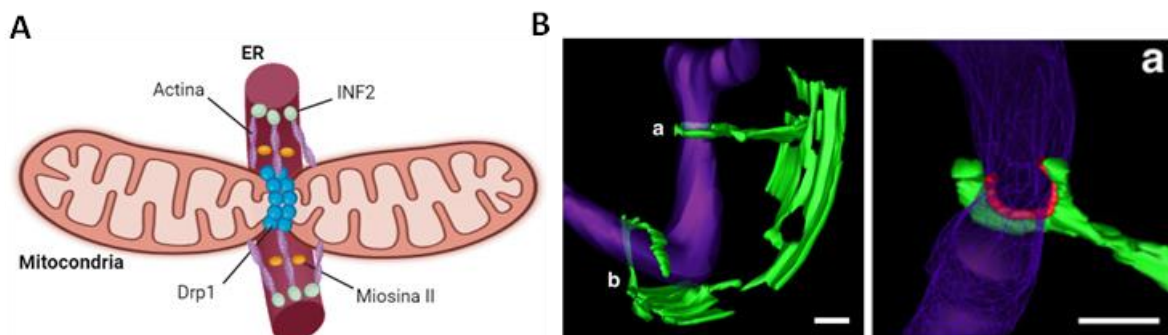


Figura 9. División mitocondrial asociada al retículo endoplásmico (RE). **A)** Los túbulos del RE se enrollan alrededor de las mitocondrias para marcar los sitios de fisión mitocondrial. Esto provoca la polimerización de la actina desde INF2 en la membrana del RE. Junto con la miosina II se favorece el ensamblaje de anillos de Drp1 para escindir la membrana externa mitocondrial. **B)** Modelo 3D de los sitios de contacto entre el RE (verde) y las mitocondrias (morado) obtenidos mediante microscopía electrónica y tomografía de células de levadura congeladas a alta presión. Aumento del sitio de contacto (*imagen derecha*). El contacto se define como las regiones donde la membrana del RE se encuentra a menos de 30 nm de la membrana mitocondrial (rojo). Escala: 200 nm. Imágenes tomadas de Friedman *et al.* [79].

El RE delimita y constriñe áreas de aproximadamente 300-500 nm de diámetro, en las que se formarán anillos de Drp1 para llevar a cabo la división de las mitocondrias. Además, la actina interactúa con la superficie del RE a través

de la proteína formina INF2 [91], que se encuentra anclada a dicha estructura (**Figura 9**). INF2 interactúa con las proteínas Spire1C (factor de nucleación de actina tipo Spire), miosina II y syntaxina SYN17, lo que facilita el ensamblaje de filamentos de actina en la superficie de las mitocondrias [92, 93].

La miosina IIA podría proporcionar la fuerza mecánica necesaria para la constricción inicial de las mitocondrias a través de cables de actina [94]. La miosina IIA y la actina también participan en el reclutamiento y oligomerización de Drp1 a las mitocondrias, lo que desencadena la fisión de su membrana externa [95, 96].

En resumen, la interacción entre el retículo endoplásmico, el citoesqueleto y las mitocondrias es esencial para la regulación del transporte y dinámica mitocondrial y, por ende, para la funcionalidad celular.

3.4 ENZIMA DEGRADADORA DE INSULINA (IDE)

La enzima degradadora de insulina (IDE), también conocida como insulinasas, es una metaloendoproteasa dependiente de Zn^{2+} que se expresa de manera ubicua. Pertenece a la familia de las metaloproteasas de Zn^{2+} M16, denominadas inverzincinas, las cuales se caracterizan por poseer un motivo invertido de unión a Zn^{2+} "HxxEH" respecto a la secuencia clásica "HExxH" que se encuentra en otras metaloproteasas [97, 98].

La enzima IDE está presente en la mayoría de los tejidos y tipos celulares, con una expresión tanto en las células sensibles como en las no sensibles a la insulina [99]. Se ha identificado una alta conservación del gen *Ide* en varios organismos (**Figura 10**), desde eucariotas hasta bacterias, que indica que esta secuencia se conserva desde el punto de vista evolutivo y permite prever la existencia de funciones enzimáticas conservadas a lo largo de la evolución [100-103].

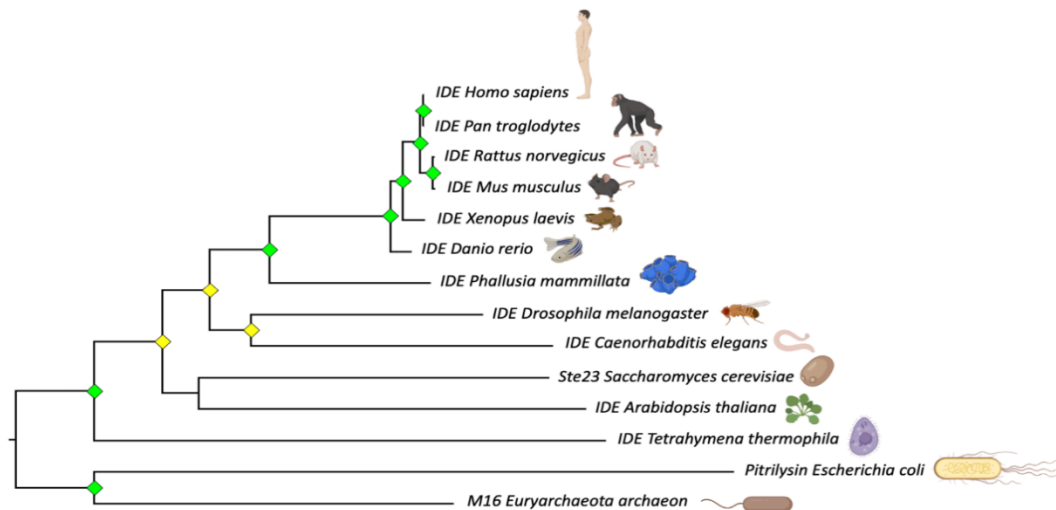


Figura 10. Árbol filogenético de IDE. Obtenido a partir de un Alineamiento Múltiple de Secuencias (MSA) de IDE de 14 especies diferentes. Imagen tomada de Corraliza-Gómez *et al.* [104].

3.4.1 Estructura y localización

IDE se sintetiza como un polipéptido único con 1019 aminoácidos, codificado por un gen localizado en el cromosoma humano 10 q23-35 y, en el cromosoma 19 de ratón, respectivamente [102]. Esta proteína se ensambla como un homodímero estable, aunque puede existir como un equilibrio de monómeros, dímeros y tetrámeros [105]. Cada monómero está compuesto por cuatro dominios $\alpha\beta$ homólogos, los dos primeros constituyen la región N-terminal (IDE-N) y los dos últimos la región C-terminal (IDE-C). Ambas subunidades están unidas por un bucle bisagra de 28 aminoácidos, que conforman a su vez una cámara cerrada [106].

El sitio activo de IDE está localizado dentro de la región IDE-N, a pesar de que IDE-C también es necesaria para el correcto reconocimiento del sustrato [107]. Este consiste en una cámara catalítica en la que dos aminoácidos de histidina (H108 y H112) y un glutamato (E189) coordinan la unión del ion Zn^{2+} (**Figura 11**). Además, un segundo glutamato (E111) juega un papel esencial en la catálisis, debido a que participa en la activación de una molécula catalítica de agua que media en la hidrólisis de péptidos [108, 109].

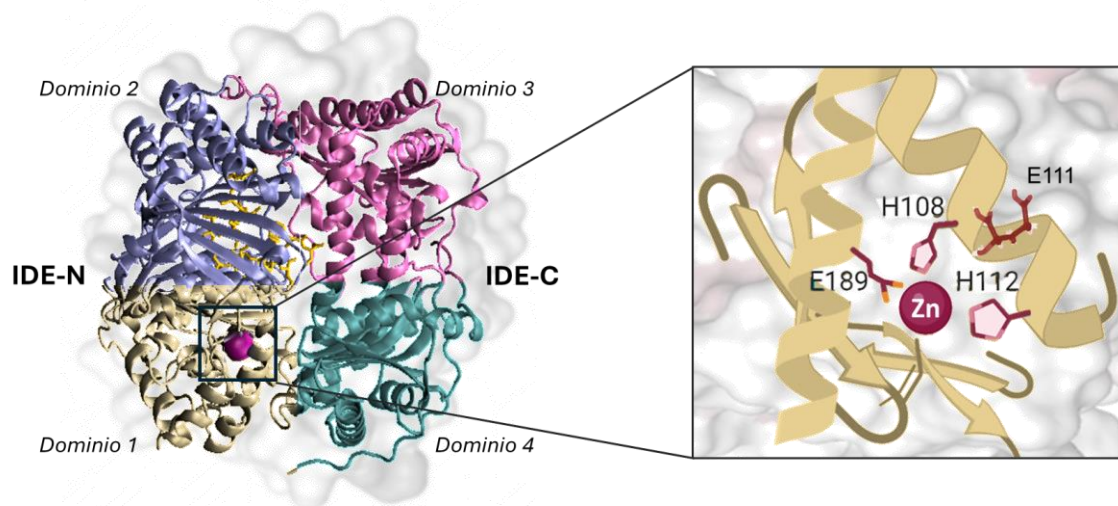


Figura 11. Estructura de IDE. IDE está compuesto por cuatro dominios dispuestos en dos subunidades, IDE-N e IDE-C (*izquierda*). La unión de las subunidades genera una cámara catalítica donde se encuentra la región de unión al Zn^{2+} (*derecha*).

El remplazo de alguno de los aminoácidos del sitio activo de IDE inhibe la actividad catalítica de la enzima. La sustitución de la histidina en la posición 108, aminoácido que coordina la unión de Zn^{2+} , por una leucina o ácido glutámico (H108L y H108Q) suprime la actividad catalítica de la enzima, pero no la capacidad de unirse a la insulina [110]. Del mismo modo, la mutación de glutamato en la posición 111, en la que se sustituye por ácido glutámico, inhibe la degradación de péptidos [109].

Durante el ciclo catalítico, cada monómero tiene la capacidad de adoptar una conformación abierta o cerrada. La transición a la conformación abierta es necesaria para la entrada de sustratos y la salida de los productos proteolíticos, mientras que la IDE en estado cerrado resulta en una cámara catalítica activa de $\sim 13,000 \text{ \AA}^3$ [106].

Los sustratos deben encajar por completo en la cámara catalítica para producir la catálisis. Esto supone que solo los péptidos con menos de 80 aminoácidos tienen afinidad por esta enzima. Además, para facilitar la unión y la posterior escisión en el sitio catalítico, IDE contiene una región conservada dentro del dominio 2 que ancla el extremo N-terminal de los sustratos más grandes, denominada *exosite* [111-113]. Esta región actúa como un sitio de unión secundario para los sustratos, facilitando su reconocimiento y

procesamiento por la enzima. En particular, el *exosite* de IDE puede interactuar con sustratos más grandes o con regiones específicas de las proteínas, como la cadena B de la insulina, lo que mejora la eficiencia de la degradación.

Aunque la localización subcelular de IDE es principalmente citosólica, también se ha descrito su presencia en otros compartimentos subcelulares, incluidos: endosomas [114], peroxisomas [115], mitocondrias [103], membrana plasmática [116], retículo endoplásmico [117], exosomas [118] y espacio extracelular [119].

La presencia de IDE en la membrana plasmática y endosomas puede justificarse por la existencia de una región de unión a diferentes moléculas, denominada *polyanion-binding site*, que se encuentra ubicada en la pared de la cámara interna de la enzima [116]. Esta región, además de ser sitio de unión de ATP y activación de la enzima, interacciona con los fosfatidilinositoles presentes en la membrana. Mutaciones en esta región, IDE^{K898A, K899A, S901A}, afectan a la capacidad de IDE para unirse a estos fosfolípidos presentes en la membrana plasmática [116]. Como resultado se produce una disminución de la actividad de la enzima debida a una menor unión de ATP a esta región de interacción [120].

La presencia ubicua de IDE sugiere un papel multifuncional de esta proteína. A pesar de décadas de estudio, su presencia y función en las células sensibles y no sensibles a la insulina se desconoce.

3.4.2 Isoformas de IDE

Farris et *al.* identificaron una nueva isoforma de IDE que se produce a través del *splicing* alternativo del ARNm de *Ide*. En esta isoforma, el exón 15a es reemplazado por un nuevo exón 15b. De igual modo, puede existir como heterodímero u homodímero con la isoforma IDE-15a, que se encuentra tanto en el citoplasma como en la mitocondria. Además, su eficiencia catalítica frente a la insulina es menor que la de la isoforma canónica 15a-IDE [121].

Leisring et *al.* describieron que el marco de lectura del ADNc de *Ide* humano, de rata y de ratón contiene dos sitios de inicio de la traducción,

dependiendo del aminoácido que codifican: Met¹-IDE y Met⁴²-IDE (**Figura 12**). La isoforma canónica y predominante es la isoforma citosólica (Met⁴²-IDE). Esta presenta una secuencia Kozak, previa al codón de inicio en el aminoácido 42, que facilita la traducción de la proteína en esta posición. Por lo tanto, se espera que la isoforma Met¹-IDE se traduzca de forma menos eficiente. Asimismo, la isoforma extendida Met¹-IDE posee una secuencia de 41 aminoácidos en el extremo N-terminal de dirección mitocondrial [103]. Sin embargo, actualmente no se conoce el papel que desempeña cada una de las isoformas.

	M ₁	↓	M ₄₂
human	M R Y R L A W L L H P A L P S T F R S V L G A R L P P P E R L C G F O K K T Y S K M N N P A I . . .		
rat	M R N G L V W L L H P A L P S T L H S I L G A R P P P V K R L C G F P K Q I Y S T M N N P A I . . .		
mouse	M R N G L V W L L H P A L P G T L R S I L G A R P P P A K R L C G F P K Q T Y S T M S N P A I . . .		

Figura 12. Secuencia N-terminal de IDE. Secuencias conservadas entre distintas especies mamíferas (humano, rata y ratón). Dos posibles puntos de inicio de la traducción: Met¹ y Met⁴², que dan lugar a las isoformas mitocondrial y citosólica, respectivamente. Marcadas en negrita la Metionina (M) de inicio de traducción Met¹ y Met⁴². Subrayado en negro la posición de la mutación H18R en el modelo de rata diabética Goto-Kakizaki, explicado en detalle en la Sección 1.3.5. La flecha indica el sitio de corte predicho de la isoforma Met¹-IDE. Imagen tomada de Leissring *et al.* [103].

3.4.3 Funciones de IDE

Históricamente, el papel de IDE se ha relacionado con su actividad como proteasa, siendo la insulina su principal diana [122]. Esta enzima presenta una alta afinidad por la insulina, con una Km de aproximadamente 0,1 μM [121]. Sin embargo, también es capaz de degradar otros sustratos con menor afinidad, como el glucagón y la somatostatina, los cuales, junto con la insulina, participan en la regulación del metabolismo [106]. Además, IDE degrada la grelina, lo que regula apetito y el metabolismo energético. Entre otros sustratos degradados por IDE se encuentran el péptido amiloide (Aβ), la amilina y la calcitonina [121, 123]. La transición evolutiva de procariotas a eucariotas condujo a una ampliación y sofisticación de las funciones de IDE, principalmente a través de la incorporación de las secuencias señal, que resultaron fundamentales para su papel en la regulación de los procesos metabólicos y fisiológicos en organismos multicelulares [104].

Asimismo, los factores de crecimiento similares a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II) son sustratos de IDE que actúan como inhibidores competitivos de la misma sobre la degradación de la insulina [124].

No obstante, la degradación de múltiples péptidos, además de la insulina, indica que IDE desempeña múltiples funciones en distintos procesos celulares. Uno de los ejemplos más característicos refiere a la degradación de proteínas amiloides, que previene la formación y acumulación de agregados tóxicos que conducen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer [125].

Además de su papel en la degradación de péptidos, se han descrito diversas funciones no proteolíticas de IDE relacionadas con su interacción con otras proteínas como: α -sinucleína, proteína del retinoblastoma (RB), sirtuina-4 (SIRT4) o la glicoproteína E del virus de la varicela zóster (VVZ) [126, 127]. A su vez, IDE regula el sistema ubiquitina-proteasoma [128], participa en la respuesta UPR (respuesta a proteínas mal plegadas) [129], y se ha propuesto como reguladora del shock térmico, ya que puede estar implicada en la regulación de la homeostasis celular y la progresión del cáncer [130, 131]. Adicionalmente, se ha demostrado que IDE interactúa con múltiples proteínas ribosomales mitocondriales, así como con proteínas implicadas en la síntesis y ensamblaje de los complejos mitocondriales I y IV [132].

Estas observaciones ponen de manifiesto que una función o regulación inadecuada de IDE podría contribuir a la etiología de las enfermedades metabólicas.

3.4.4 IDE en la progresión de Diabetes Mellitus Tipo 2

El papel de la enzima IDE en diferentes tejidos de pacientes diabéticos es controvertido debido a las diferencias en los criterios de inclusión, tipos de enfermedad y etapas de desarrollo de la enfermedad en los estudios.

Diversas investigaciones han relacionado alteraciones en la expresión y actividad de IDE con el desarrollo de la DM2, como: 1) La identificación de una

conexión entre polimorfismos genéticos en el locus de *Ide* y un mayor riesgo de desarrollar DM2 [7, 8]. Estos polimorfismos también se han relacionado con una disminución en el aclaramiento hepático de insulina [133]; 2) El aumento en la actividad de IDE en los eritrocitos de pacientes DM2 que toman sulfonilureas, aunque no se encontró lo mismo en pacientes con DM1 con buen control glucémico [134]; 3) El aumento de la expresión y función de IDE en pacientes tratados con metformina [135]; 4) Una mayor actividad de IDE en el plasma y los eritrocitos de pacientes dependientes y no dependientes de insulina [136]; 5) La asociación entre los niveles reducidos de IDE y un menor aclaramiento de insulina en pacientes DM2 [137]; 6) La vinculación de menor actividad de IDE en el hígado con un menor aclaramiento de insulina y niveles elevados de insulina plasmática [138, 139]; 7) La disminución en la expresión hepática de IDE en individuos con DM2 [140]; 8) El incremento en los niveles de IDE en suero en pacientes con síndrome metabólico [141].

En conjunto, estos hallazgos sugieren que IDE es una enzima multifuncional con funciones específicas según el tejido y que su actividad se ve alterada en pacientes DM2. Esto subraya la importancia de comprender el papel específico de IDE.

3.4.5 Modelos preclínicos

Con el fin de dilucidar la función fisiológica de IDE y su vínculo con la patogénesis de la DM2, se han desarrollado y caracterizado varios modelos de roedores que han ayudado a comprender esta relación. Ejemplo de ello es el estudio de expresión génica en el modelo de rata diabética Goto-Kakizaki (GK), que ha podido relacionar el locus *Ide* con la susceptibilidad a debutar con DM2. Fakhrai-Rad et al. identificaron dos mutaciones en IDE (H18R y A890V) que actúan de manera sinérgica para reducir la capacidad de degradar insulina y aumentar la glucemia. Sorprendentemente, la mutación H18R se encuentra en la secuencia mitocondrial de IDE [133].

ABLACIÓN TOTAL DE IDE

Farris *et al.* fueron los primeros en desarrollar un modelo murino con deleción genética total del gen *Ide* (IDE-KO; IDE *knock-out*), lo que les permitió estudiar los efectos sistémicos de la deficiencia de IDE. Este modelo exhibió una marcada intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia a los 6 meses [142, 143]. En un estudio posterior, Abdul-Hay y colaboradores corroboraron estos hallazgos en su propio modelo de ratón IDE-KO, en el cual a los 6 meses de edad se observó una pronunciada hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa e insulina, junto con hiperglucemia y un incremento en la masa corporal [144]. En contraste, estos ratones IDE-KO de 2 meses de edad presentaron una mejora significativa en varios parámetros metabólicos en comparación con los controles. Mostraron una mejor tolerancia a la glucosa e insulina, así como menor masa corporal y glucemia en ayunas, a pesar de tener niveles de hiperinsulinemia similares a los observados en ratones de 6 meses. Estos resultados sugieren que la deficiencia de IDE puede generar un estado metabólico beneficioso en etapas tempranas de la vida, que se deteriora con la edad, exacerbando las alteraciones metabólicas características de la DM2.

Finalmente, el mismo modelo animal fue analizado nuevamente por Steneberg *et al.* La caracterización metabólica de ratones de 2 meses de edad reveló una intolerancia a la glucosa sin resistencia a la insulina ni hiperinsulinemia [145]. Steneberg *et al.* destacaron la importancia de IDE en la regulación de la secreción de insulina, ya que los ratones con eliminación total de IDE mostraron una disminución en la secreción de insulina por las células β del páncreas.

En conjunto, estas contraposiciones sugieren que el estudio en ratones con deleción global de IDE podría no ser el modelo más efectivo para dilucidar la función de IDE en la regulación de la homeostasis de la insulina y la glucosa.

Dado que la IDE es una proteína ubicua, los modelos de deleción total o los inhibidores farmacológicos proporcionan solo una visión global de los efectos metabólicos, lo que puede enmascarar las interacciones específicas de cada tejido. Esto limita la capacidad de entender cómo actúa IDE de manera

diferenciada en la homeostasis de la glucosa. Por ello, la creación de modelos KO específicos para ciertos tipos celulares resulta clave para identificar de manera más precisa el impacto de la IDE en los tejidos responsables de la regulación de la insulina y la glucosa. En la última década, nuestro grupo ha desarrollado varios modelos de ratón con delección del gen *Ide* en tejidos específicos, lo que ha permitido evaluar cómo la falta de esta enzima afecta la degradación de la insulina y la homeostasis de la glucosa en diferentes contextos fisiológicos.

Beta-IDE-KO

Los ratones con supresión específica de *Ide* en las células β pancreáticas (B-IDE-KO) presentan una disfunción significativa en la secreción de insulina, caracterizada por una secreción constitutiva y elevados niveles de péptido C en plasma, lo que sugiere una inmadurez funcional de las células β . Además, se observó un aumento en el transportador de glucosa GLUT1, lo que indica una mayor captación de glucosa a bajas concentraciones, posiblemente vinculado a la secreción anómala de insulina. Por otro lado, GLUT2, el principal transportador en células β , mostró una reducción en su localización en la membrana plasmática. Este modelo subraya la importancia de la IDE en la regulación de la secreción de insulina dependiente de glucosa [146].

Alpha-IDE-KO

El fenotipo de la delección específica de *Ide* en las células α del páncreas (A-IDE-KO) se caracteriza por una proliferación aumentada de las células α , lo que conduce a una hiperplasia significativa en los islotes pancreáticos. Esta expansión celular desregulada sugiere que el IDE juega un papel importante en la limitación de la proliferación de estas células. Además, provoca una disfunción en la secreción de glucagón, lo que resulta en niveles anormalmente altos de esta hormona. Esta liberación descontrolada de glucagón altera el equilibrio glucémico, contribuyendo potencialmente a un estado de hiperglucemia en los ratones A-IDE-KO. Este fenotipo evidencia cómo IDE no solo es crucial para la degradación de la insulina, sino también para la regulación de la función y crecimiento de las células α , lo que tiene implicaciones importantes en el control

del metabolismo de la glucosa y en la posible aparición de desórdenes como la diabetes [147].

Liver-IDE-KO

La ablación hepática de *Ide* (L-IDE-KO) provoca elevados niveles de glucosa en sangre, tanto en ayunas como posprandial, junto con intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. A pesar dicha resistencia, los niveles plasmáticos de insulina en los ratones L-IDE-KO no mostraron diferencias significativas en comparación con los ratones control. Sorprendentemente, no presenta alteraciones en el aclaramiento [148].

La señalización de la insulina en el hígado está alterada en los ratones L-IDE-KO. Se ha detectado una reducción en los niveles del receptor de insulina en la membrana plasmática, junto con una disminución en la activación de las proteínas implicadas en esta vía. Esto sugiere que la eliminación de IDE compromete la capacidad del hígado para responder adecuadamente a esta hormona, lo que contribuye a la resistencia insulínica [148]. Además, se ha observado un aumento de FoxO1 en los núcleos celulares, lo que se asocia con una regulación al alza de los genes gluconeogénicos *Pck1* y *G6pc*. Esto conlleva un incremento de la producción de glucosa en el hígado y contribuye a la hiperglucemia.

En resumen, la eliminación específica de IDE en el hígado provoca disfunciones en la regulación de la glucosa y resistencia a la insulina, sin afectar a su degradación. Esto sugiere que la IDE hepática no es un factor principal en la degradación de la insulina en el organismo, lo que tiene implicaciones importantes para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a la IDE en el tratamiento de la DM2.

Profundizando en el estudio de este modelo, se expuso a los ratones L-IDE-KO a una dieta rica en grasas (HFD; *High Fat Diet*: 35% de carbohidratos y 45% de grasas) [149]. Los ratones L-IDE-KO alimentados con HFD muestran una mayor resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa [148]. La dieta HFD desencadena niveles elevados de insulina plasmática en ayunas y en

posprandial en L-IDE-KO en relación con el control. Además, se ha observado que el aclaramiento hepático de insulina permanece inalterado, lo que sugiere que el incremento en los niveles plasmáticos de esta hormona se debe más a un aumento compensatorio de la función de las células β que a alteraciones en su degradación hepática. Estos resultados indican que la función de IDE en el hígado es crucial para mantener la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina, especialmente en un contexto de obesidad inducida por una dieta alta en grasas.

SOBREENPRESIÓN DE IDE

En el estudio sobre el aumento de función de IDE en el hígado de ratones, se investigó el impacto de IDE en el contexto de la obesidad inducida por la dieta. [149]. Los hallazgos principales indican que los ratones con mayor función hepática de IDE muestran mejor tolerancia a la glucosa y mayor sensibilidad a la insulina tras una dieta alta en grasas, sin cambios significativos en los niveles de glucosa, peso corporal o ingesta de alimentos. Se ha observado una reducción significativa en los niveles plasmáticos de insulina y péptido C, lo que indica una respuesta más eficiente a la hormona. Además, se ha observado una disminución en los niveles de GLUT2 y un aumento en GLUT1, lo que sugiere que esta alteración podría mejorar la captación y el metabolismo de la glucosa en el hígado. También se ha encontrado una mayor asociación entre IDE y el receptor de insulina mediante un estudio de inmunoprecipitación, lo que indica que IDE podría regular el tráfico intracelular del receptor y afectar la señalización de la insulina.

Los resultados muestran que mejorar la función de IDE en el hígado puede ser beneficioso para la homeostasis de la glucosa y la insulina, y posiciona a IDE como un posible objetivo terapéutico para la diabetes tipo 2 y la obesidad.

En conclusión, estos modelos de ratón han demostrado ser útiles para comprender mejor las funciones específicas de IDE en diferentes tejidos y ponen de manifiesto la importancia de IDE en la patogénesis de la diabetes y su posible potencial terapéutico.

3.4.6 IDE como diana farmacológica

INHIBIDORES DE IDE

A lo largo de los años, IDE ha sido considerada como una diana terapéutica en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a reducir la degradación de la insulina. Desde el descubrimiento de la IDE en 1949 por I. Arthur Mirsky [150], se ha propuesto que la inhibición farmacológica de IDE podría ser una terapia antidiabética viable al bloquear la degradación de insulina y potenciar su señalización. Hasta 2010 no existían inhibidores farmacológicos selectivos de esta enzima [151]. Los primeros intentos de confirmar el papel de IDE en la degradación de la insulina utilizaron inhibidores como bacitracina, N-etilmaleimida y 1,10-fenantrolina [151-153]. Sin embargo, estos inhibidores eran no específicos y de baja potencia, lo que dificultaba la interpretación de los resultados ya que los efectos observados podrían deberse a la inhibición de otras enzimas.

Frente a la necesidad de desarrollar inhibidores selectivos para IDE, se tuvo en cuenta la estructura terciaria de esta enzima. Desde entonces, se han desarrollado numerosos inhibidores de IDE con mejor potencia y selectividad, como li1, BDM41367, BDM44768 y 6bK, [151-153] aunque los resultados en modelos preclínicos han sido variados mostrando efectos conflictivos sobre la tolerancia a la glucosa y la acción de la insulina. Uno de los más prometedores es 6bk, un péptido cíclico que se une al *exosite* bloqueando la unión de sustratos al sitio activo. Los estudios demostraron que 6bK mejora la tolerancia a la glucosa oral y disminuye los niveles de glucosa en sangre en ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasas. Sin embargo, causó intolerancia a la glucosa cuando se inyectó glucosa por vía intraperitoneal.

Por otro lado, se caracterizaron dos nuevos inhibidores de la IDE, NTE-1 y NTE-2 [154], que se unen al sitio de anclaje del sustrato en la región IDE-N. Similar a 6bK, mejoró la tolerancia a la glucosa oral en ratones obesos inducidos por dieta, pero no hubo efectos en la tolerancia a la insulina.

Estos estudios destacan la controversia y la necesidad de desarrollar inhibidores de IDE que sean específicos, con el fin de lograr resultados terapéuticos efectivos en DM2.

Sin embargo, estudios recientes ponen en duda la eficacia de estas terapias de inhibición, ya que sugieren que la desregulación de IDE está implicada en el desarrollo y progresión de DM2. Aunque los inhibidores de IDE se diseñaron para aumentar la disponibilidad de insulina al bloquear su degradación, los estudios han revelado resultados controvertidos y una variabilidad en los niveles y la función de esta proteína en los ensayos clínicos con pacientes que debutan DM2. Por lo tanto, se plantea la posibilidad de que el desarrollo de activadores de IDE, en contraposición a los inhibidores, puede ser una estrategia farmacológica más eficaz para el tratamiento de la DM2.

ACTIVADORES DE IDE

Recientes investigaciones han revelado avances significativos en la activación de IDE. Un estudio destacado identificó dos compuestos, denominados la1 e la2, que aumentan notablemente la actividad proteolítica de IDE [155]. Además, Kraupner et al. han informado sobre un nuevo activador del sitio de unión ATP llamado BDM35899 [156, 157]. En otro ámbito, ciertos polifenoles como el resveratrol han demostrado afectar la degradación de A β sin tener efecto sobre la insulina. Esto sugiere la posibilidad de activar IDE de manera específica para diferentes sustratos [158]. La carnosina, identificada también como un activador específico de IDE para sustratos como la insulina y el A β , presenta limitaciones debido a su baja biodisponibilidad ya que se degrada rápidamente en el torrente sanguíneo [159]. Otros activadores como la suramina, han mostrado ser incapaces de cruzar la membrana celular y, debido a su toxicidad, no son adecuados para investigaciones *in vivo* [160]. Adicionalmente, se identificaron compuestos poliaromáticos que mostraron una activación selectiva de la degradación de insulina por IDE [161], así como activadores basados en indoles que demostraron ser efectivos tanto en la hidrólisis de A β como en la degradación de insulina por esta enzima [162].

A pesar de dichos descubrimientos, ninguno de estos compuestos ha sido empleado en investigaciones *in vivo* adicionales. En su lugar, se están evaluando nuevas moléculas más efectivas con el fin de establecer una relación estructura-actividad más sólida.

Un promotor activador es el factor de preimplantación (PIF). Se trata de un péptido de quince aminoácidos expresado tanto por el embrión de mamífero como por su placenta. Está presente en la circulación materna durante todo el embarazo ya que es necesario en el desarrollo embrionario. Desde el punto de vista clínico, dado que PIF tiene propiedades inmunomoduladoras, cabe prever su posible aplicación clínica en el tratamiento de enfermedades humanas. Asimismo, se ha demostrado que PIF tiene un papel protector contra la DM1 y las enfermedades cardiovasculares en modelos preclínicos [163, 164]. Recientemente, Sanz et al. demostraron que PIF actúa sobre la activación proteolítica de IDE en las células β pancreáticas, lo que se traduce en un aumento en la capacidad de secreción de insulina en ratones expuestos a HFD [165]. Esto implica una mejora en la tolerancia a la glucosa y, por tanto, se puede considerar un secretagogo promotor para el tratamiento de DM2.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

La proteína IDE regula el metabolismo hepático de manera independiente de su actividad catalítica.

HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

1. La actividad proteolítica de IDE sobre la insulina no es necesaria para la correcta señalización intracelular de la insulina en el hígado.
2. La regulación de la función mitocondrial en hepatocitos está mediada por la isoforma mitocondrial de IDE de manera independiente de su actividad catalítica.
3. Las isoformas mitocondrial y citoplasmática de la enzima IDE desempeñan un papel regulador en la dinámica mitocondrial en hepatocitos.

4.2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Investigar el papel específico de la enzima degradadora de insulina (IDE) en el metabolismo hepático y su influencia en la señalización intracelular en hepatocitos, independientemente de su actividad proteolítica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar y caracterizar una línea celular HepG2 con depleción de IDE mediante la técnica de edición genética dirigida CRISPR/Cas9.
2. Evaluar la actividad no proteolítica de IDE en la señalización de la insulina en células HepG2.
3. Estudiar el impacto de IDE en la función y estructura mitocondrial en hepatocitos *in vitro* y *ex vivo*.
4. Evaluar la actividad no proteolítica de IDE en la respiración mitocondrial en hepatocitos.

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 ANIMALES EXPERIMENTALES

5.1.1 Instalaciones animales

Los ratones se alojaron en jaulas ventiladas con un horario de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad en el animalario de la Universidad de Valladolid (UVa, España). Se les proporcionó agua y comida ad libitum, con una dieta estándar (Ssniff Spezialdiäten GmbH # V1534-703, 19% de proteína, 3.3% de grasa).

Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Animal de la Universidad de Valladolid y por las autoridades de la Junta de Castilla y León (JCyL) (Protocolo #5003931) de acuerdo con las Directrices Europeas para el Cuidado y Uso de Mamíferos en Investigación (Comisión Directiva Europea 86/609/CEE y Real Decreto Español 1201/2005)

5.1.2 Modelos animales

RATÓN IDE-KO TOTAL

El ratón IDE-KO fue proporcionado por el Dr. Malcom Leissring de la Universidad de California (Irvine, EE.UU.) Estos son ratones C57BL/6J con eliminación de *Ide* en todo el organismo. Tienen sitios LoxP que flanquean el exón 3 del gen *Ide* [144]. La recombinación Cre-LoxP resulta en la delección del exón 3 del gen, lo que causa un desplazamiento del marco de lectura con dos codones de parada en el exón 4 y, por tanto, una terminación temprana de la traducción.

RATÓN L-IDE-KO

Para generar ratones con eliminación de IDE específicos de hígado, se utilizó el sistema de recombinación Cre-LoxP. Para ello, se cruzaron ratones Alb-Cre (The Jackson Laboratory, USA), que expresan la recombinasa Cre bajo el control del promotor de la albúmina presente en los hepatocitos [166], con ratones *Ide*^{flox/flox}. Así, se obtuvo nuestra camada experimental *Ide*^{flox/flox}; Alb-Cre/+, denominada L-IDE-KO.

5.1.3 Genotipado de ratones

Para el genotipado de las colonias de ratones L-IDE-KO, se realiza una PCR con ADN genómico extraído de la cola del ratón. Un pequeño fragmento de cola de aproximadamente 3 mm se incuba en 50 μ l de Quick Extract (Epicentre, EE.UU.) a 65 °C durante 8 minutos, seguido de agitación y 2 minutos de incubación a 98 °C. La preparación de la reacción PCR se indica en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Reactivos para la mezcla de una reacción de PCR.

Reactivo	Volumen (μ L)
Muestra DNA	1
Buffer de reacción 5x (Bioline, UK)	8
Primer Forward 100 μ M (Metabion, Germany)	0.2
Primer Reverse 100 μ M (Metabion, Germany)	0.2
My Taq DNA Polimerasa (Bioline, UK)	0.25
H ₂ O libre de nucleasas	30.35
Volumen final	40

Mediante PCR se analizan los genes Ideflox/flox y Alb-Cre. Las secuencias de los *primers* se muestran detallados en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Secuencias de los primers utilizados para el genotipado de ratones L-IDE-KO.

Gen	Secuencia	Pares de bases
IDE^{Flox/Flox}	5'- AACTGCCACCTGTCCAATCC - 3'	WT: 418 HT: 418 y 650 Homo: 650
	5'- CTCAGGGATACAATGCGTGC - 3'	
AlbCre	5'- TGCAAACATCACATGCACAC - 3'	Positivo: 351 y 390 Negativo: 351
	5'- TTGGCCCCTTACCATAACTG - 3'	
	5'- GAAGCAGAAGCTTAGGAAGATGG - 3'	

Los productos de la PCR se mezclan con tampón de carga para ADN (Bioline, Reino Unido), se cargan en un gel de agarosa al 2% y se realiza la electroforesis en tampón TBE (89 mM Tris-HCl, pH 7,6, 89 mM ácido bórico y 2 mM EDTA). El gel se tiñe con RedSafe (Invitrogen, EE.UU.) y las bandas se visualizan con un transiluminador de luz ultravioleta mostrando diferentes patrones según el genotipo (**Figura 13**).

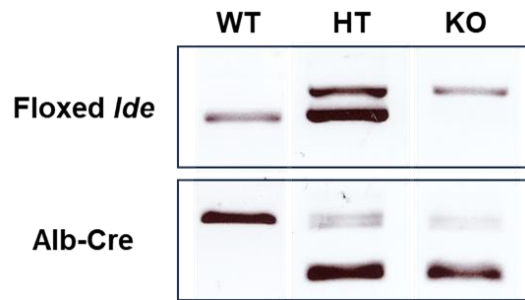


Figura 13. Imagen representativa del genotipo de los ratones L-IDE-KO. *WT* (*wild type*): *Ide*^{+/+}; *Alb-Cre*^{-/-}. *HT* (heterocigoto): *Ide*^{flox/+}; *Alb-Cre*^{+/+}. *KO* (L-IDE-KO): *Ide*^{flox/flox}; *Alb-Cre*^{+/+}.

5.1.4 Aislamiento de hepatocitos

El aislamiento de hepatocitos primarios se realiza en ratones WT, IDE-KO total y L-IDE-KO de 3 meses sin ayuno. El aislamiento es un proceso mediante el cual se digiere el hígado con colagenasa y se separan los hepatocitos del resto del contenido tisular.

Tras anestesiar al ratón con isoflurano (IsoVet®, B. Braun VetCare, Alemania), se abre la pared abdominal y se corta el diafragma, se canula la vena cava superior a través de la aurícula derecha y se anuda la vena cava antes y después de su paso por el hígado (**Figura 14**).

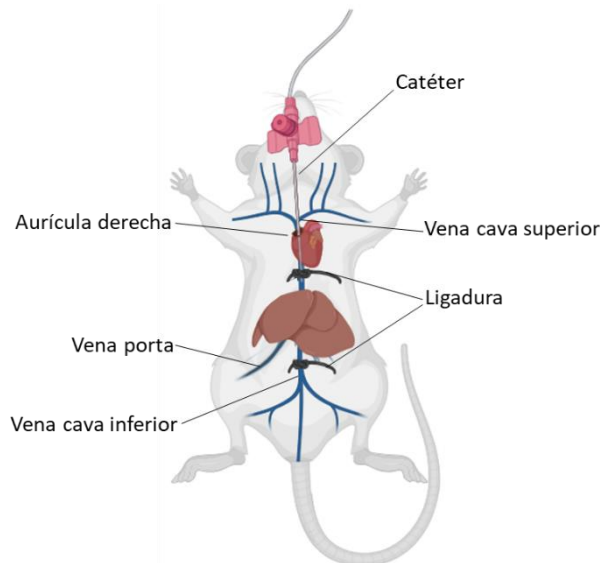


Figura 14. Cirugía para la extracción de hepatocitos primarios.

A continuación, se utiliza una bomba pulsante a 200 μ l/s para perfundir el hígado con 25 ml de una solución de perfusión atemperada a 37 °C para eliminar

la sangre del hígado. La solución contiene HBSS (Solución Salina Equilibrada de Hank) sin calcio ni magnesio (Gibco #14175-053), 10 mM HEPES pH 7.4 (Gibco #15630-056), 0.2 mM EGTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 3 mg/50ml de heparina (Sigma-Aldrich, H3393-100KU). Seguidamente, para digerir el hígado, se perfunde a 150 µl/s una solución de colagenasa a 37 °C. Esta solución contiene colagenasa 20 mg/50ml (Sigma-Aldrich Aldrich, C5138), 10 mM HEPES pH 7.4 y medio Willians E (Gibco #22551-022).

Una vez producida la digestión, los hepatocitos se disgregan por disociación mecánica del tejido y se someten a una filtración con medio de cultivo (DMEM:F12 (Gibco #31330-095), 10% FBS (v/v) (Gibco, #A5670701) 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (Invitrogen Ltd, Europe). Tras una centrifugación a 50 x g durante 5 minutos, el pellet se resuspende en su medio de cultivo y se vierte sobre una solución isotónica de Percoll (GE Healthcare, 17-0891-01), que contiene HBSS y 150 mM NaCl, y se centrifuga a 200 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y los hepatocitos son lavados con medio de cultivo y centrifugados de nuevo. De esta manera, se obtienen hepatocitos purificados mediante separación por densidad.

5.2 CULTIVOS CELULARES

5.2.1 Línea celular HepG2

La línea celular de hepatocitos humanos HepG2, derivada de un hepatocarcinoma bien diferenciado, fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC, USA). Las células fueron mantenidas en medio MEM (Gibco, #11095080) 10% FBS (v/v), 2 mM L-glutamina, 5,5 mM glucosa y 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina. Las células fueron cultivadas a 37 °C con 5 % CO₂ en una atmosfera húmeda.

5.2.2 Línea celular AML12

La línea celular de hepatocitos AML12, derivados de hígado normal de ratón, fue obtenida de ATCC. Las células fueron mantenidas en medio DMEM:F12 con 10% FBS (v/v), 2.5 mM L-glutamina, 16 mM glucosa, 10 µg/ml insulina, 5.5 µg/ml transferrina, 5 ng/ml selenio, 40 ng/ml dexametasona, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina. Las células fueron cultivadas a 37 °C con 5 % CO₂ en una atmosfera húmeda.

5.2.3 Hepatocitos primarios

Tras la extracción de hepatocitos según el protocolo explicado en el apartado 1.1.4, se siembran 350.000 células/ml en placas de 6 pocillos previamente tratadas con colágeno (Sigma Aldrich, C3867-1VL) para mejorar su adhesión. Las células se mantienen a 37 °C con 5 % CO₂ en una atmosfera húmeda.

5.3 GENERACIÓN DE HEPG2-IDE-KO

Para la eliminación de la enzima IDE en la línea celular HepG2 se empleó la técnica de edición genética CRISPR/Cas9, contando con la colaboración del Dr. Miguel Ángel de la Fuente, experto en edición génica del IBGM de Valladolid.

El sistema de edición CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) junto con la proteína Cas9, fue desarrollado como un mecanismo de defensa bacteriano frente a infecciones por fagos y transferencia de plásmidos natural [167]. Este mecanismo ha sido adaptado para modificar secuencias genómicas específicas. El sistema CRISPR se basa en una secuencia corta no codificante de ARN guía (gRNA) de 20 nucleótidos que hibrida con la secuencia objetivo y recluta a la endonucleasa Cas9 (**Figura 15**).

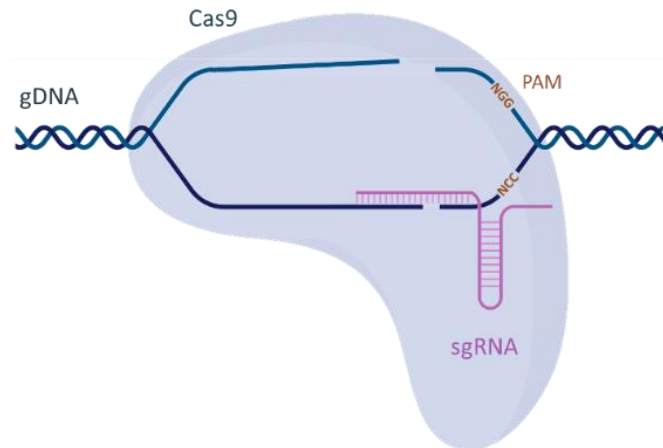


Figura 15. Sistema CRISPR/Cas9. El gRNA hibrida con el fragmento de interés en el ADN genómico y, Cas9 que reconoce los gRNA, corta el ADN.

Para que Cas9 produzca un corte es necesario que en el ADN diana exista una secuencia PAM (motivo adyacente al *protospacer*), compuesta por tres nucleótidos (NGG, donde N es cualquier nucleótido y G es guanina) inmediatamente después del extremo 3' de la secuencia objetivo. La nucleasa Cas9 realiza cortes en la doble cadena de ADN. Dichos cortes pueden repararse de manera natural mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación dirigida por homología (HDR). La NHEJ puede causar errores como inserciones o deleciones, mientras que la HDR permite la inserción precisa de secuencias [168, 169]. El sistema CRISPR/Cas9 se utiliza para eliminar genes (*knock-out* o KO), insertar secuencias (*knock-in* o KI) o realizar sustituciones.

La estrategia para generar el *knockout* en HepG2 consistió en diseñar unas guías de RNA, es decir, secuencias cortas de ARN que hibridan de manera complementaria con las secuencias que flanquean el exón 4 del ADN genómico de *Ide*. Estas guías son reconocidas por la caspasa Cas9, quien realiza un corte en ambas cadenas del ADN. Esto genera un codón de parada prematuro que permite eficazmente la síntesis de esta proteína. Para garantizar dicha interrupción y facilitar la selección de los clones con el gen delecionado, se insertó un casete de blasticidina en lugar del exón 4 eliminado. Este proceso se realizó mediante recombinación homóloga al introducir en las células un plásmido donante AVV-MCS que porta el gen de resistencia a la blasticidina flanqueado por brazos homólogos del gen *Ide*.

5.3.1 Diseño de RNA guías

El programa CRISPOR (Concordet and Haeussler, 2018) se utiliza para para diseñar las dos guías de ARN, adyacentes a una secuencia PAM en 3', localizadas al inicio y al final del exón 4 (**Tabla 3**). Estas guías contienen la secuencia de interés y la secuencia promotora T7 para la amplificación por PCR y la región constante de crRNA/tracrRNA necesaria para la edición con CRISPR/Cas9.

RNA guía	Secuencia
gRNA 1	F: 5'- TAATACGACTCACTATAG GCTGTAGGTATCTTAAAGTT - 3' R: 5'- TTCTAGCTCTAAAAC AAC TTT AAG ATA CCT ACA GC - 3'
gRNA 2	F: 5'- TAATACGACTCACTATAG CCA TGA ACT GTA TAT GCC AT - 3' R: 5'- TTCTAGCTCTAAAAC ATG GCA TAT ACA GTT CAT GG - 3'

Tabla 3. Secuencias de los gRNA. *Primers* utilizados para generar los gRNA con el kit GeneArt. En azul se resaltan los pares de bases que coinciden con la secuencia de ADN. Los *primers forward* (F) contienen sin resaltar la secuencia promotora T7, mientras que los *primers reverse* (R) contienen sin resaltar la secuencia 5' del final de la secuencia constante del crRNA/tracrRNA necesaria para el reconocimiento de la maquinaria CRISPR/Cas9.

5.3.2 Diseño del plásmido donante

Para la reparación de los cortes de la nucleasa Cas9, se diseña un plásmido con un casete de resistencia al antibiótico blastidina. La secuencia del gen de resistencia estaba flanqueada por dos brazos de homología: brazo 1, homólogo al extremo 5' de la secuencia de ADN reconocida por la primera guía (intrón 3), y brazo 2, homólogo al extremo 3' de la secuencia de ADN reconocida por la segunda guía (intrón 4). En primer lugar, se realiza una PCR convencional para amplificar los brazos de homología (**Tabla 4**). Una vez amplificados se digieren con las enzimas de restricción *NotI*, *Sall* y *EcoRI* para ser ligados flanqueando el gen de resistencia a la blastidina en el plásmido donante.

Tabla 4 Secuencias de los *primers* utilizados para generar el plásmido donante. *Primers* utilizados para la amplificación los brazos de homología que flanquean el gen de resistencia a la blasticina en el plásmido donante AVV-MCS.

Primers	Secuencia
Brazo 1	F: 5'- ATAGCGGCCGCATTATCAAGGCAAGGTTATGGG - 3' R: 5'- AATGTCGACGATACCTACAGCTAATAAATTAAC - 3'
Brazo 2	F: 5'- TAAGAATTCGGCATATACAGTTCATGGCATA - 3' R: 5'- ATAGCGGCCGCTCACATTCCATTCTTGACATACC- 3'

Para llevar a cabo la edición es necesario transfectar las células HepG2 con las dos secuencias gRNA, el ADN donante y la proteína Cas9. La transfección se realiza mediante electroporación utilizando el Neon Transfection System (ThermoFisher Scientific, Waltha MA, EEUU)

De esta manera, tras el doble corte producido por la Cas9 en los dos lugares reconocidos por los gRNA, se produce la recombinación con el plásmido donante y se inserta el gen de resistencia en las células editadas (**Figura 16**).

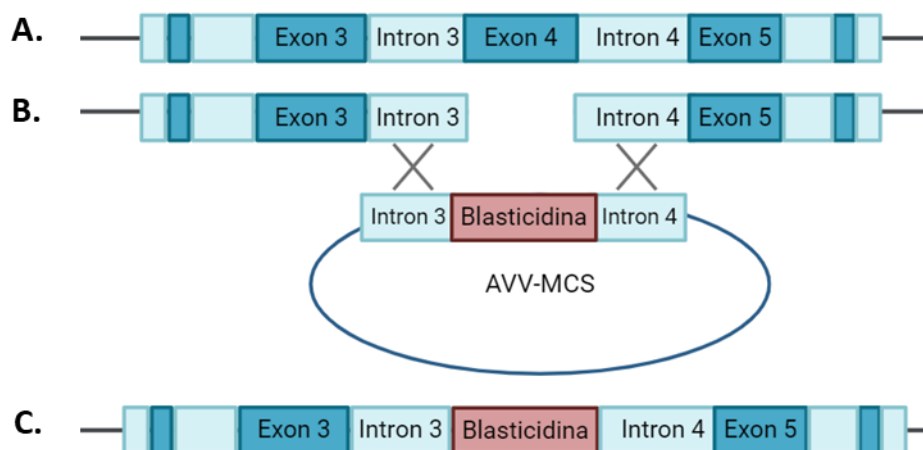


Figura 16. Generación de la línea HepG2-IDE-KO. A) Secuencia genómica original. **B)** Eliminación del exón 4 tras la hibridación de las gRNA y actuación de Cas9. Recombinación homóloga con el plásmido donante a través de las regiones de homología. **C)** ADN genómico de *Ide* en el que se ha sustituido el exón 4 por el gen de resistencia a blasticina, lo que genera una proteína truncada.

5.3.3 Selección de clones editados

Tras la transfección, las células se siembran en placas de 6 pocillos para que se estabilicen. Tras 24 horas de recuperación se levantan las células con tripsina y se vuelven a sembrar para formar clones individuales, es decir, colonias derivadas de una sola célula que son genéticamente idénticas. Para ello, se realiza una dilución límite en placas de 96 pocillos, en los que la siembra se realiza a densidad celular baja (entre 2 y 0.1 células/pocillo) para asegurar el crecimiento a partir de una única célula. Las placas se incuban a 37 °C, durante 48 horas y, posteriormente se añade 3 µg/ml de blasticina al medio de cultivo (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

Esta concentración de antibiótico es letal para las células HepG2 que no han incorporado el casete de resistencia del ADN donante. Por lo tanto, solo resisten a la blasticina aquellas células que han sido modificadas genéticamente.

5.4 AML12-SHRNA-IDE

Para generar una línea estable de hepatocitos AML12 con silenciamiento de IDE se utilizó un vector shRNA lentiviral. El vector utilizado fue el MISSION® Lentiviral Transduction Particles (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, SHC003) que codifica la secuencia de ratón shRNA-IDE 5'-GCTTGCTATTAGAGAGACAAA - 3' en la región 3'UTR para la línea silenciada y, en paralelo un vector vacío generando la línea control.

Los lentivirus integran su material genético en el genoma del huésped utilizando la maquinaria celular de este, produciendo una integración genómica estable del trasgen. El vector utilizado pLKO.1-puro-CMV-TurboGFP™ (**Figura 17**) es un vector lentiviral de expresión basado en retrovirus. Contiene el gen de resistencia a la puomicina, que permite la selección de células diana que expresan de forma estable el shRNA y un gen que codifica GFP, impulsado por el promotor CMV, que funciona como marcador fluorescente.

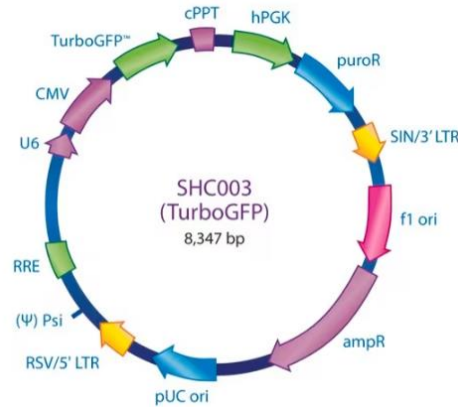


Figura 17. Mapa del vector de expresión pLKO.1-puro™. Lentivector basado en retrovirus. Contiene el gen de resistencia a la puromicina, que permite la selección farmacológica de las células objetivo que expresan de manera estable el shRNA, y un gen de GFP, que funciona como marcador fluorescente.

La línea celular AML12 se siembra a una concentración de 150.000 células/ml en placas de 6 pocillos. Tras 24 horas, obteniendo una confluencia del 80%, se añaden las partículas lentivirales con una multiplicidad de infección de 10 MOI junto con 8 µg/mL bromuro de hexadimetrina (Polibreno) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Trascorridas 72 horas, se observa la eficacia de la transducción mediante fluorescencia y se retira el medio de infección para incubar las células con medio de cultivo DMEM:F12 que contiene 2 µg/mL de puromicina para comenzar la selección de las células del cultivo que han sido infectadas. La eficiencia de silenciamiento de IDE se comprueba mediante Western Blot.

De esta manera se obtienen dos nuevas líneas celulares; las células silenciadas AML12-shRNA-IDE y, las células control AML12-shRNA-control, las cuales se generan mediante la transducción con el vector pLKO.1 sin inserto.

5.5 ENSAYOS CELULARES

5.5.1 Transfección celular

FOSFATO CÁLCICO

La línea celular de hepatocitos HepG2 se transfecta mediante este método basado en la formación de un precipitado entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos, lo que facilita la entrada del ADN en las células. Como tanto la membrana celular como las moléculas de ADN están cargadas negativamente, los iones del calcio neutralizan las cargas de las moléculas para disipar las fuerzas de repulsión y así, permitir su entrada [170].

Para lograr una confluencia del 80% el día de la transfección, se siembran 150.000 células/ml en placas de 6 pocillos. Dos horas antes del inicio de la transfección, se realiza un cambio de medio y se prepara una mezcla de 1 µg de ADN plasmídico con 0.25 M CaCl₂ y una solución HEBS (HEPES 50 mM, NaCl 140 mM y Na₂HPO₄ 1.5 mM) gota a gota. La mezcla se incuba durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, el contenido se mezcla y se agrega a las células gota a gota para distribuirlo uniformemente. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24-48 horas.

LIPOFECCIÓN

La transfección con lípidos catiónicos se basa en la formación de complejos entre los lípidos y el ADN [171] y, transfecta tanto la línea celular de hepatocitos AML12 como los hepatocitos primarios. Estos complejos facilitan la entrada de ADN gracias a su afinidad por la membrana plasmática.

Entre los lípidos catiónicos, la lipofectamina (Thermo Fisher Scientific, 2024), que tiene la capacidad de formar vesículas en el citoplasma celular y transportar la carga genética de manera segura, es el método más común de lipofección.

No todos los tipos celulares tienen la misma capacidad ni eficacia de transfección con los mismos métodos. Por ello, se han desarrollado distintas herramientas y reactivos que mejoran la transfección en cada tipo celular. En el

caso de los hepatocitos primarios la línea celular AML12, se realiza la transfección con Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific, #L3000001). Se siembran 120.000 y 150.000 células/ml, respectivamente, en placas de 24 pocillos para lograr una confluencia del 80% el día de la transfección. Una vez hecho el cambio de medio, se diluye 1 µg de ADN plasmídico en 25 µl de Opti-MEM (Gibco, #31985070), se combina el ADN diluido con una solución de 33% Lipofectamina 3000 y 25% de reactivo P3000 (v/v) diluido en Opti-MEM. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se agrega a las células gota a gota para distribuirlo uniformemente y se incuba a 37°C y 5% de CO₂ durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo, se realiza un cambio de medio y se incuban 24-48 horas.

ELECTROPORACIÓN

La electroporación se basa en producir un pulso eléctrico a un voltaje determinado que perturba la membrana plasmática de las células y da lugar a la formación de poros temporales [172]. Este método se utilizó para transfectar la línea celular HepG2, con el fin de generar el clon en el que se deleciona IDE del genoma mediante CRISPR/Cas9.

Esto se realizó mediante el sistema de transfección Neon™ Transfection System (ThermoFisher Scientific, Waltham MA, EEUU, #MPK5000S) el cual utiliza puntas de pipeta que contienen electrodos chapados en oro como cámara de electroporación. En general, el uso de un sistema de microporación presenta importantes ventajas, como la eficacia de transfección y la viabilidad celular, en comparación con las cámaras de electroporación convencionales basadas en cubetas [173].

Siguiendo las instrucciones de la casa comercial, después de centrifugar 10⁶ células, 5 minutos a 400 x g, se resuspenden en 60 µl de buffer de resuspensión R (Invitrogen, #MPK10096). A continuación, se genera el complejo ribonucleoproteico en el que se añaden a 50 µl solución de Buffer R, 2 µg de cada gRNA generada (Apartado 1.3.1) y 5 µg de la proteína purificada Cas9 v2 TrueCut (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, se añade el complejo a la resuspensión celular, junto con 1 µg del plásmido ADN donante.

Con ayuda de la pipeta Neon™ se sumerge la mezcla en el tubo Neon™, conectado al sistema, que contiene buffer electrolítico E2 (Invitrogen, #MPK10096).

Tras un pulso eléctrico de 50 ms a 1200 V, se siembran las células electroporadas en medio de cultivo MEM suplementado a 150.000 células/ml y, se dejan recuperar por 24 horas a 37 °C, con 5 % CO₂ en una atmosfera húmeda.

5.5.2 Estimulación con insulina

Las células HepG2 se siembran a una densidad de 150.000 células/ml en placas de 6 o 24 pocillos. Al día siguiente, las células se incuban en medio libre de suero durante 18 horas antes del experimento. Transcurrido el tiempo, se tratan con 100 nM de insulina humana (Sigma-Aldrich, I9278, USA) en medio libre de suero a 0, 5, 15 y 30 minutos.

5.5.3 Estimulación con glucagón

Las células HepG2 Y AML12 se siembran a una densidad de 150.000 células/ml en placas de 6 o 24 pocillos. Al día siguiente, las células se incuban en medio libre de suero durante 18 horas antes del experimento. Transcurrido el tiempo, se tratan con 50 ng/ml de glucagón (Sigma-Aldrich, G2044, USA) en medio libre de suero a 0 y 1 hora.

5.6 BIOLOGÍA MOLECULAR

5.6.1 Vectores plasmídicos

Los vectores plasmídicos son moléculas de ADN circulares de doble hebra que tienen la capacidad de replicarse de manera autónoma dentro de las bacterias. Estos se utilizan para introducir genes diana, tanto de manera estable como transitoria, en células de mamífero mediante métodos de transfección.

Los vectores de expresión, además de su función de replicación y amplificación, suelen contener elementos genéticos necesarios para la transcripción y la traducción. Entre ellos, se pueden encontrar:

- **Promotores:** los promotores de citomegalovirus (CMV) y del factor de traducción 1 α (EF1 α) promueven la expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero.
- **Secuencia de terminación:** las secuencias de la hormona de crecimiento bovina (BGH) y del virus de simio 40 (SV40) promueven la poliadenilación y la terminación de la transcripción, haciendo que la proteína expresada sea más estable.
- **Origen de replicación:** pUC, f1 y SV40 se utilizan como sitios de replicación para bacterias, fagos y mamíferos, respectivamente.
- **Gen de resistencia:** la transcripción del gen de neomicina es iniciado por el promotor SV40. Tras la transfección en células de mamífero, se realiza una selección añadiendo neomicina en el medio de cultivo para mantener las células que expresan el vector. Además, el gen de resistencia a la ampicilina permite al plásmido mantenerse por selección en bacterias *E. coli*.
- **Sitios de clonación múltiple (MCS):** contiene varios sitios de restricción de uso común, para facilitar el clonaje y la inserción de fragmentos de ADN.

A continuación, se presentan los plásmidos de expresión utilizados para el desarrollo de la tesis doctoral.

pcDNA3.1-hIDE

El vector pcDNA3.1 que contiene la secuencia ADNc mitocondrial de IDE humana, fue obtenido del clon MGC:117026 IMAGE:40008464 (I.M.A.G.E Consortium) (**Figura 18**). Este vector se tomó como punto de partida para el desarrollo de la colección de ADNc de las secuencias de interés en distintos vectores de expresión, utilizando técnicas de biología molecular.

pcDNA3.1 es un vector de expresión de 5,4 kb derivado de pcDNA diseñado para la expresión transitoria y estable de proteínas recombinantes en células de mamífero. Contiene el promotor CMV, utilizado habitualmente para expresión transitoria, y un gen de resistencia a neomicina para la selección de líneas celulares estables.

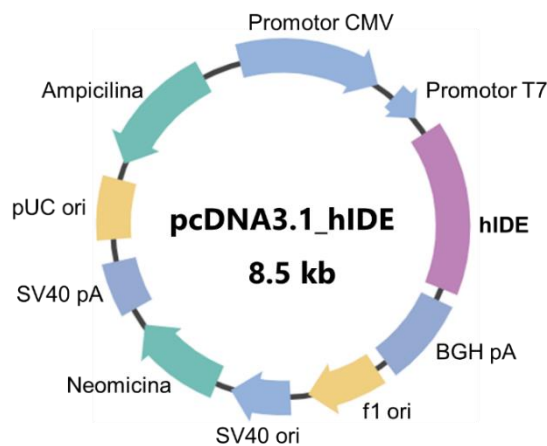


Figura 18. Mapa del vector de expresión pcDNA3.1_hIDE. Contiene el gen de *Ide* humano y un gen de resistencia a neomicina que permite su selección en células que lo expresen de manera estable.

pEF1-GFP

El vector pEF1 es un derivado de pcDNA3.1 para la sobreproducción de proteínas recombinantes en líneas celulares de mamíferos. Contiene el promotor del factor de elongación humano 1 α (hEF-1 α) y un gen de resistencia a neomicina para la expresión y selección de líneas celulares estables, respectivamente (**Figura 19**).

Bajo el promotor hEF-1 α (promotor del factor de elongación humano 1 α) se encuentra una secuencia que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP), lo que resulta en la expresión combinada de la proteína de interés junto

con el fluoróforo. GFP tiene un máximo de excitación de 488 nm y una longitud de emisión de 507 nm.

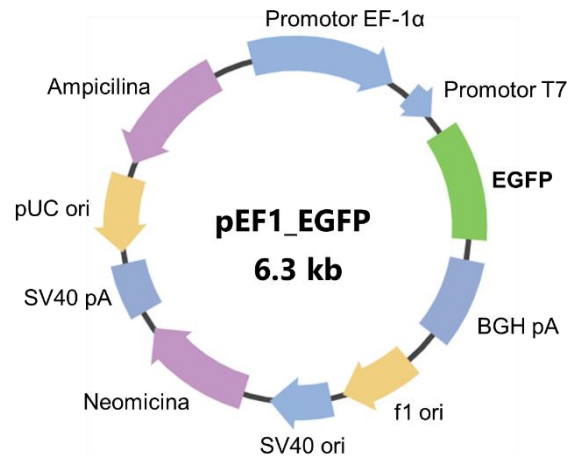


Figura 19. Mapa del vector de expresión pEF1_EGFP. Contiene el gen EGFP que funciona como marcador fluorescente y, un gen de resistencia a neomicina que permite su selección en células que lo expresen de manera estable.

pCMV6-mRFP

El vector pCMV6-AC contiene la secuencia ADNc de mRFP (OriGene, # PS100010), que engloba la proteína fluorescente roja (RFP) junto con una secuencia de dirección mitocondrial (**Figura 20**). Su interés de debe a la facilidad para el marcaje de mitocondrias en células de mamífero. RFP tiene un máximo de excitación de 555 nm y una longitud de emisión de 584 nm.

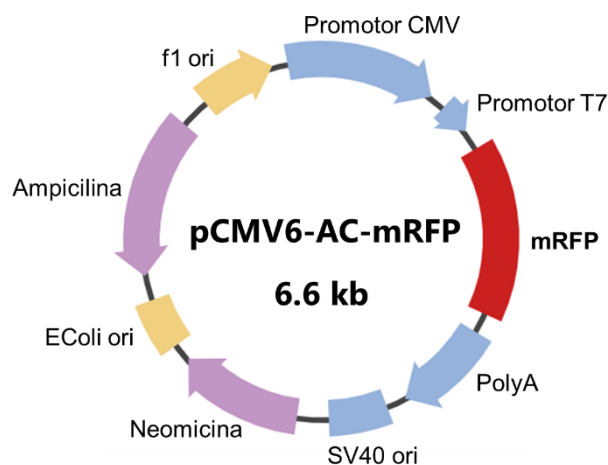


Figura 20. Mapa del vector de expresión pCMV6_mRFP. Contiene el gen RFP unido a una secuencia mitocondrial, que funciona como marcador fluorescente específico en la mitocondria y, un gen de resistencia a neomicina que permite su selección en células que lo expresen de manera estable.

5.6.2 PCR cuantitativa

La reacción en cadena de la polimerasa es un método eficaz en el que se produce una amplificación enzimática de una secuencia de ADN específica. Los ciclos térmicos (**Tabla 5**) permiten que los *primers* se unan a la secuencia de interés en el ADN molde y la amplifique gracias a una ADN polimerasa termoestable.

Tabla 5. Condiciones de PCR para la amplificación de secuencias de ADN.

Fase	Temperatura	Tiempo	Repetición
Inicio	94 °C	5 min	x1
Desnaturalización Anillamiento Extensión	95 °C	30 seg	x30
	55 °C	30 seg	
	72 °C	45 seg	
Extensión final	72 °C	4 min	x1
Final	4 °C	∞	x1

Los productos de reacción se visualizan mediante electroforesis de ADN. Cada muestra obtenida se mezcla con el buffer de carga y se carga en el gel de agarosa al 1% p/v, donde se producirá la electroforesis a 120 V durante 30 minutos en buffer TBE 1x (89 mM Tris-HCl, pH 7.6, 89 mM ácido bórico y 2 mM EDTA). El gel de agarosa se tiñe con RedSafe y las bandas se visualizan con un transiluminador de luz ultravioleta.

5.6.3 Digestión enzimática

Las endonucleasas conocidas como enzimas de restricción escinden el ADN de doble cadena cuando reconocen un patrón de secuencia específico, donde se produce la hidrólisis del enlace fosfodiéster dentro de la secuencia de nucleótidos definida. Cada enzima se caracteriza por su sitio de reconocimiento, generando fragmentos de ADN lineal con extremos romos o cohesivos, lo que facilita la clonación de secuencias de interés en plásmidos de manera específica. En todo vector plasmídico se encuentra un sitio de clonación múltiple que abarca

varios sitios de restricción de uso común que facilita la clonación y la inserción de un nuevo fragmento.

Para llevar a cabo esta reacción enzimática se incubó el ADN plasmídico con la enzima específica a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, se purificó el ADN mediante cromatografía en columna con ayuda del Kit de purificación de banda de gel y ADN para PCR GFX (Cytiva, #28-9034-66). En la **Tabla 6** se indican las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo, las cuales generan extremos cohesivos.

Tabla 6. Enzimas de restricción utilizadas en este trabajo, que generan extremos cohesivos.

Enzima	Secuencia y corte
<i>BamHI</i>	G▼GATCC
<i>NotI</i>	GC▼GGCCGC
<i>EcoRI</i>	G▼AATTC
<i>SalI</i>	G▼TCGAC
<i>SpeI</i>	A▼CTAGT
<i>NheI</i>	G▼CTAGC

5.6.4 Ligación

En la ligación, dos fragmentos de ADN con extremos romos o cohesivos compatibles hibridan para formar una sola cadena de ADN. En este trabajo, los productos de PCR amplificados se han ligado a ADN plasmídico linearizado, mediante una reacción con la enzima T4 Ligasa (New England Biolab, #NEB.M0202S) a 25 °C 2 horas o a 16 °C 18 horas, produciendo un plásmido recombinante.

Es importante tener en cuenta la compatibilidad de los extremos de ambos fragmentos y la dirección en la que se quiere hibridar. Los extremos romos se unen con mayor facilidad, sin necesidad de hibridación. Por otro lado, los extremos cohesivos deben ser compatibles y capaces de hibridar los nucleótidos presentes en la cadena larga, como se muestra en la (**Figura 21**)

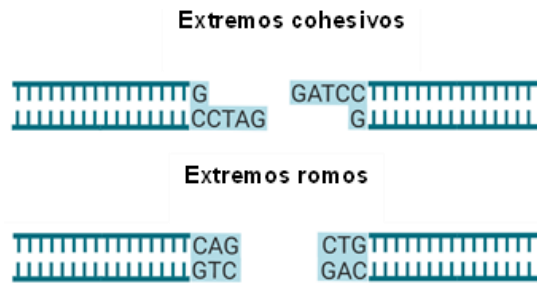


Figura 21. Extremos cohesivos y romos. Extremos de ADN generados por las enzimas de restricción. Los extremos romos se unen sin necesidad de secuencias complementarias específicas, lo que los hace menos específicos en sus uniones. En cambio, los extremos cohesivos poseen secuencias sobresalientes de nucleótidos que requieren complementariedad para hibridar de forma precisa, lo que asegura una unión más específica entre fragmentos de ADN.

5.6.5 Transformación bacteriana

En la transformación, las bacterias son capaces de introducir el ADN libre del entorno. Para que este proceso ocurra, la bacteria debe estar en un estado de competencia, que ocurre cuando la bacteria presenta alteraciones en su pared y membrana celulares, y esto permite la entrada de ácidos nucleicos en la célula [174].

Los vectores plasmídicos generados por ligación o como producto de PCR se transforman en bacterias *Escherichia coli* competentes (*E. coli* DH-10 β) mediante un protocolo de choque térmico, en el que se incuban en hielo las bacterias junto con el plásmido de interés durante 30 minutos y, a continuación 45 segundos a 42°C y 2 minutos en hielo. Inmediatamente después, se incuba la mezcla con medio de cultivo bacteriano *Luria Bertani* (LB) (Sigma Aldrich, #L3397) durante 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se siembra la mezcla en la superficie de una placa de agar con ampicilina y se extiende con ayuda de un asa de siembra estéril. Debido a que todos los plásmidos de trabajo contienen un gen de resistencia a la ampicilina, la presencia de esta en el medio provoca la selección bacteriana, lo que significa que solo crecerán colonias de bacterias transformadas con el plásmido de interés. Tras 18 horas, se inoculan algunas de las colonias que han crecido en la placa de agar, se analizan mediante PCR y se incuban en agitación durante 18 horas a 37 °C con medio de cultivo LB para obtener una mayor cantidad de bacterias, de las cuales se extraerá el plásmido de trabajo.

5.6.6 Extracción de plásmido en bacterias

Las bacterias crecidas se centrifugan a 16,000 x g durante 30 segundos. Se descarta el sobrenadante y se añaden 175 µl de Tampón de lisis 7 (solución isotónica que contiene RNAsa A) para resuspender el *pellet*, seguido de 175 µl de Tampón de lisis 8 (solución alcalina donde el ADN genómico y las proteínas se desnaturalizan) mezclando suavemente hasta obtener una solución clara y viscosa. A continuación, se añaden 350 µl de Tampón de lisis 9 (solución de acetato que neutraliza el pH del lisado y elimina DNAsas y RNAsas) y se centrifuga durante 4 minutos a 14.000 x g. Se transfiere el sobrenadante a la columna, y se centrifuga durante 30 segundos a 14.000 x g para unir el ADN. Se lava la columna con 400 µl de Tampón de lavado 1 (contiene etanol que elimina los residuos de sales y contaminantes), y se centrifuga durante 1 minuto a 14.000 x g. Para eluir el contenido de la columna se añaden 50 µl de H₂O libre de DNAsas y se incuba 30 segundos a temperatura ambiente y se centrifuga durante 30 segundos a 14.000 x g.

5.7 CLONACIÓN DE GFP-IDE

5.7.1 Generación del vector recombinante

Para estudiar el papel de IDE en el metabolismo hepático, así como su localización y tráfico intracelular, se parte de un vector de clonación pcDNA3.1 que contiene la secuencia completa del gen *Ide*. Este gen parte de su codón de inicio Met¹, que corresponde a la isoforma mitocondrial.

DISEÑO DE LOS VECTORES DE CLONACIÓN

Con la finalidad de hacer estudios de localización, se diseña un vector que contiene el gen de *Ide* junto con la secuencia que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP), lo que resulta en la expresión combinada de la proteína de interés junto con el fluoróforo (**Figura 22**).

DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y LIGACIÓN EN PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN

Este producto de PCR se digiere con la enzima de restricción *NotI* que forma un extremo 3' cohesivo. Esta misma enzima se utiliza en el vector pEF1-EGFP, que genera el mismo extremo 3' cohesivo compatible para la inserción del gen en la dirección deseada.

En cambio, en el extremo 5' del inserto no se realiza ninguna digestión, lo que origina un extremo romo. Para asegurar la compatibilidad del inserto con el vector en el extremo 5' se requiere un extremo romo. Para ello, se digiere con *EcoRI*, que produce un extremo cohesivo y, posteriormente, se incubaba con *Klenow* para obtener un extremo romo (**Figura 23**). Tras la digestión enzimática, tanto el producto de PCR como el vector pEF1-EGFP digeridos se purifican mediante columna.

El fragmento de ADN purificado se liga al vector pEF1-EGFP utilizando la enzima ADN T4 Ligasa, lo que genera así un vector circular. Tras la ligación, se sigue el protocolo de transformación bacteriana y extracción del ADN, de lo que se obtiene ADN plasmídico purificado pEF1-EGFP-*Ide*, tanto de la isoforma mitocondrial Met¹, como de la isoforma citoplasmática Met⁴².

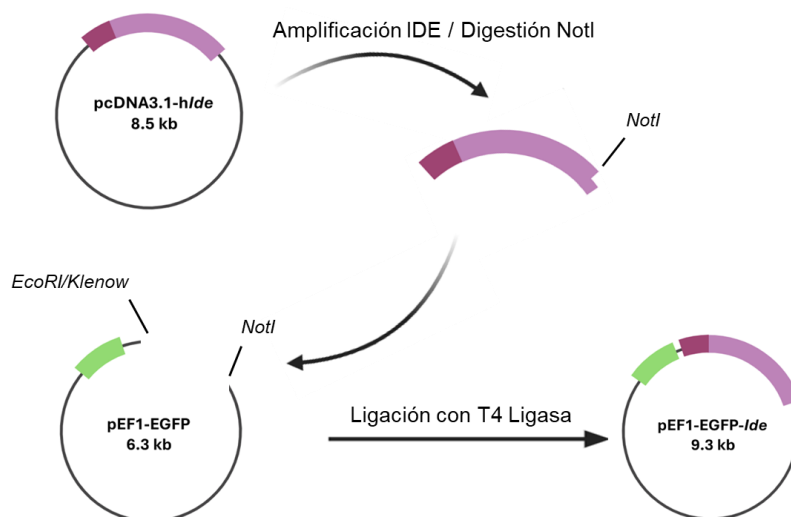


Figura 233. Estrategia de clonación. A partir del vector pcDNA3.1 se amplifica el fragmento correspondiente al gen de *Ide* y se digiere con enzimas de restricción compatibles con las utilizadas en la digestión del plásmido receptor pEF1-EGFP. De esta manera, al favorecer la ligación del fragmento de *Ide* al vector pEF1-EGFP, se obtiene un plásmido recombinante que expresará la proteína GFP-IDE.

5.7.2 Mutagénesis dirigida de la isoforma mitocondrial de IDE

Las mutaciones puntuales de los aminoácidos IDE^{H108L}, IDE^{H108Q}, IDE^{E111Q} y IDE^{K898A, K899A, S901A} se realizan mediante mutagénesis dirigida en el gen de *Ide* insertado en el vector pEF1- GFP-*Ide*-Met¹. En la **Figura 24** se muestran los cambios de bases que suponen una variación en la codificación del aminoácido..

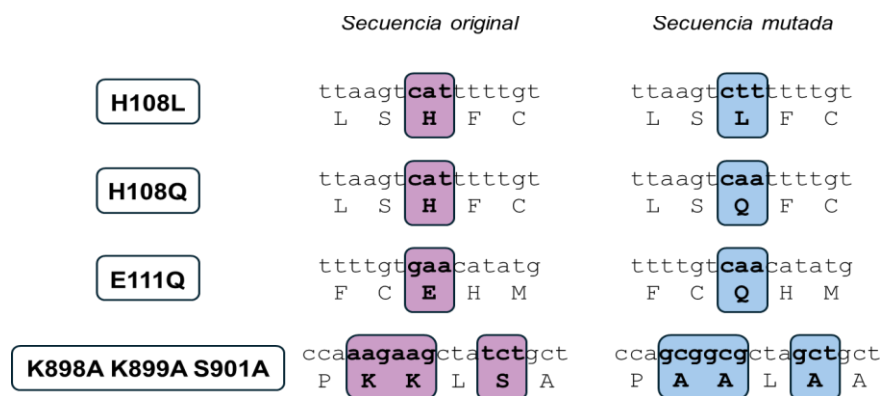


Figura 24. Secuenciación de las mutaciones en pEF1-GFP-*Ide* mitocondrial. Comparación de fragmentos de la secuencia de ADN original y las mutaciones puntuales realizadas para alterar la codificación del código genético. Secuencia original (morado) y secuencia modificada (azul).

Para llevar a cabo este proceso, se realizan distintas PCR para cada una de las mutaciones (**Tablas 12 y 13**), lo que genera de nuevo plásmidos circulares.

Tabla 8. Secuencias de primers. Primers utilizados para las mutagénesis dirigidas del gen *Ide* en el sitio catalítico. En negrita se encuentran marcados los nucleótidos que conforman el aminoácido de interés y, el subrayado hace referencia al nucleótido modificado que produce un cambio la codificación del aminoácido.

Mutación	Primer	Secuencia
H108L	Forward	5'- CCAAATATTGCTGGCTTAAGT C <u>TTTTTT</u> GTGAACATATGC - 3'
	Reverse	5'- GCATATGTTCACAAAA A <u>AG</u> ACTTAAGCCAGCAATATTTGG - 3'
H108Q	Forward	5'- CCAAATATTGCTGGCTTAAGT CA <u>A</u> TTTTGTGAACATATGC - 3'
	Reverse	5'- GCATATGTTCACAAAA IT <u>G</u> ACTTAAGCCAGCAATATTTGG - 3'
E111Q	Forward	5'- CTGGCTTAAGTCATTTTTGT CA <u>A</u> CATATGCTTTTTTTGGG - 3'
	Reverse	5'- CCCAAAAAAGCATATG TTG <u>A</u> CAAAAATGACTTAAGCCAG - 3'

Tabla 9. Secuencias de primers. *Primers* utilizados para las mutagénesis dirigidas del gen *Ide* en el sitio de unión del polianión. En negrita se encuentran marcados los nucleótidos que conforman el aminoácido de interés y, el subrayado hace referencia al nucleótido modificado que produce un cambio la codificación del aminoácido.

Mutación	Primer	Secuencia
K898A,K899A,S901A	Forward	5' - CGTCGACTAGACAAACCAG CGGCG CTAG CT GCTGAGTGTGC - 3'
	Reverse	5' - GCACACTCAGC AGC TAG CGCCGC TGGTTTGTCTAGTCGACG - 3'

5.8 PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

5.8.1 Purificación de ARN

Para el aislamiento total de ARN, los hepatocitos primarios se homogenizan en Trizol™ (Invitrogen Life Technologies, USA) y se centrifugan durante 10 minutos a 2800 x g para eliminar las muestras no disueltas. A continuación, se añade cloroformo (PanReac AppliChem, Alemania) al sobrenadante para extraer el ARN, y se centrifuga durante 15 minutos a 2800 x g, lo que provoca la formación de dos fases debido a la diferencia de densidad: la fase orgánica fenólica que contiene ADN y residuos de proteínas desnaturalizadas (fase inferior), y la fase acuosa superior que contiene ARN. La fase que contiene ARN se transfiere a un nuevo tubo, donde se añade isopropanol (PanReac AppliChem, Alemania) y se centrifuga durante 10 minutos a 2800 x g para precipitar el ARN. Posteriormente, se descarta el sobrenadante y el sedimento se lava con etanol al 75% y se deja secar.

Finalmente, el sedimento de ARN se resuspende en agua libre de ADNasa/ARNasa, y la cuantificación del ARN total se realiza midiendo la absorbancia ultravioleta en un espectrofotómetro de espectro completo NanoDrop® ND-1000 (Marshall Scientific, USA). La eliminación de cualquier posible contaminación por ADN genómico se logra tratando las muestras con el kit RapidOut de eliminación de ADN (Thermo Scientific™, USA).

5.8.2 Síntesis de ADNc

La hebra de ADN complementario (ADNc) se sintetiza utilizando el kit de síntesis de cDNA iScript™ (Bio Rad, EE. UU.), La reacción de transcripción inversa se incubaba en un termociclador (Thermo Scientific™, EE. UU.).

5.8.3 qPCR

Los niveles de ARNm del gen diana y de ARNm de referencia se determinan mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) con ensayos TaqMan™ en un sistema LightCycler® 480. Las qPCR se realizan con cantidades iguales de ADNc por triplicado para cada muestra, utilizando Maxima Probe qPCR Master Mix (Thermo Scientific™, EE.UU.)

Los datos se analizan utilizando el protocolo de cuantificación absoluta de 2 puntos de ajuste y fijando el umbral de fluorescencia en 1,00. Los niveles de expresión del ARNm diana se normalizan utilizando el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [175] en función de los niveles de ARNm del gen de referencia para la proteína ribosómica L18 (*Rpl18*), como ha sido reportado por nuestro laboratorio en estudios previos [148].

Los *primers* caseros y la sonda del ensayo de expresión génica TaqMan™ para *Rpl18* de ratón son:

Tabla 10. Secuencias RT-PCR. *Primers* y sonda TaqMan™ para el ensayo de expresión génica del gen *Rpl18* en hepatocitos de ratón.

Gen	Reactivo	Secuencias
<i>Rpl18</i>	<i>Primers</i>	F: 5' - AAGACTGCCGTGGTTGTGTGG - 3'
		R: 5' - AGCCTTGAGGAGGATGCGACTC - 3'
	Sonda	5' - FAM TTCCAAGCTGAAGGTGTGTGTGTGCA-BHQ1 - 3'

Las referencias de los ensayos de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems, EE.UU.) se indican en la **Tabla 8**:

Tabla 11. Sondas Taqman™ comerciales utilizadas para PCR cuantitativa.

Gen	Descripción	Referencia
<i>Pck1</i>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	Mm00839363_m1
<i>G6pc</i>	Glucosa-6-fosfatasa	Mm00839363_m1

5.9 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE IDE

La actividad IDE se analiza con el kit de ensayo fluorométrico de IDE SensoLyte® 520 (AnaSpec, Inc., CA, EE.UU.). El ensayo utiliza un sustrato FRET (Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) que consta de una secuencia de proteína precursora amiloidea (APP) unida al fluoróforo 5-carboxifluoresceína (5-FAM) y un supresor de la fluorescencia QXL 520 (**Figura 25**). Cuando la IDE activa escinde el sustrato, se produce un aumento de la fluorescencia de 5-FAM, que tiene su máximo de excitación de 490 nm y una longitud de emisión de 5820nm.

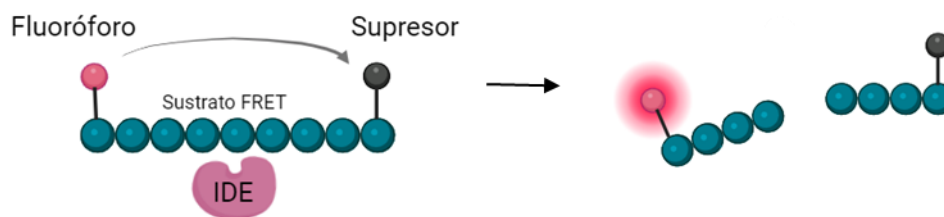


Figura 25. Ensayo de actividad de IDE. El sustrato FRET tiene dos componentes: un fluoróforo y el supresor (QXL® 520). En su estado intacto, el supresor bloquea la fluorescencia del fluoróforo. Cuando la proteasa IDE degrada el sustrato, se separan, lo que permite que la fluorescencia sea detectada, indicando actividad enzimática.

Para la preparación de las muestras, se recogen alrededor de 10^6 células HepG2 en 100 μ l de tampón de ensayo frío (AnaSpec, Inc., EE.UU.) en presencia de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, Merck Life Science, EE.UU.) y PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) (Merck Life Science). Los homogeneizados se incuban en hielo durante 15 minutos, seguidos de una centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C para separar y desechar los materiales insolubles. La reacción enzimática se inicia añadiendo 50 μ l de lisado celular y 50 μ l de solución de sustrato FRET a cada pocillo en una placa

de 96 pocillos. La placa se agita suavemente durante 30 segundos y la fluorescencia de la muestra (5-FAM) se monitoriza en el lector multiplaca GENios Pro TECAN (TECAN, Suiza) cada 5 minutos durante 100 minutos a 37 °C.

Para los análisis cinéticos, todas las lecturas de fluorescencia se expresan en unidades de fluorescencia relativa (RFU). Los datos de RFU se representan en función del tiempo y de la porción lineal se normalizan los datos obtenidos por el contenido en proteínas mediante BCA (ThermoFisher Scientific, #23235) para, obteniendo la actividad específica de IDE expresada en RFU/ μ g de proteína total/min.

5.10 ESTUDIO METABÓLICO EN TIEMPO REAL

El análisis bioenergético se lleva a cabo con el analizador de flujo extracelular XFe24 (Seahorse Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.) con el kit XF Cell Mito Stress Test (Agilent, 103015-100). Con esta tecnología se obtienen datos de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y de acidificación (ECAR) del medio extracelular, proporcionando información sobre la actividad mitocondrial de la célula.

Las líneas celulares de hepatocitos (HepG2 y AML12) se siembran a 45.000 células/ml por pocillo en placas de cultivo (Agilent, 100777-004) para lograr una confluencia del 80% el día del ensayo. Tras 24 horas, antes de comenzar con el ensayo, se sustituye el medio de cultivo por 500 μ l de medio DMEM sin rojo fenol (Agilent, 103575-100), suplementado con 10 mM de glucosa (Agilent, 103577-100), 1 mM de piruvato sódico (Agilent, 103578-100) y 2 mM de glutamina (Agilent, 103579-100). Las células se dejan equilibrar a 37°C sin CO₂ durante 1 hora. Durante la incubación, se procede a cargar el cartucho con los inhibidores de la cadena respiratoria (Kit Mito Stress Test, 103015-100) calculando una concentración final por pocillo de 2.5 μ M de oligomicina, 2 μ M de FCCP y 0.5 μ M de rotenona y antimicina.

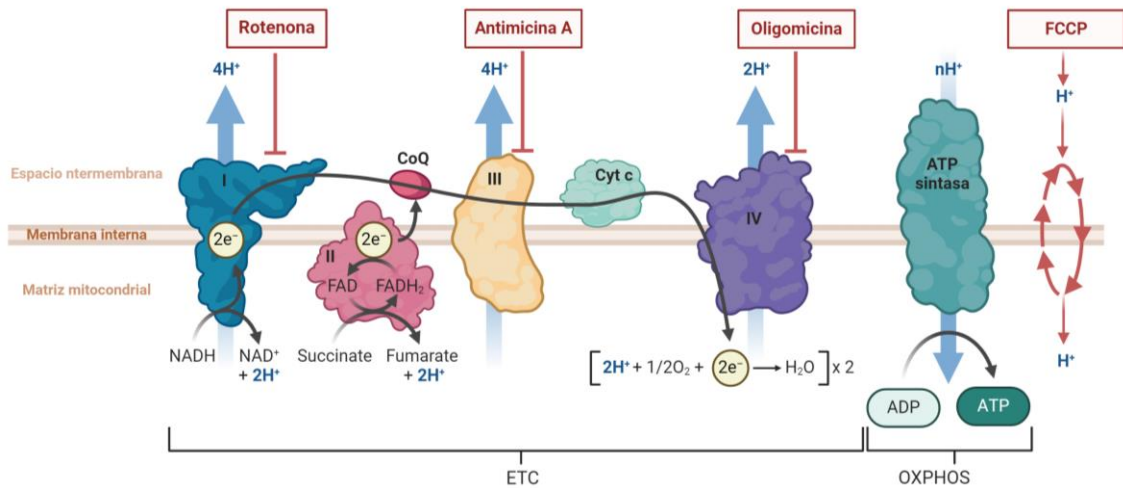


Figura 26. Moduladores de la cadena transportadora de electrones en el ensayo Mito Estrés. La rotenona/AA inhibe los complejos I y III, la oligomicina inhibe el complejo IV y, FCCP desacopla la membrana y altera el gradiente de protones.

Las medidas de respiración y acidificación se determinan cada 7 min. Tras las mediciones basales, la primera inyección es la oligomicina, que inhibe la ATP sintasa (complejo V) (**Figura 26**). Afecta o disminuye el flujo de electrones a través del ETC, lo que provoca una reducción en la respiración mitocondrial o OCR. Esta disminución de la OCR está relacionada con la producción de ATP celular. La segunda inyección es carbonil cianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), agente desacoplante que colapsa el gradiente de protones y altera el potencial de membrana mitocondrial. Como resultado, el flujo de electrones a través del ETC se desinhibe, y el consumo de oxígeno por el complejo IV alcanza el máximo (**Figura 27**). Esta medida se utiliza para calcular capacidad de la célula para responder a un aumento de la demanda energética o a una situación de estrés. La tercera inyección es una mezcla de rotenona, un inhibidor del complejo I y, antimicina A, un inhibidor del complejo III. Esta combinación detiene la respiración mitocondrial y permite el cálculo de la respiración no mitocondrial impulsada por procesos externos.

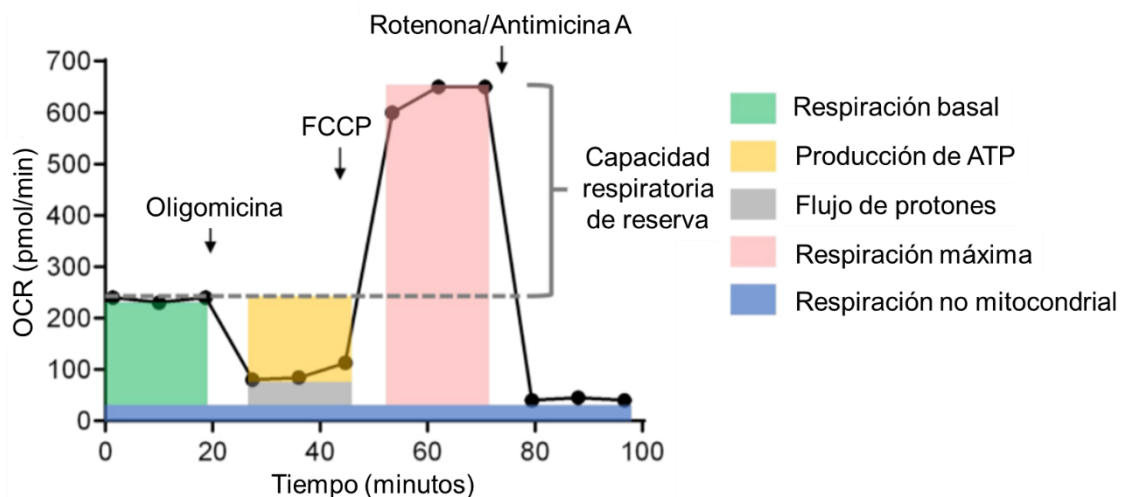


Figura 27. Gráfico que ilustra los parámetros metabólicos medidos durante el **Seahorse Cell Mito Stress Test**. Los compuestos utilizados, como oligomicina, FCCP y rotenona/antimicina A, alteran las condiciones metabólicas, permitiendo evaluar la función mitocondrial y la capacidad respiratoria de reserva. Imagen modificada de Tong *et al.* [176].

5.11 ANÁLISIS PROTEICO POR WESTERN BLOT

5.11.1 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas, se homogenizan aproximadamente 0.4×10^6 hepatocitos primarios de ratón o 1.5×10^6 células de AML12 en 50 μL y 100 μL , respectivamente, de un tampón de lisis frío (125 mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 2% (m/v) SDS y 1 mmol/L ditiotretol) suplementado con cócteles de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma, EE.UU.) y 1 mmol/L fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF; Merck Life Science, España). Los lisados se sonicán durante 3 minutos en hielo, y el contenido de proteínas se cuantifica utilizando el kit Micro BCA (Thermo Scientific, EE.UU.). Los extractos de proteínas se mezclan con LSB (Laemmli Sample Buffer: 60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol) y se calientan a 100 °C durante 5 minutos para completar la desnaturalización de las proteínas.

5.11.2 Electroforesis y Western Blot

Se separan 20 µg de proteínas solubilizadas por su peso molecular utilizando geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). La electroforesis en gel se lleva a cabo a 150 V en un tampón de electroforesis (Biorad Laboratories, EE.UU.). Tras la separación de las proteínas se transfieren a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) Immobilon-P (Millipore, EE.UU.) a 30 V durante al menos 4 horas a 4 °C en un tampón de transferencia (Biorad Laboratories, EE.UU.). Las membranas transferidas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo al 5% m/v de leche en polvo descremada en PBS-Tween20 (PBS-0.1% Tween 20). Las membranas se incuban posteriormente durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario de interés (**Tabla 9**) en una solución de bloqueo al 0.2% m/v de leche en polvo.

Tabla 12. Anticuerpos primarios para Western Blot.

Anticuerpo	Comercial	Referencia	Dilución	Incubación	Especie
IDE	Millipore	AB9210	1:40000	1h RT	Conejo
IR β	Cell Signaling	3025	1:2000	O/N 4 °C	Conejo
p-IGF-IR β (Tyr1135/1136)	Cell Signaling	3024	1:2000	O/N 4 °C	Conejo
AKT 2	Cell Signaling	3063	1:2000	O/N 4 °C	Conejo
p-AKT 2 (Ser474)	Cell Signaling	8599	1:2000	O/N 4 °C	Conejo
Drp1	Cell Signaling	8570S	1:2000	1h RT	Conejo
Mfn1	Merck	WH0055669M4	1:3000	1h RT	Ratón
Mfn2	Cell Signaling	9482S	1:2000	1h RT	Conejo
Opa1	Cell Signaling	80471S	1:2000	1h RT	Conejo
Fis1	Merck	SAB2702049	1:5000	1h RT	Conejo
GAPDH	Millipore	MAB374	1:40000	1h RT	Ratón
Actina	BD Bioscience	612656	1:5000	1h RT	Ratón

A continuación, las membranas se lavan 3 veces durante 10 minutos con PBS-Tween20 y se incuban con los anticuerpos secundarios correspondientes (**Tabla 10**) conjugados con peroxidasa de rábano picante

(HRP) en una solución de bloqueo al 0.2% m/v de leche en polvo durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tabla 13. Anticuerpos secundarios para Western Blot.

Anticuerpo	Comercial	Referencia	Dilución	Incubación	Especie
Anti-Rabbit Ig-G-HRP	Jackson Immuno	711-035-152	1:20000	30 min RT	Conejo
Anti-Mouse Ig-G-HRP	GE Healthcare	NA9310	1:5000	30 min RT	Ratón

Las membranas se lavan nuevamente con PBS-Tween20, y la actividad de la peroxidasa se visualiza utilizando el kit de quimioluminiscencia mejorada Immun-Star WesternC (Bio-Rad, EE.UU.). Las señales se detectan mediante la exposición a película de rayos X para producir bandas dentro del rango lineal. La intensidad de las bandas se cuantifica con el software ImageJ (NIH, EE.UU.). Los resultados se normalizan con los valores de control en cada membrana.

5.12 MICROSCOPIA CONFOCAL

Las células sembradas sobre cristales se lavan con PBS 1x y se fijan con 10% formalina v/v (Sigma Aldrich, #HT501128) durante 5 minutos. Los cristales se colocan sobre un portaobjetos en el que se ha depositado una gota de Fluoroshield (Sigma Aldrich, #F6057), un medio de montaje con DAPI, que marca el ADN para diferenciar los núcleos.

Una vez preparadas las muestras se procede a la captura de imágenes empleando el microscopio confocal LEICA TCS SP5, con los láseres WLL (White light laser) y 405 Diode. La captura de imágenes se realiza a una resolución de 1024x1024 con un objetivo de aceite de inversión 63X. Si se realiza una composición tridimensional de la célula, se capturan 8-12 secciones cada 0,772 μm . Se utilizaron los canales correspondientes a los tres canales cromáticos RGB (Red, Green & Blue): TRITC (558-625 nm), GREEN (500-531 nm), DAPI (449-464 nm). Las imágenes se procesaron con ayuda del programa de tratamiento de imágenes ImageJ (National Institutes of Health, NIH).

5.13 ANÁLISIS DE MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL

Las células que expresan la proteína de fluorescencia roja Cox8(MTS)-RFP dirigida a la matriz se lavan con PBS y se fijan con formalina 10% v/v durante 5 minutos. Se adquieren planos Z confocales de células que expresan la proteína fluorescente roja dirigida a la matriz mitocondrial en un microscopio confocal SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) utilizando un objetivo X63, 561 nm de excitación y 570-700 nm de emisión. Se obtienen entre 7 y 9 imágenes z-stack, con un tamaño z-step de 0,5 μm por célula. Para el análisis cuantitativo de la morfología mitocondrial a partir de redes mitocondriales unicelulares se utiliza el plugin para ImageJ/Fiji Mitochondrial Analyzer. Brevemente, las imágenes de las redes mitocondriales se preprocesan utilizando los siguientes comandos: 1) "unsharp mask" (radio = 10 píxeles; peso de la máscara = 0,6) para mejorar la nitidez de la imagen; 2) "enhance local contrast (CLAHE)" (tamaño del bloque de píxeles = 127, bins del histograma = 256 y pendiente máxima = 3) para igualar el contraste de la imagen minimizando la amplificación del ruido y 3) mediana (valor = 1,5), para reducir el ruido de filtrado. A continuación, las imágenes z-stack preprocesadas de cada célula individual se analizan con la interfaz 3D Mitochondrial analyzer, con un tamaño de bloque de 1,05 y un valor C de 9. Los parámetros de la salida de análisis proporcionada por el Mitochondrial Analyzer (longitud, volumen, esfericidad o ramificación) se expresan por célula o mitocondria.

5.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism 8.0 (CA, EE.UU.). Los datos se representan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Para verificar la normalidad de las distribuciones, utilizamos la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para analizar las diferencias estadísticas entre dos conjuntos de datos, utilizamos la prueba t de Student (datos paramétricos) o la prueba U de Mann-Whitney (datos no paramétricos). Las comparaciones entre más de dos conjuntos de datos se realizaron utilizando ANOVA de una vía para datos paramétricos y la prueba de

Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Las diferencias estadísticamente significativas se consideraron a un nivel de $p < 0.05$.

RESULTADOS

6.1 CRISPR/CAS9 EN HEPG2

El objetivo principal de este trabajo es mejorar el conocimiento acerca del papel de IDE en el metabolismo hepático. Para ello, se decidió generar un *knockout* de esta proteína en la línea celular de hepatocitos HepG2 con el fin de eliminar su expresión y observar las consecuencias de su ausencia. Además, se buscó identificar nuevas funciones no proteolíticas de IDE, con la finalidad de analizar detalladamente el papel de cada una de sus isoformas de forma individual.

La metodología utilizada para generar la línea celular HepG2-IDE-KO se basó en la recombinación homóloga inducida por CRISPR-Cas9. Este mecanismo permitió la modificación del ADN genómico, sustituyendo el exón 4 de *Ide* por la inserción del gen de resistencia a la blasticidina. Para confirmar la modificación genética de *Ide* en ambos alelos, se utilizaron las técnicas de PCR, Western Blot y análisis de actividad enzimática de IDE.

En primer lugar, los clones generados se analizaron por PCR. Los *primers* (**Figura 28A**) fueron diseñados para amplificar el exón 4 del genoma. La ausencia de banda en los clones 2, 3, 4 y 7 (**Figura 28B**) confirmó la delección de la región de interés y la inserción de la blasticidina.

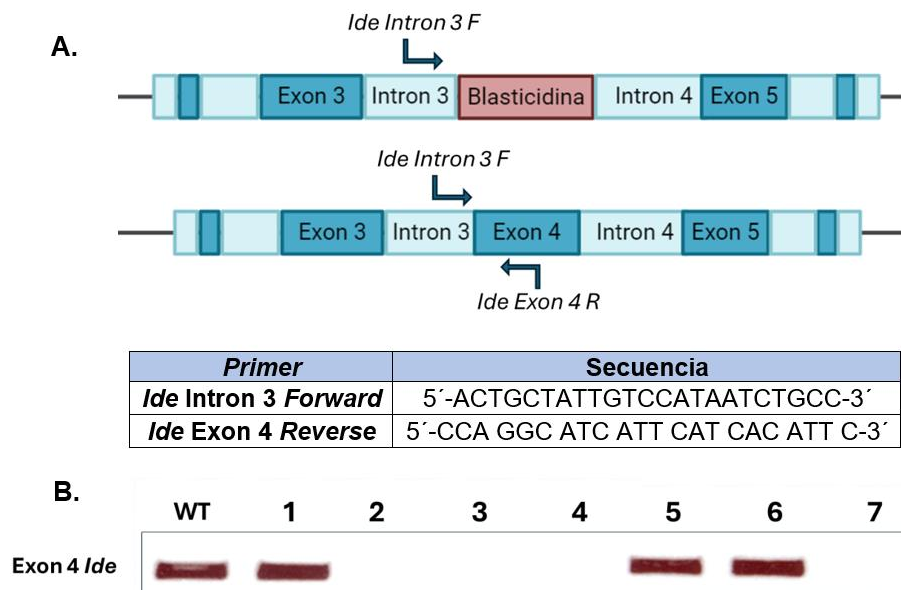


Figura 28. Comprobación de la generación de clones HepG2-IDE-KO mediante PCR. (A) *Primers* utilizados para la amplificación del exón 4 del gen *Ide*. *Primers* diseñados para la región del intrón 3 (5') y exón 4 (3'). **(B)** Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR que amplifica el exón 4.

En segundo lugar, se analizó la expresión de IDE de estos clones. Los resultados demostraron la ausencia de proteína en los clones 2, 3, 4 y 7 (**Figura 29**), a diferencia de los 1,5 y 6, cuya expresión es comparable a la del control WT.

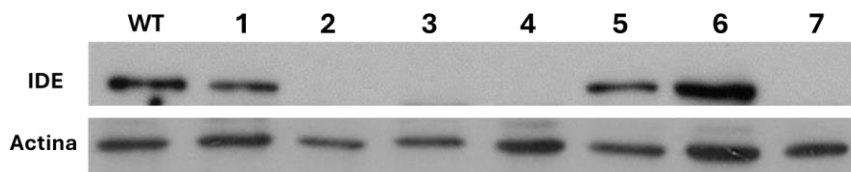


Figura 29. Expresión de IDE en clones HepG2-IDE-KO. Ausencia de expresión de IDE en clones modificados mediante CRISPR/Cas9 en comparación con el control HepG2 WT. Actina como control de carga.

Por último, se realizó un ensayo enzimático que valida de manera fehaciente la generación de clones con ausencia de *Ide*. Asimismo, se confirmó la modificación genética en los clones 2, 3, 4 y 7 en los que se observó una ausencia total de actividad catalítica (**Figura 30**). Cabe destacar la presencia de un posible heterocigoto debido a una disminución del 50% en la actividad de la proteína del clon 1 en comparación con el control.

En definitiva, tras la generación de varios clones con ausencia de IDE, se decidió tomar el clon 2 como modelo principal del estudio.

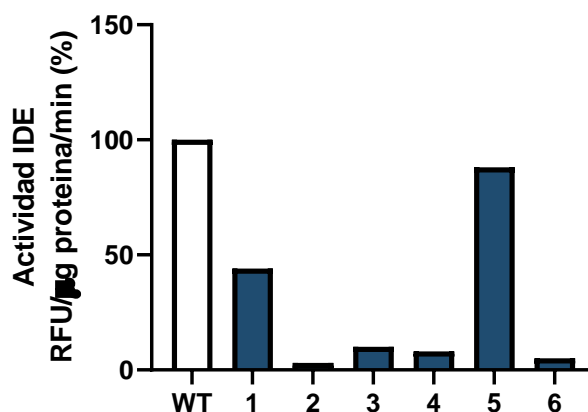


Figura 30. Actividad de IDE de los clones generados mediante CRISPR/Cas9 en células HepG2. Verificación de la ausencia de actividad enzimática de IDE en los clones HepG2-IDE-KO comparados con el control HepG2 WT.

6.2 CLONACIÓN DE IDE

6.2.1 Vectores recombinantes de IDE

VERIFICACIÓN DEL VECTOR RECOMBINANTE GENERADO

Tras el proceso, se verificó la inserción del gen de *Ide* mediante varias técnicas. En primer lugar, se realizaron digestiones utilizando enzimas de restricción de manera estratégica, mediante las cuales se obtuvieron fragmentos de tamaños específicos. Con el fin de diferenciar los vectores recombinantes del plásmido vacío pEF1, se propuso utilizar la enzima de restricción *EcoRI*. Este último plásmido contiene un único sitio de restricción *EcoRI* en el fragmento de clonación múltiple, mientras que los vectores recombinantes además poseen otro sitio *EcoRI* en la posición 2896 del gen *Ide* (**Figura 31**). Por lo tanto, los vectores que poseen dicho gen generan un fragmento añadido de 2900 pb.

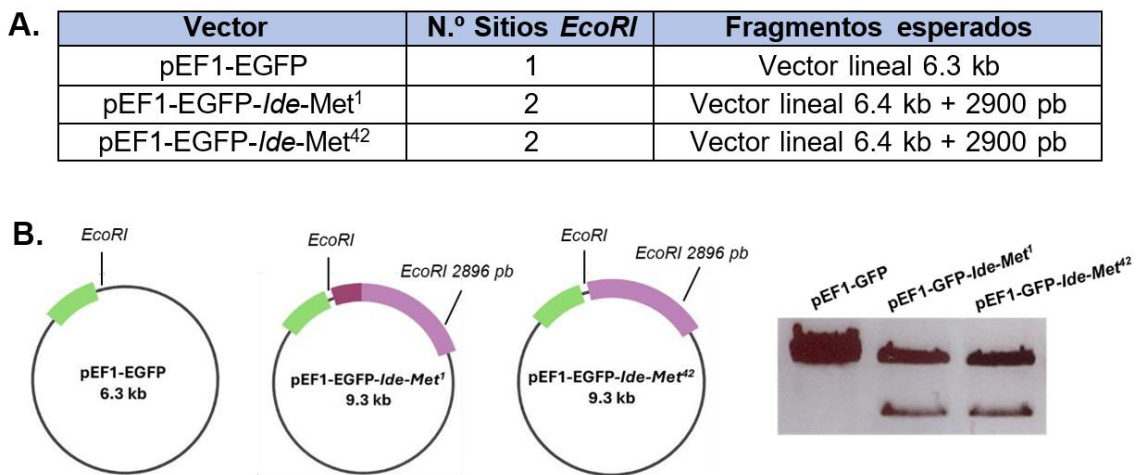


Figura 31. Comprobación de ligación del plásmido recombinante por digestión con *EcoRI*. (A) Tabla de sitios de restricción de *EcoRI* en el vector control y en los recombinantes pEF1-EGFP-*Ide* Met¹ y Met⁴² (B) Mapa de restricción de dichos vectores y electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión enzimática, donde se observó que los tamaños de fragmentos obtenidos son los esperados.

Asimismo, para poder diferenciar las dos isoformas de *Ide* dentro de los vectores generados, se realizó una digestión enzimática con *NheI*, que se encuentra la posición 12 y 1836 del gen. La diferencia entre estos vectores radica en la secuencia de dirección mitocondrial, que abarca las primeras 123 pares de bases de este gen, donde se encuentra uno de los sitios de restricción. De esta

manera, se pueden distinguir por el número de sitios de corte (**Figura 32A**) y, por lo tanto, por el número y tamaño de los fragmentos del producto final. Se comprobó mediante electroforesis que el tamaño de los fragmentos obtenidos corresponde con lo esperado (**Figura 32B**) lo que indica una correcta inserción. En ambos casos se obtuvo un fragmento que corresponde al plásmido linealizado.

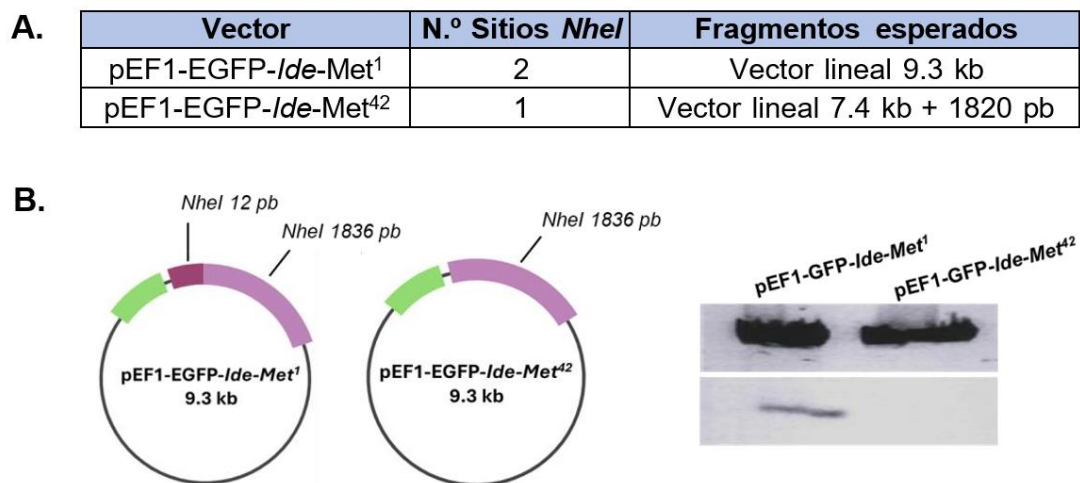


Figura 32. Caracterización de los vectores recombinantes mediante digestión con *NheI*. (A) Tabla de sitios de restricción de *NheI* en los vectores recombinantes pEF1-EGFP-*Ide Met*¹ y *Met*⁴² (B) Mapa de restricción de dichos vectores y electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión enzimática.

En segundo lugar, se realizó una PCR utilizando *primers* que hibridan en el vector pEF1 y en el gen de *Ide*. Como cabía esperar, no se produjo la amplificación del fragmento del vector aislado pEF1-EGFP (**Figura 33**). Por el contrario, los vectores recombinantes, tanto *Met*¹ como *Met*⁴², amplificaron un fragmento de alrededor de 1100 pb. La variación de tamaño que se observó en las bandas se debe a la existencia de los 41 aminoácidos (123 pares de bases) de secuencia señal que presenta la isoforma mitocondrial a diferencia la isoforma citoplasmática. Así se pudo verificar a través de la amplificación que la ligación había ocurrido correctamente.

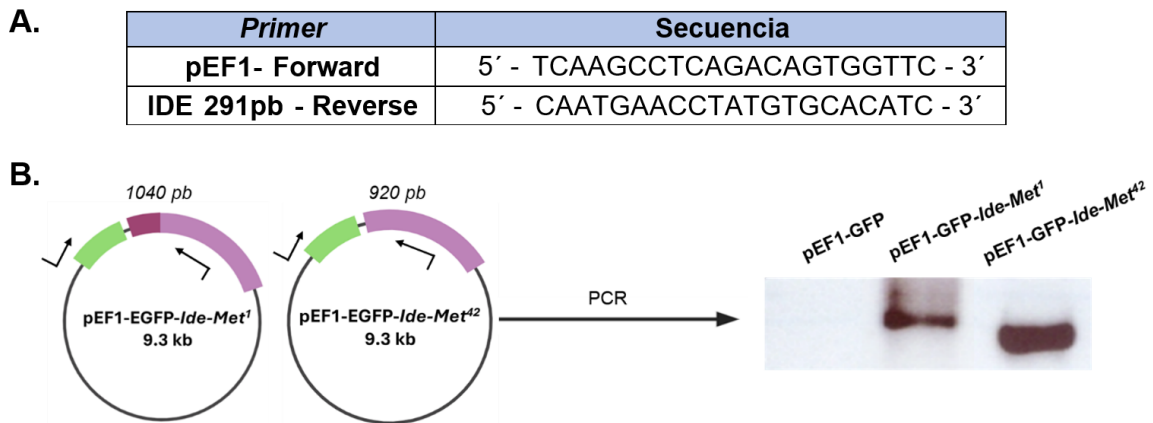


Figura 33. Comprobación de ligación del plásmido recombinante por PCR. (A) *Primers* utilizados para la amplificación de un fragmento de comprobación de ligación entre GFP e *Ide*. **(B)** PCR de amplificación de un fragmento en el que los *primers* hibridan tanto en el plásmido receptor pEF1-EGFP como en el fragmento de *Ide*.

EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LOS VECTORES RECOMBINANTES

Tras la comprobación en la secuenciación, se procedió a estudiar la expresión de estos vectores en la línea celular HepG2. Las células fueron transfectadas con estos plásmidos mediante fosfato cálcico. Posteriormente, se analizó su expresión mediante WB utilizando como anticuerpo primario anti-IDE.

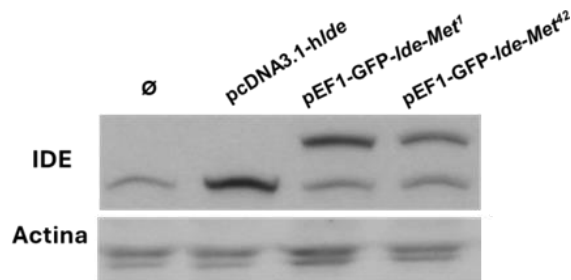


Figura 34. Expresión de los vectores plasmídicos de *Ide* en células HepG2 WT. Sobreexpresión de IDE en células HepG2 transfectadas con pcDNA3.1-h*Ide* en comparación con el control. Expresión de una proteína de mayor tamaño cuando se expresa GFP-IDE, procedente de la transfección con fosfato cálcico de pEF1-GFP-*Ide* mitocondrial y citoplasmática. Ø: Células HepG2 WT sin transfectar. Actina como control de carga.

Los resultados de WB mostraron en todos los casos la banda correspondiente a la proteína IDE expresada de manera canónica, con un tamaño de 100 kDa. Las células transfectadas con el vector de partida pcDNA3.1-h*Ide* mostraron una sobreexpresión de IDE en comparación con las células control. Asimismo, aquellas transfectadas con el vector recombinante, mostraron tanto la expresión de IDE basa como una banda de un tamaño

superior, 140 kDa (**Figura 34**). Esta última corresponde a la proteína IDE unida a GFP, ya que la unión de la secuencia de GFP a IDE en el vector hace que su tamaño aumente y proporcione 40 kDa a la proteína de interés al expresarse.

Finalmente, se estudió su localización para comprobar que la unión de GFP a esta proteína no impedía su tráfico y localización subcelular. Para ello, la línea celular HepG2 se transfectó con las isoformas IDE-GFP y con pEF1-EGFP como control.

Los resultados mostraron que las células transfectadas con pEF1-EGFP expresan GFP en toda la célula, incluido en el núcleo (**Figura 35**). Por el contrario, aquellas que expresan IDE junto a GFP muestran una localización más específica, principalmente citoplasmática, como está descrito en la literatura [19], sin observar fluorescencia en el núcleo.

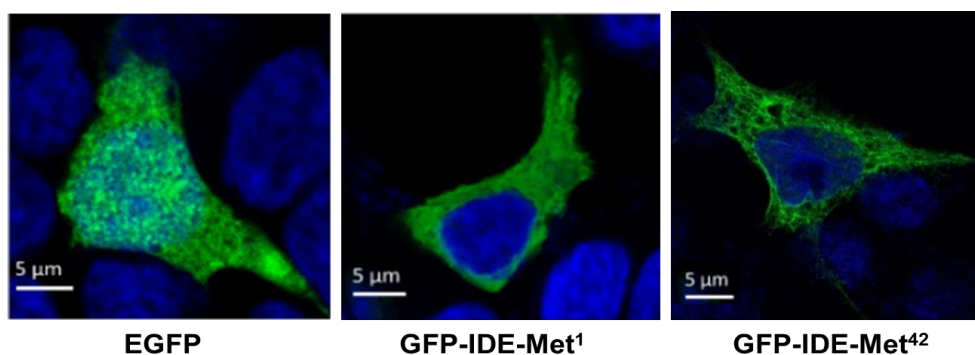


Figura 35. Localización de IDE. Transfección mediante fosfato cálcico en células HepG2. EGFP como control de localización en la totalidad de la célula y, localización mayoritariamente citoplasmática de IDE cuando se transfectan las isoformas el vector pEF1-EGFP-*Ide*. En verde: GFP-IDE y en azul: DAPI. Escala de 5 µm.

COLOCALIZACIÓN DE IDE CON LA RED MITOCONDRIAL

La colocalización de la red mitocondrial con IDE se estudió con el fin de demostrar que cada una de las isoformas de IDE subclonadas en el vector pEF1 se expresa debidamente según su codón de inicio, es decir, si la secuencia señal mitocondrial que contiene una de las isoformas funciona correctamente y si esta proteína se trasloca a la mitocondria. Para ello, la línea celular HepG2-IDE-KO se transfectó con un plásmido mitRFP, que permite detectar las mitocondrias a través de fluorescencia roja, junto con cada una de las isoformas.

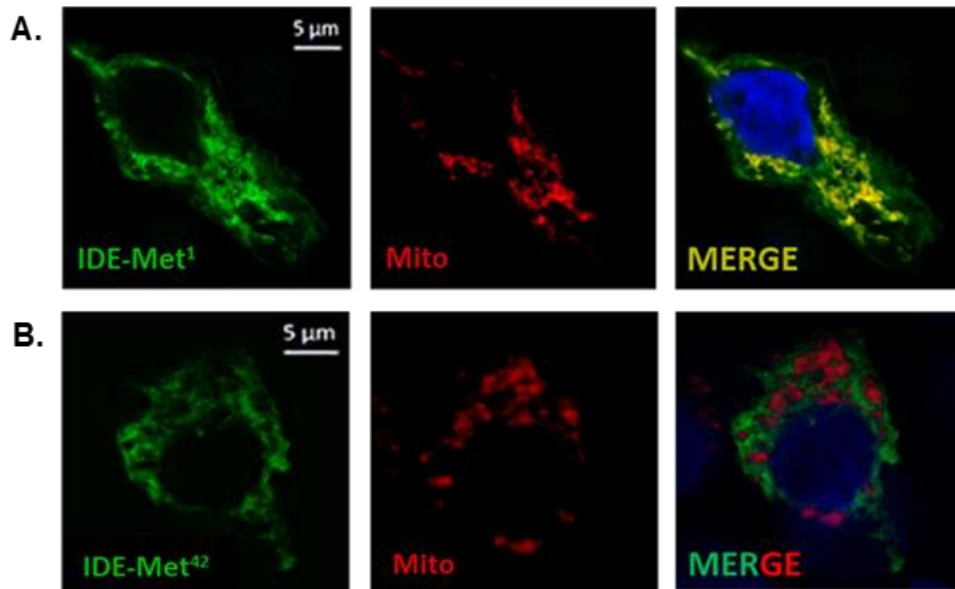


Figura 36. Colocalización entre IDE y red mitocondrial. Transfección mediante fosfato cálcico en células HepG2-IDE-KO. **A)** Isoforma mitocondrial IDE-Met¹. **B)** Isoforma mitocondrial IDE-Met⁴². IDE (verde), mitocondrias (rojo), núcleo (azul), colocalización (amarillo). Escala de 5 μ m.

Por un lado, los resultados confirman que la isoforma mitocondrial con codón de inicio en Met¹ colocaliza significativamente con la red mitocondrial (**Figura 36A**). Esto confirma la validez del vector recombinante, ya que la secuencia de dirección mitocondrial no se ve afectada tras la clonación. Aunque la localización de la proteína se observe principalmente en las mitocondrias, aproximadamente el 30% no colocaliza, lo que indica que una fracción significativa se encuentra en el citoplasma. Aunque la proteína esté presente en esta región, es probable que no desempeñe su función activa hasta que se elimine la secuencia señal y se pliegue adecuadamente. Por lo tanto, la IDE que aún no han ingresado en la mitocondria carece de función biológica relevante. Por otro lado, como cabe esperar, la isoforma citoplasmática, que carece de secuencia señal, no colocaliza con la red mitocondrial. (**Figura 36B**).

Estos resultados confirman que los vectores clonados con el gen de *Ide* permiten la expresión eficiente del gen y, por lo tanto, son válidos para posteriores estudios funcionales.

6.2.2 Mutagénesis dirigida en la isoforma mitocondrial de IDE

Para comprender en profundidad la actividad catalítica de IDE y su implicación en el metabolismo, se decidió eliminar esta capacidad de degradación peptídica. Las modificaciones en la cámara catalítica pueden obstaculizar la unión del sustrato a la enzima y la capacidad de degradación. Al introducir una mutación específica en uno de los aminoácidos que componen esta cámara, la actividad proteolítica de la enzima se ve impedida. Como está descrito en la literatura, un cambio en la histidina de la posición 108 (IDE^{H108L}, IDE^{H108Q}) [108] o en el ácido glutámico del aminoácido 111 (IDE^{E111Q}) [109] supone la anulación de la actividad enzimática. Por otra parte, para comprender los mecanismos de unión, tráfico y acción de IDE, se decidió realizar mutaciones en la región de unión al polianión, IDE^{K898A, K899A, S901A}. Esto afecta a la capacidad de IDE para unirse a fosfolípidos presentes en una membrana plasmática, lo que supone una ayuda a la hora de comprender la importancia de esta enzima en el tráfico vesicular.

EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE IDE MUTANTES

Tras la comprobación en la secuenciación, se procedió a estudiar la expresión de estos vectores en la línea celular HepG2-IDE-KO mediante WB. Se utilizó como anticuerpo primario anti-IDE.

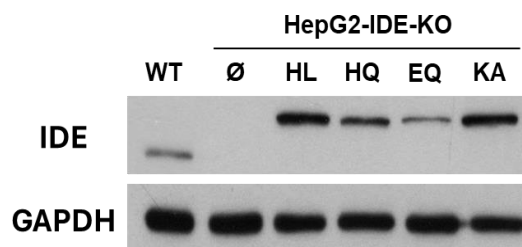


Figura 37. Expresión de los vectores plasmídicos mutantes de *Ide* mitocondrial en células HepG2-IDE-KO. Expresión basal de IDE en HepG2 WT. Sobreexpresión de GFP-IDE en células HepG2-IDE-KO transfectadas con los mutantes de actividad y localización subcelular, en comparación con el control HepG2-IDE-KO. Siendo Ø: HepG2-IDE-KO; HL: IDE^{H108L}; HQ: IDE^{H108Q}; EQ: IDE^{E111Q}; KA: IDE^{K898A, K899A, S901A}. GFP como control de carga.

Los resultados de WB mostraron en el caso de las células control WT, una banda correspondiente a la expresión de IDE canónica. Asimismo, se comprobó la ausencia de IDE en la línea HepG2-IDE-KO. Todos los plásmidos

recombinantes mutados se expresaron, observándose la banda esperada a 140 kDa que coincide con la proteína GFP-IDE (**Figura 37**).

Finalmente, se estudió su localización para comprobar que el proceso de mutagénesis no afectó al tráfico y localización subcelular de GFP-IDE. Para ello, los vectores mutantes fueron transfectados en la línea celular HepG2-IDE-KO. Los resultados fueron satisfactorios. Todos los mutantes generados mantenían su localización (**Figura 38**), como ocurre en el caso de la IDE no mutada mostrada en la **Figura 35**.

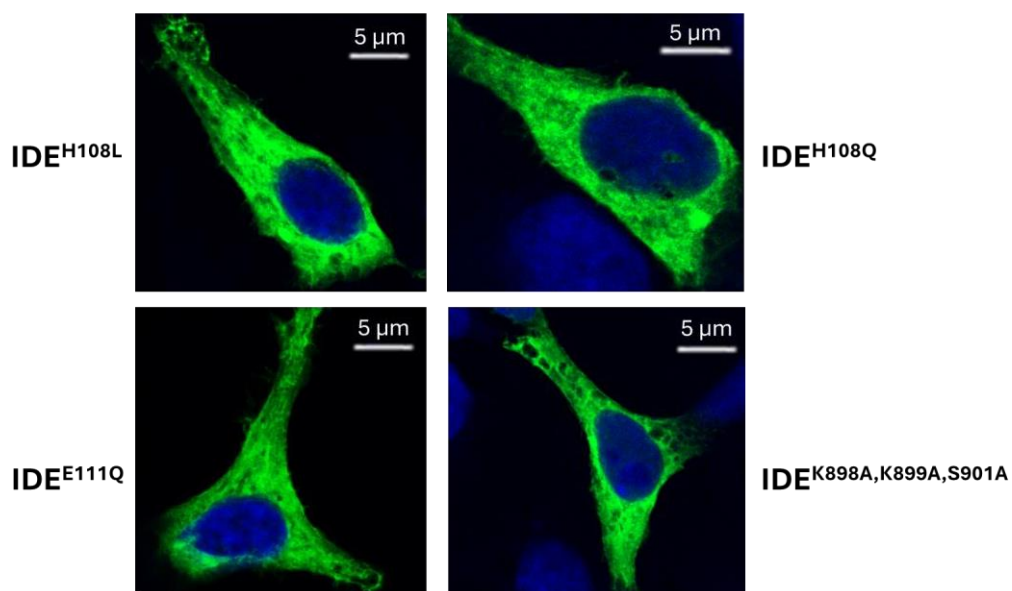


Figura 38. Localización de IDE mutante. Transfección mediante fosfato cálcico en células HepG2. Localización principalmente citoplasmática de IDE en células transfectadas con los vectores mutantes de actividad y unión a membrana. GFP-IDE (verde) y DAPI (azul). Escala de 5 μ m.

ACTIVIDAD DE IDE EN VECTORES MUTANTES

Para verificar la alteración de la función enzimática de los vectores mutantes, además de la secuenciación y expresión de proteínas, se realizó un estudio enzimático mediante el que se obtiene información sobre la actividad de la proteína de interés. En este caso, se quiso verificar que las mutaciones puntuales realizadas en las posiciones 108 y 111 del gen de *Ide* alteran dicha función.

Los resultados corroboraron la ausencia total de actividad en las células HepG2-IDE-KO en comparación con el control. Asimismo, las células transfectadas con los mutantes de la actividad catalítica de IDE (H108L, H108Q y E111Q) (**Figura 39**) mostraron una actividad indetectable comparable a las células delecionadas. Por el contrario, las células que expresaron el mutante de localización subcelular K898A,K899A,S901A no solo no pierden actividad, sino que la duplican. Este hallazgo es inesperado, dado que la literatura científica indica que dicha mutación reduce la actividad de la enzima debido a la disminución de la unión de los activadores a este sitio.

Por un lado, el incremento en la actividad observado podría explicarse por el hecho de que la ausencia de unión de aniones reduce la atracción electrostática entre las dos paredes de la cámara catalítica. Como resultado, la enzima permanece en un estado abierto durante períodos más prolongados, lo que la hace más accesible a sus sustratos, potencialmente aumentando así la tasa de degradación de proteínas.

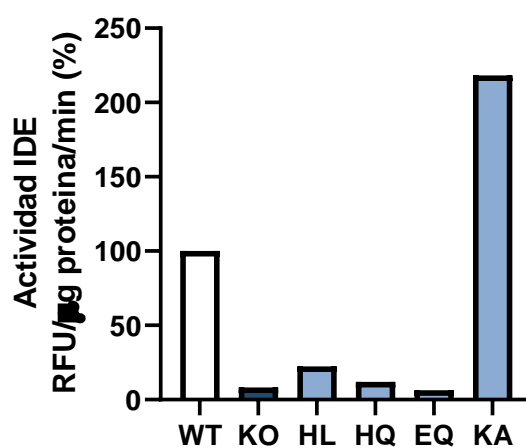


Figura 39. Actividad de IDE de los vectores plasmídicos mutantes de *Ide* en células HepG2-IDE-KO. Anulación de la actividad enzimática de IDE en las células HepG2-IDE-KO comparadas con el control. Verificación de la ausencia de actividad en los mutantes de la cámara catalítica, y sobreactivación en el mutante de unión a la membrana plasmática. KO: HepG2-IDE-KO; HL: IDE^{H108L}; HQ: IDE^{H108Q}; EQ: IDE^{E111Q}; KA: IDE^{K898A,K899A,S901}.

Por otro lado, modelos computacionales de acoplamiento sugieren que existen múltiples modos de unión no solo en el sitio identificado [120]. Además, aunque se discutirá con mayor profundidad más adelante, se ha observado que las células HepG2-IDE-KO presentan un aumento en la producción de ATP, el

cual es uno de los principales activadores de IDE. Por lo tanto, al incrementar la disponibilidad de ATP, es razonable que la activación de la enzima también se vuelva más accesible.

Con este último ensayo se verifica completamente la integridad y correcta generación de los vectores con secuencias de *Ide* mutantes que se usarán para los futuros estudios de función y localización.

6.3 SEÑALIZACIÓN DE INSULINA

Como se ha descrito [148], el ratón *knockout* de IDE específico de hígado (L-IDE-KO) presenta un fenotipo que incluye hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, que fue demostrado por un impedimento en la vía de señalización de esta hormona. Para que el modelo de línea celular HepG2-IDE-KO que se ha generado sea válido, debe de comportarse de una manera similar, sin perder de vista que se trata de una línea inmortalizada y no de un organismo completo.

6.3.1 HepG2-IDE-KO

Se evaluó la vía de señalización intracelular de la insulina en la línea celular HepG2 sin expresión de IDE (HepG2-IDE-KO). Para ello se analizaron mediante WB los niveles de expresión de IDE, así como los niveles totales y fosforilados del receptor de insulina (IR) y de la proteína quinasa B (AKT), ambas proteínas involucradas en la vía de señalización. Las células fueron estimuladas con 100 nM de insulina durante 5, 15 y 30 minutos y, a continuación, fueron recogidas para su procesamiento y análisis.

Los resultados manifiestan una disminución del ~80% en IR y AKT en comparación con las células WT, que se tomaron como control (**Figura 40**). La estimulación del IR (pIR) por parte de la insulina se vio afectada en un ~70% en las HepG2-IDE-KO, en comparación con las células de control. Este estudio confirma una resistencia a la insulina en los hepatocitos HepG2-IDE-KO, al igual que lo que se observó en el modelo de ratón L-IDE-KO.

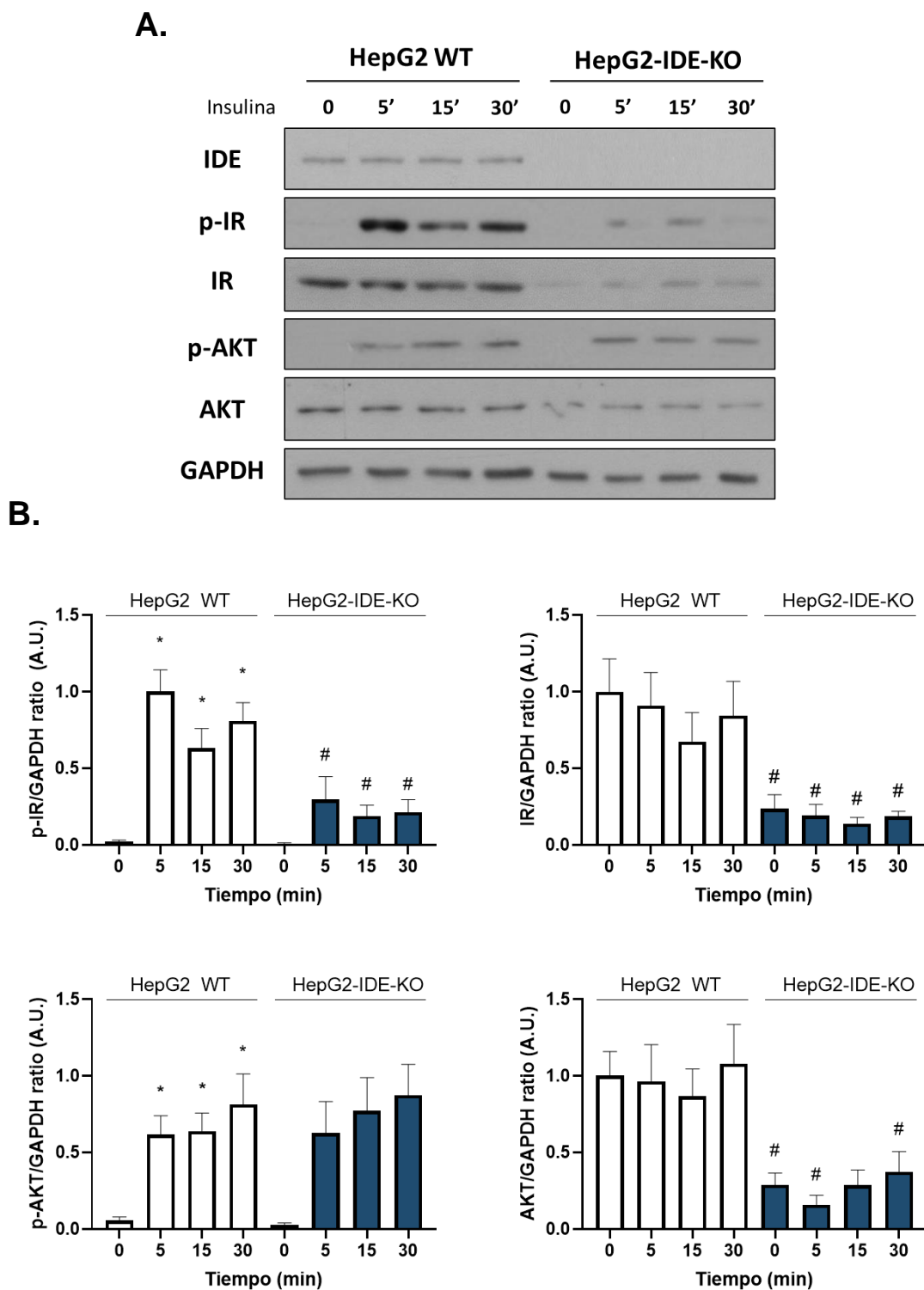


Figura 40. Señalización de insulina en HepG2 WT y HepG2-IDE-KO. (A) Imagen WB representativa de la estimulación de células HepG2 WT y KO con insulina a distintos tiempos. (B) Cuantificación de los niveles de p-IR, IR, p-AKT y AKT. Los datos son la media \pm SEM. N=6. * $p < 0.05$ vs. Control $t=0$; # $p < 0.05$ vs. Tiempo. Estadística mediante One-Way ANOVA.

6.3.2 Reconstitución de IDE en HepG2-IDE-KO

Recientes estudios sobre IDE confirman la existencia de otras funciones, además de su capacidad en la degradación de péptidos, como la regulación de la señalización de insulina en hepatocitos descrita en el apartado anterior. Se desconoce si la regulación de la cascada de señalización se ve afectada por la ausencia de la proteína IDE o por la falta de actividad enzimática por la que se conoce. Dilucidar este fenómeno ayudará a entender en mayor profundidad los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a dicha regulación.

Para llevar a cabo este estudio, se analizó la expresión de las proteínas involucradas en la cascada de señalización de insulina en células HepG2-IDE-KO en las que se reconstituyen los niveles de IDE. Esta reconstitución se realizó mediante la transfección de la isoforma mitocondrial de IDE canónica y aquella en la que se introdujo una mutación puntual que elimina su actividad catalítica (IDE^{E111Q}).

Tras una estimulación de 15 minutos con insulina, se confirma que, al igual que lo expuesto en la **Figura 40**, la ausencia de IDE impide la señalización, lo que disminuye en torno a un 50 % la expresión tanto de IR y AKT como de la fosforilación del receptor (**Figura 41**).

El resultado observado en las células con delección genética de IDE en las que se restablece la expresión de la isoforma mitocondrial nativa fue una recuperación casi total de la activación del receptor de insulina (p-IR) y de IR y AKT a niveles comparables al control WT (**Figura 41**). Además, cabe destacar que el resultado fue el mismo que cuando se restablece la expresión de la IDE catalíticamente inactiva E111Q.

Por lo tanto, con estos resultados se confirma la validez de la línea celular generada por su similitud con lo visto en el modelo animal L-IDE-KO. Asimismo, se demostró que la isoforma mitocondrial es la responsable de la función de señalización de insulina en los hepatocitos, independientemente de su actividad proteolítica.

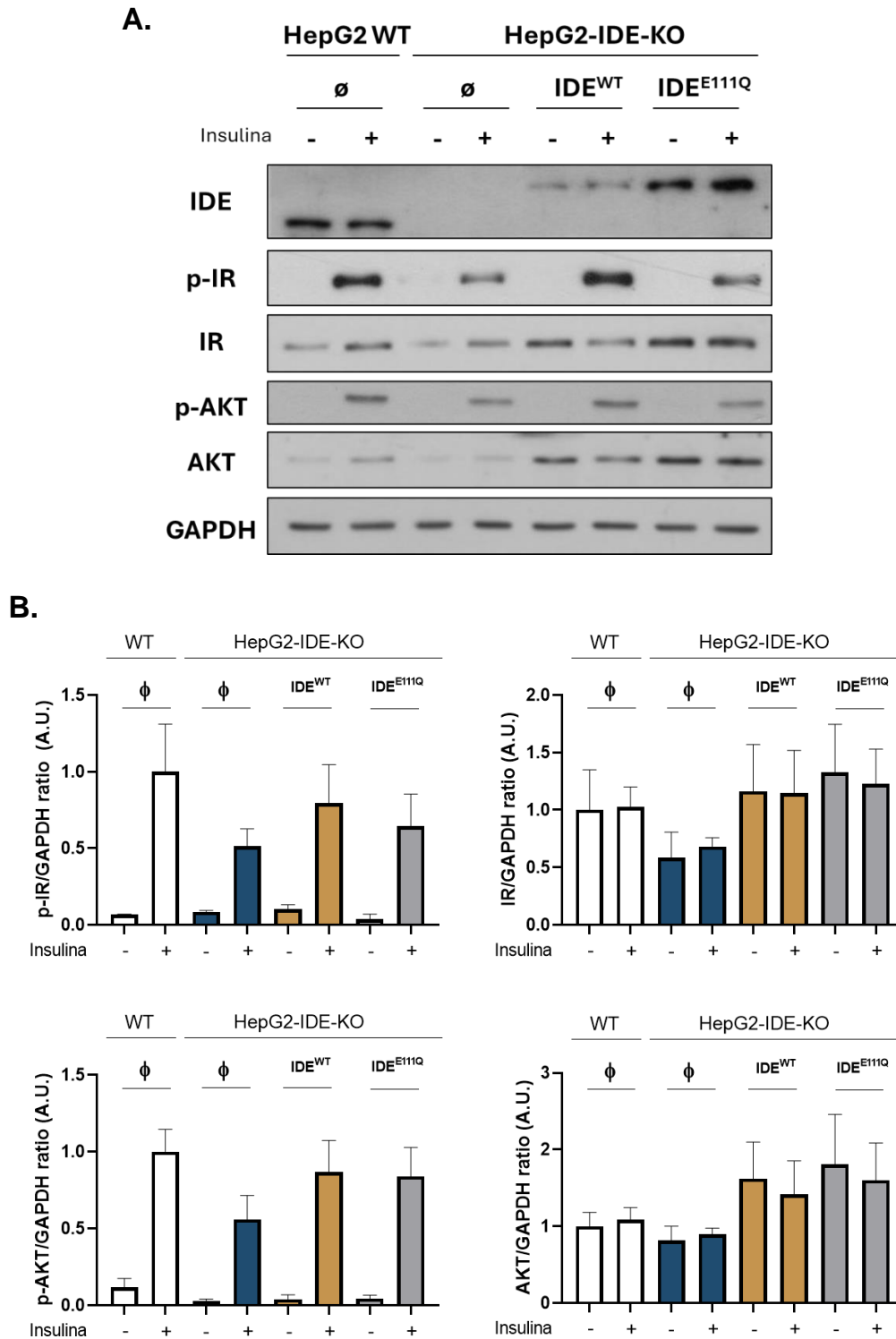


Figura 41. Reconstitución de la señalización de insulina en HepG2-IDE-KO. (A) Imagen WB representativa de la estimulación de insulina 100 nM a 15 minutos de células HepG2 WT, KO y con expresión reconstituida de la isoforma mitocondrial WT y mutada E111Q. **(B)** Cuantificación de los niveles de p-IR, IR, p-AKT y AKT. GAPDH como control de carga. Los datos son la media ± SEM. N=3. Estadística mediante One-Way ANOVA.

6.4 SEÑALIZACIÓN DE GLUCAGON

6.4.1 Acción del glucagón en la generación de ATP

En las células hepáticas, la estimulación con glucagón promueve tanto la gluconeogénesis como la glucogenólisis, lo que resulta en un aumento de glucosa en sangre para satisfacer la demanda metabólica del organismo. La gluconeogénesis es estimulada por el glucagón a través del incremento en la expresión de genes gluconeogénicos.

De otra parte, la glucosa es el punto de partida para la producción de energía que se obtiene principalmente a través de la generación de ATP en las mitocondrias mediante la fosforilación oxidativa, lo que supone un mayor consumo de oxígeno por parte de la célula. Para corroborar estos hechos, se realizó un estudio metabólico mediante Seahorse en las células AML12 WT sometidas a estimulación con glucagón 50 ng/ml durante 1 hora.

Los resultados no mostraron cambios en el consumo de oxígeno (OCR) basal tras la estimulación con glucagón (**Figura 42A**). Sin embargo, la capacidad máxima de las células estimuladas con glucagón aumentó un 15% en comparación con las células control sin estimular. La **Figura 42C**, que se corresponde con el mapa energético, resume la variación en la capacidad de respuesta al estrés celular, mediado por FCCP, y el potencial bioenergético de las células tratadas con glucagón medido en términos de capacidad de reserva en la **Figura 42B**. Estas diferencias indican un fenotipo más energético en respuesta a dicha hormona hepatocitos.

Además, se muestra que las tasas de producción de ATP mitocondrial y glucolítico aumentaron ligeramente en comparación con las células control, con un claro predominio de la producción de ATP mitocondrial (**Figura 42B**).

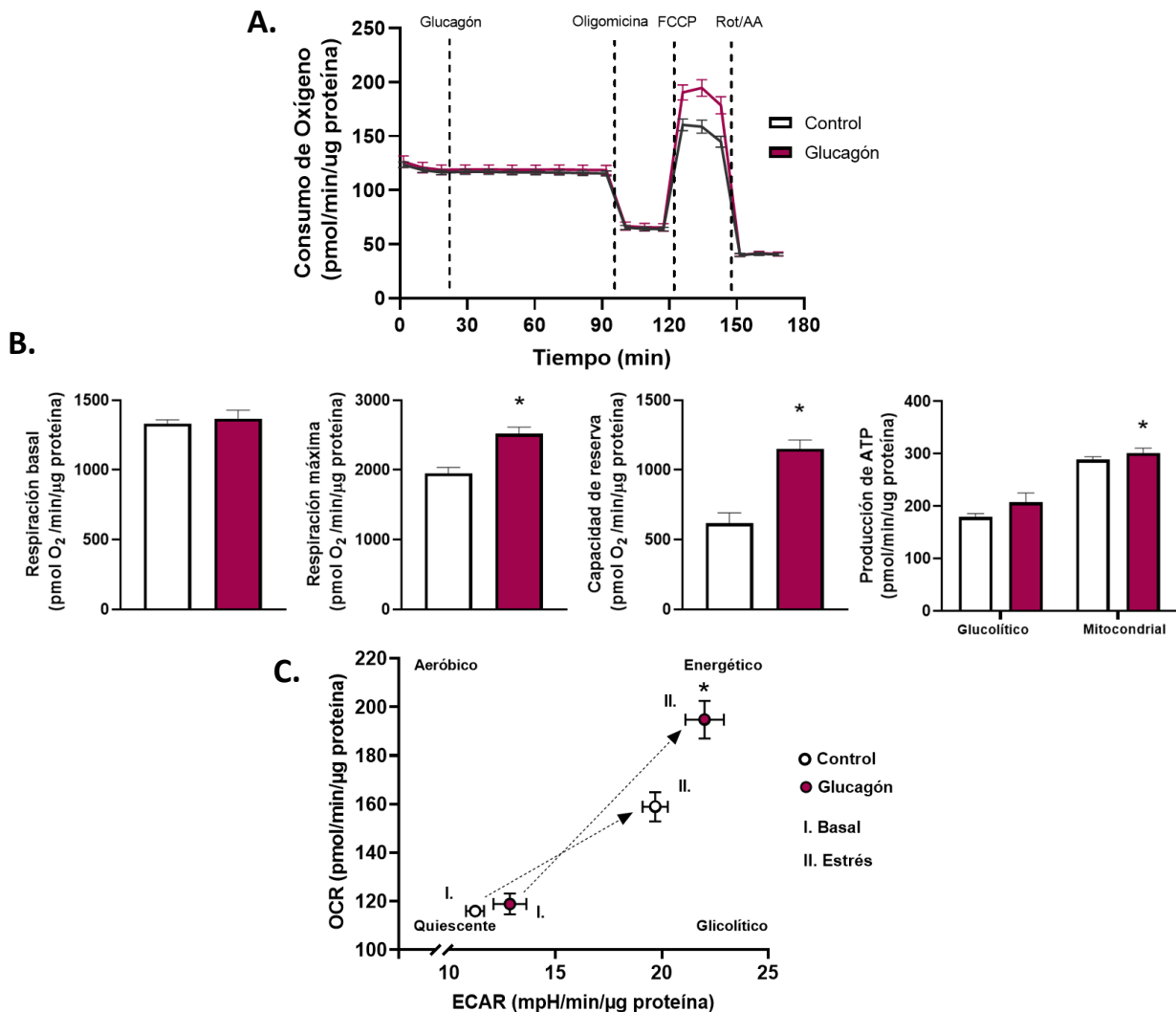


Figura 42. Análisis metabólico Seahorse de AML12 WT con estímulo de glucagón. (A) Gráfico representativo del consumo de oxígeno (OCR) de las células AML12 control y con estimulación con glucagón 50 ng/ml durante 1h. **(B)** Mapa energético en condiciones basales y en respuesta a estrés mediante FCCP. **(C)** Análisis de respiración basal y máxima, capacidad de reserva y, producción de ATP glucolítico y mitocondrial. Los datos son la media \pm SEM. N=12. * $p < 0.05$ vs. control. Estadística mediante T-Test.

6.4.2 Expresión de genes gluconeogénicos

En condiciones fisiológicas, durante el ayuno el glucagón promueve la gluconeogénesis hepática, lo que contribuye a la regulación de los niveles de glucosa en sangre. Asimismo, el experimento anterior indica que esta hormona estimula la respiración y la producción de ATP mitocondrial. Sin embargo, en condiciones fisiopatológicas esto puede verse alterado. Nuestro grupo ha descrito que el modelo de ratón L-IDE-KO presenta un fenotipo de hiperglucemia

[148]. Además, la estimulación de estos hepatocitos primarios con glucagón provocó una sobreestimulación de la cascada de señalización. El ratio p-CREB/CREB aumentó un 33% tras una hora de estimulación con glucagón, en comparación con los ratones control (*Datos pendientes de publicación*). De este modo, la producción hepática de glucosa es incontrolada, lo que conduce a la hiperglucemia.

Para investigar más a fondo el mecanismo de regulación de IDE en la homeostasis de la glucosa, los hepatocitos primarios extraídos de ratones WT y L-IDE-KO fueron estimulados con glucagón para evaluar los niveles hepáticos ARNm de *Pck1* y *G6pc* mediante RT-qPCR, como se describe en la metodología. Los hepatocitos fueron estimulados con 50 ng/ml durante 0 y 1 hora.

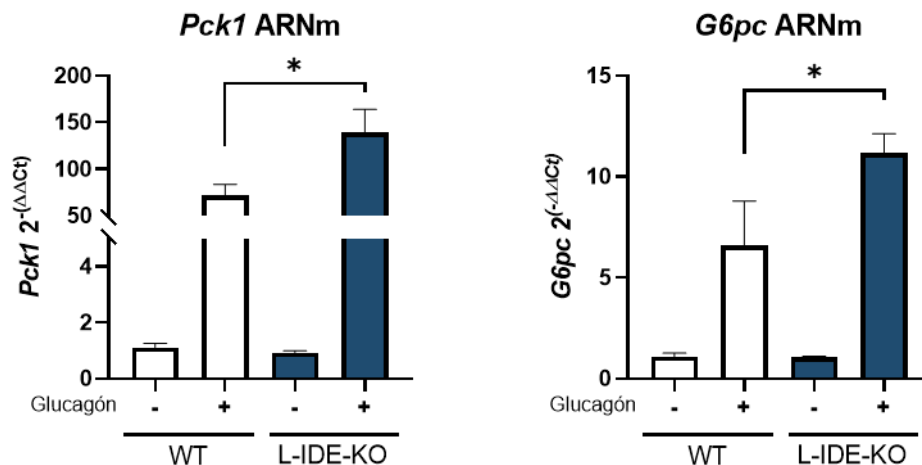


Figura 43. ARNm de genes gluconeogénicos *Pck1* y *G6pc* en hepatocitos primarios mediante qPCR. Tratamiento con glucagón a 1h en hepatocitos primarios extraídos de ratones WT y L-IDE-KO de 4 meses. Los datos fueron normalizados por L18. Los datos son la media \pm SEM. N=4-6. * $p < 0.05$. Estadística mediante One-Way ANOVA.

Como estaba descrito, tanto en los hepatocitos primarios WT como los L-IDE-KO, la expresión de *Pck1* y *G6pc* aumenta significativamente tras la estimulación, a diferencia del control sin estimular (**Figura 43**). Tras 1h de estimulación, los niveles de expresión se duplicaron en los ratones L-IDE-KO con respecto al control. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en la línea celular AML12-shRNA-IDE que presenta una deficiencia del 50% de expresión de la proteína (*Datos pendientes de publicación*).

6.4.3 Producción de glucosa

Con la confirmación del aumento en los niveles de ARNm de los genes gluconeogénicos, tanto en los hepatocitos primarios de ratón L-IDE-KO como en la línea AML12-shRNA-IDE, se quiso comprobar el aumento en los niveles de glucosa por la sobreactivación de la gluconeogénesis y glucogenólisis en ausencia de IDE. Además, para profundizar en la función de IDE, se sugirió distinguir el grado de importancia de cada una de las isoformas de la enzima en este proceso.

Para ello, se realizó un estudio de producción de glucosa en la línea celular AML12 control y shRNA-IDE. Las células shRNA-IDE fueron transfectadas con las isoformas mitocondrial y citoplasmática para reconstituir la proteína y, posteriormente, se trataron con glucagón 50 ng/ml durante 1h.

Los resultados mostraron un aumento en la producción de glucosa en las células shRNA-IDE en basal y tras la estimulación (**Figura 44**). Esto confirma los resultados observados en Pck1 y G6pc a nivel de ARNm.

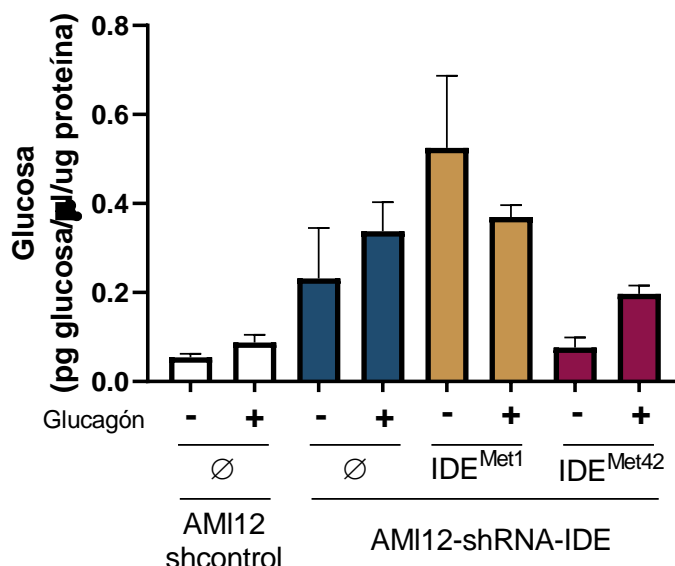


Figura 44. Producción de glucosa en AML12 shRNA-IDE y control. Análisis de la glucosa producida tras 1h de estimulación con glucagón 50 ng/μl en células control, shRNA-IDE y con sobreexpresión de las isoformas mitocondrial y citoplasmática. Los datos son la media ± SEM. N=3. Estadística mediante One-Way ANOVA.

Cuando se reconstituyó la isoforma mitocondrial IDE-Met¹, la producción de glucosa en estas células permaneció sin cambios. Por el contrario, aquellas que sobreexpresaron la isoforma citoplasmática IDE-Met⁴² disminuyeron la producción de glucosa a niveles comparables a las células control.

Estos resultados reflejan que la isoforma citoplasmática es la responsable de la regulación de la producción de glucosa en los hepatocitos.

6.5 BIOENERGÉTICA EN HEPATOCITOS

6.5.1 Estudio metabólico

En consonancia con los resultados anteriores, la desregulación del metabolismo hepático en condiciones patológicas, como la DM2 o la ausencia de IDE en hígado, puede llevar a alteraciones significativas en el metabolismo energético y homeostasis celular. Para investigar de manera exhaustiva los efectos de la deficiencia de IDE en los hepatocitos, se realizó un estudio metabólico con el fin de examinar los efectos de la sobreestimulación de la vía de señalización del glucagón en la línea celular AML12-shRNA-IDE.

Se llevó a cabo un análisis detallado del perfil metabólico de los hepatocitos, enfocándose en los metabolitos intermedios del ciclo de Krebs. Este análisis reveló un aumento en la mayoría de los metabolitos intermedios estudiados. Asimismo, se observó un incremento en la concentración de piruvato (**Figura 45**) posiblemente como consecuencia del aumento de glucosa descrito en la **Figura 44**.

Dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y de la demanda energética, el piruvato posee dos destinos principales: convertirse en lactato o en acetil-CoA. En las células AML12-shRNA-IDE se observó un aumento en la concentración de lactato mientras que el acetil-CoA no se vió alterado (**Figura 45**). Aunque los valores de acetil-CoA se mantienen estables, la continua entrada y transformación de este en el ciclo de Krebs puede explicar el aumento de la concentración de los metabolitos intermedios. Además, el oxalacetato, que forma

parte del ciclo de Krebs, puede obtenerse del piruvato a través de la enzima piruvato carboxilasa sin necesidad de pasar por acetil-CoA, lo que corrobora que los niveles de este se mantengan sin variación. Este análisis reveló un aumento en la concentración de citrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato, malato y oxalacetato (**Figura 45**).

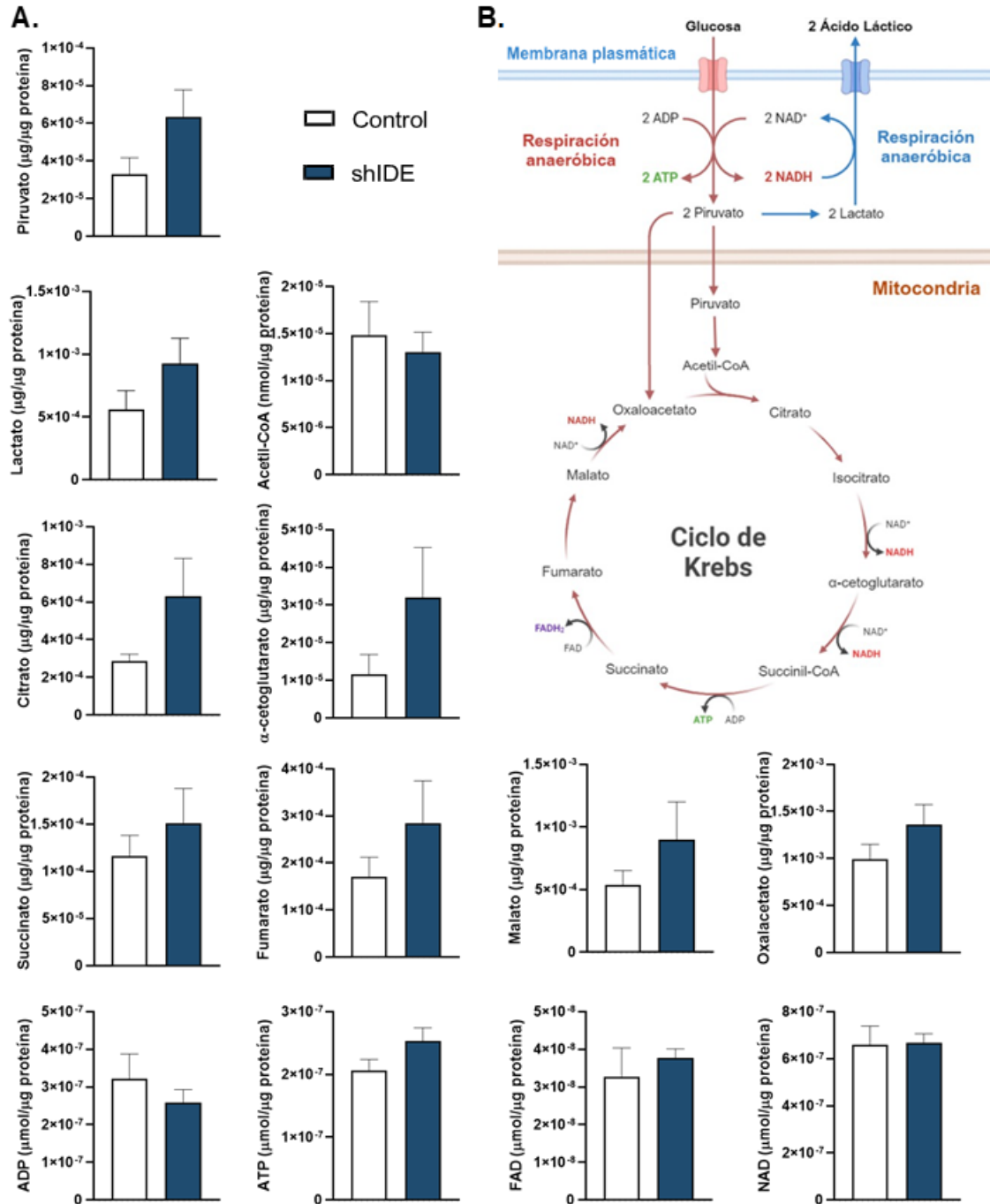


Figura 45. Perfil metabólico en AML12-shRNA-IDE. A) Análisis de los metabolitos intermedios del ciclo de Krebs en AML12 con deficiencia de IDE y células control. Los datos son la media \pm SEM. N=6. Estadística mediante T-Test. **B)** Esquema del ciclo TCA.

Como consecuencia del aumento en la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el análisis reveló un aumento en los niveles de ATP, con la consiguiente disminución de ADP (**Figura 45**). Esto puede deberse a la generación de ATP a través de la activación del ciclo TCA, o bien a una mayor eficiencia en la fosforilación oxidativa, dado que la generación de FADH₂ y NADH también contribuyen a este proceso, aunque la concentración de estos no varíe.

6.5.2 Actividad mitocondrial

Con la intención de seguir desentramando el efecto de IDE en el metabolismo bioenergético, se realizó un análisis de la respiración celular mediante Seahorse. Se midieron los valores de consumo de oxígeno (**Figura 46A**) y tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR) en la línea celular HepG2-IDE-KO generada mediante CRISPR/Cas9. Los resultados mostraron un aumento significativo del consumo de oxígeno, tanto basal como de capacidad máxima lo que causó a su vez, un aumento en la capacidad respiratoria de reserva en las células con delección de IDE (**Figura 46B**). Como se muestra en el diagrama (**Figura 46C**), estos resultados indican un fenotipo más energético en comparación con el control

Este análisis metabólico mostró un aumento significativo en la producción de ATP mitocondrial y una tendencia en el producido en la glucólisis (**Figura 46B**). La diferencia en los valores de producción de ATP glucolítico y mitocondrial que se observa en estas células es comparable con la mostrada en la línea AML12 WT (**Figura 42B**), lo que apoya los resultados obtenidos. Estos resultados demostraron que los hepatocitos carentes de IDE exhiben un fenotipo más energético debido a la activación del metabolismo oxidativo.

Además, los valores de ECAR (**Figura 46D**) mostraron un aumento en ausencia de IDE, lo que indica un incremento de la glucólisis, en el que la glucosa se convierte en ácido láctico en condiciones anaeróbicas. Esto concuerda con el aumento de la concentración de lactato observado en las células deficientes de IDE (**Figura 45A**).

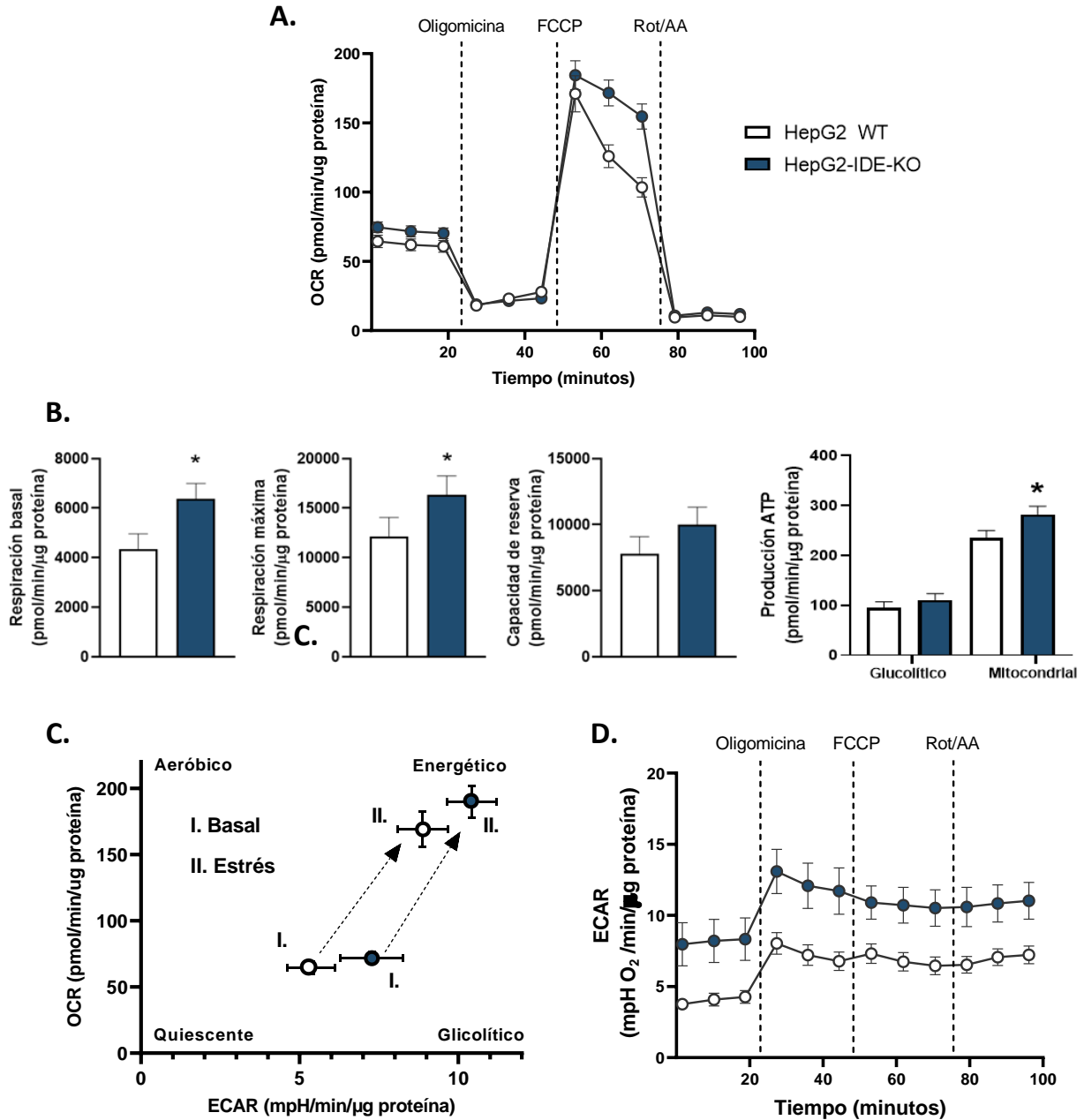


Figura 46. Análisis metabólico Seahorse en HepG2-IDE-KO. (A) Gráfico representativo del consumo de oxígeno (OCR) de las células HepG2 control y carentes de IDE. **(B)** Análisis de respiración basal, máxima, capacidad de respuesta a estrés y producción de ATP glucolítico y mitocondrial. **(C)** Mapa energético en condiciones basales y en respuesta a un estrés metabólico (FCCP). **(D)** Tasa de acidificación extracelular (ECAR). Los datos son la media ± SEM. N=6. *p<0.05 vs. control. Estadística mediante T-Test.

6.5.1 Reconstitución de IDE

El metabolismo energético en ausencia de IDE puede verse afectado por la carencia de la proteína o por la falta de actividad enzimática de esta.

Para llevar a cabo este estudio, se analizó el metabolismo energético mediante Seahorse en células HepG2-IDE-KO en las que se reconstituyen los niveles de IDE. La reconstitución se llevó a cabo mediante transfección de la isoforma mitocondrial de la IDE canónica y aquella en la que se inactivó su actividad catalítica mediante mutación puntual (IDE^{E111Q}).

Los resultados mostraron una recuperación del fenotipo mitocondrial hacia uno menos energético. Como se muestra en la **Figura 47B**, el consumo de oxígeno basal y máximo disminuyó significativamente en aquellas células reconstituidas en comparación con el control HepG2-IDE-KO. De la misma manera, la capacidad de reserva de estas células se encontró reducida. La producción de ATP, tanto glucolítico como mitocondrial, también se encontró disminuida, observando de nuevo una mayor producción en la mitocondria.

La disminución de OCR y ECAR (**Figura 47A,C**) indica que el fenotipo metabólico de las células reconstituidas tanto con la isoforma mitocondrial canónica como con la mutante de la actividad catalítica se restablece hasta valores cercanos a los observados en las células WT. Esto confirma que la isoforma mitocondrial de IDE es la responsable de la regulación de la respiración mitocondrial, independientemente de su actividad catalítica.

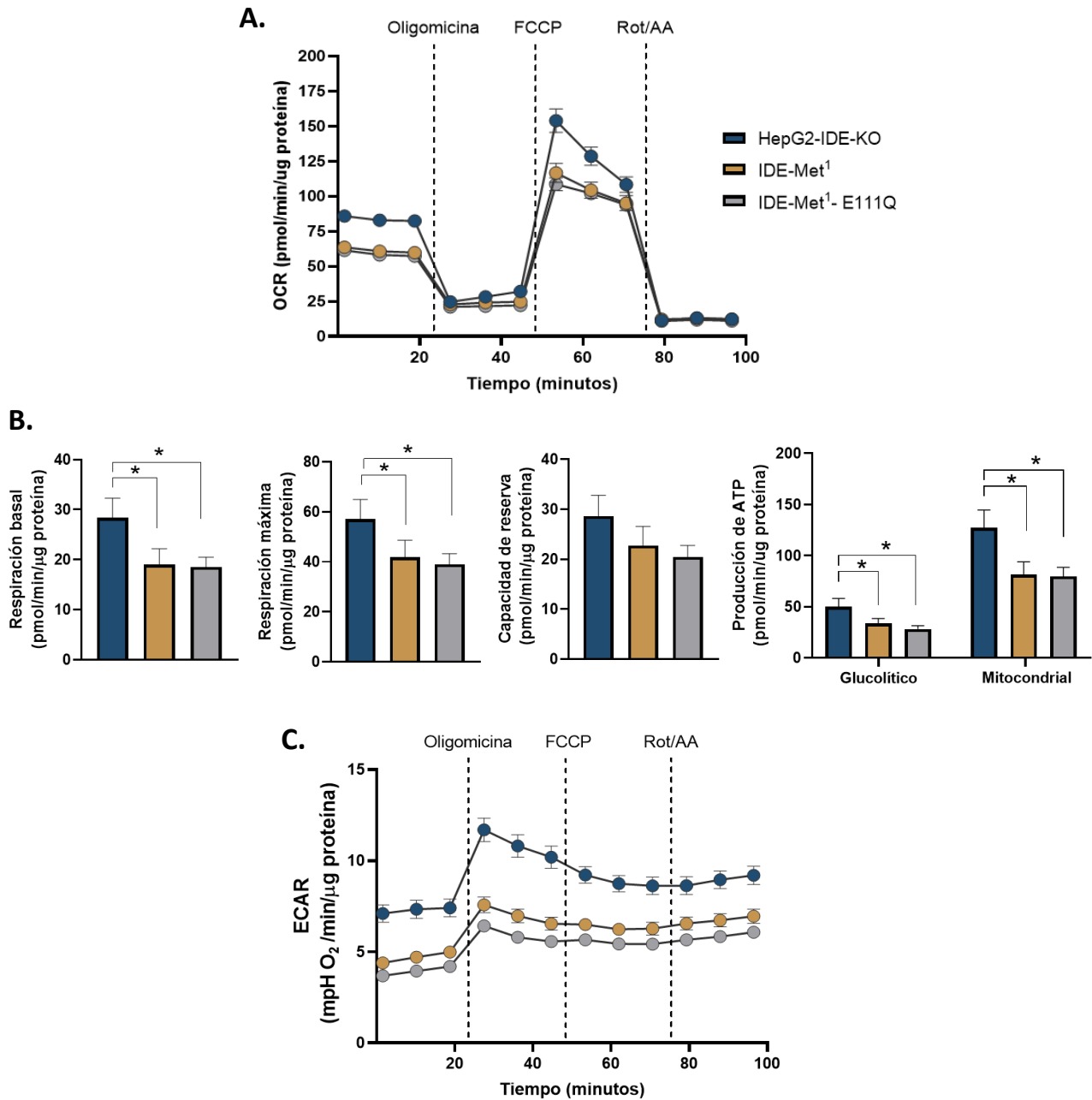


Figura 47. Análisis metabólico Seahorse en HepG2-IDE-KO con reconstitución de IDE mitocondrial canónica y sin actividad catalítica (E111Q). (A) Gráfico representativo del consumo de oxígeno (OCR) de las células HepG2-IDE-KO y transfectadas con IDE. **(B)** Análisis de respiración basal, máxima, capacidad de respuesta a estrés y, producción de ATP glucolítico y mitocondrial. **(C)** Tasa de acidificación (ECAR). Los datos son la media \pm SEM. N=6. * $p < 0.05$ vs. HepG2-IDE-KO. Estadística mediante One way ANOVA.

Para verificar dichos resultados, se realizó el mismo análisis de estrés metabólico en la línea de hepatocitos AML12 con deficiencia de IDE (AML12-shRNA-IDE). Cualitativamente, los resultados son similares a los obtenidos en la línea HepG2. En la **Figura 48A** se observa que las células con deficiencia de IDE mostraron un fenotipo más energético, con mayor consumo de oxígeno basal y máximo, en comparación con el control. Asimismo, la capacidad respiratoria de respuesta también mostró un aumento en las células carentes de IDE (**Figura 48B**). Sorprendentemente, las células control carecieron de capacidad de respuesta frente a una demanda metabólica.

Por otro lado, en las células AML12-shRNA-IDE se observó un aumento en la producción de ATP mitocondrial (**Figura 48C**) y en la tasa de acidificación (**Figura 48D**) en comparación con las células control. Curiosamente, los valores de producción de ATP derivado de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa son similares. Esto es contradictorio debido a que los análisis metabólicos previos en hepatocitos HepG2 y AML12 muestran una mayor concentración de ATP mitocondrial que glucolítico.

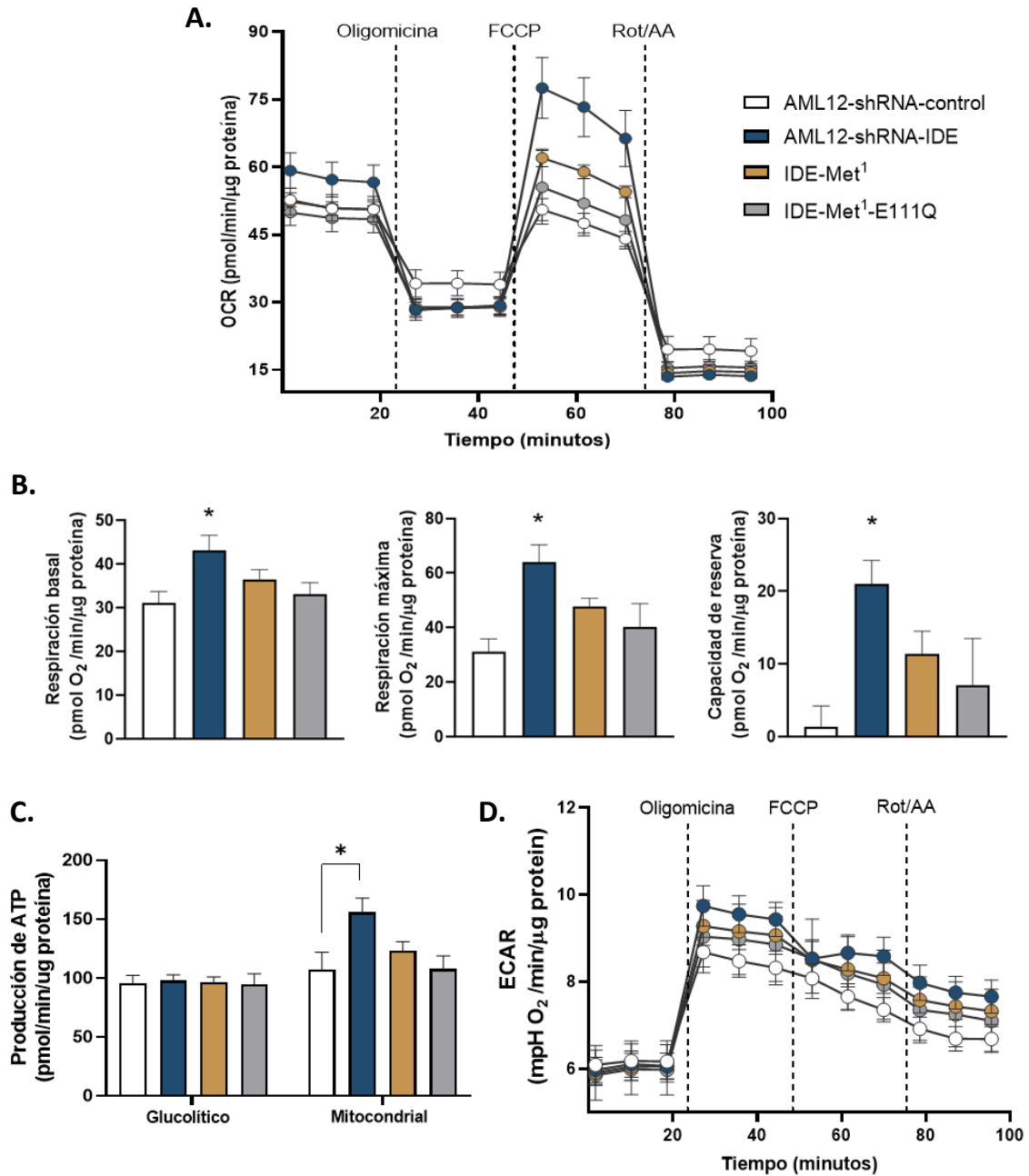


Figura 48. Análisis metabólico Seahorse en AML12 shRNA con reconstitución de IDE mitocondrial canónica y sin actividad catalítica (E111Q). (A) Gráfico representativo del consumo de oxígeno (OCR) de las células AML12 control, shRNA-IDE y transfectadas con IDE. (B) Análisis de respiración basal, máxima, capacidad de respuesta a estrés (C) Producción de ATP glucolítico y mitocondrial. (D) Tasa de acidificación (ECAR). Los datos son la media ± SEM. N=6. *p<0.05 vs. AML12-shRNA-control. Estadística mediante One-Way ANOVA.

6.5.2 Expresión de complejos de la ETC y OXPHOS

La preservación de función mitocondrial referida a la fosforilación oxidativa está estrechamente vinculada a la expresión y actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones (ETC). Estos complejos, que se encuentran en la membrana interna de la mitocondria, desempeñan un papel crucial en la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Por ello, se estudió la expresión de los complejos de la ETC en el modelo celular HepG2 carente de IDE. Además, se investigó el papel de la isoforma mitocondrial en la regulación de este proceso.

Para llevar a cabo este estudio, las células HepG2-IDE-KO fueron reconstituidas con la isoforma mitocondrial de IDE. Posteriormente, tanto las células WT como las células deficientes de IDE, transfectadas y no transfectadas, fueron estimuladas con glucagón 50 ng/ml a tiempos cortos, específicamente a los 0, 10 y 20 minutos.

Seguidamente, se analizó la expresión de subunidades que forman cada uno de los complejos de la ETC mediante WB. Los resultados no mostraron cambios significativos en la expresión, tanto en basal como en condiciones de estimulación. Como se muestra en la (**Figura 49**), las subunidades nDUFB8 (complejo I), SDHB (complejo II), Core2 (complejo III), COXI (complejo IV) y ATP5F1 α (complejo V) permanecen sin cambios, tanto en las células carentes de IDE como en las reconstituidas con la isoforma mitocondrial IDE-Met¹.

Estos resultados indican que, al menos las subunidades estudiadas de cada complejo mitocondrial no parecen ser dependientes de IDE. Esto no descarta la posibilidad de una regulación a nivel proteico, sino que sugiere que la regulación podría estar mediada por otras subunidades o depender de la actividad funcional de alguno de los complejos.

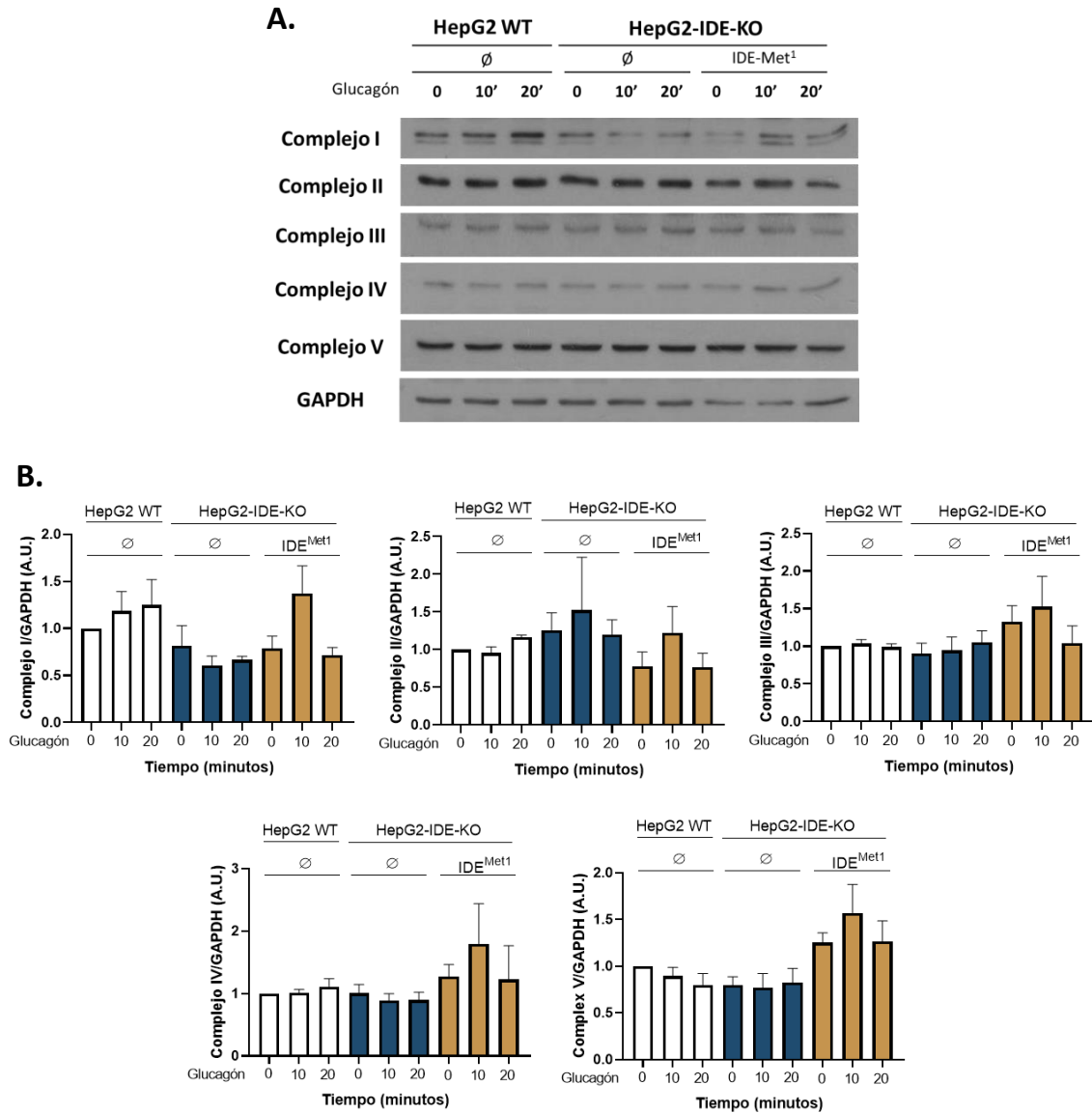


Figura 49. Expresión de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en HepG2. (A) Imagen WB representativa de la expresión de los complejos de la ETC con estimulación de glucagón a 10 y 20 minutos de células HepG2 WT, KO y con expresión reconstituida de la isoforma mitocondrial WT. **(B)** Cuantificación de los niveles de complejo I (nDUFB8), complejo II (SDHB), complejo III (Core2), complejo IV (COXI) y complejo V (ATP5F1 α). GAPDH como control de carga. Los datos son la media \pm SEM. N=3. Estadística mediante One-Way ANOVA.

6.5.3 Estudio transcriptómico

Para comprender mejor los mecanismos implicados en el fenotipo energético de los hepatocitos deficientes de IDE, se llevaron a cabo análisis transcriptómicos en células control y HepG2-IDE-KO. Como muestra la **Figura 50A**, la delección de IDE resultó en la sobreexpresión de un amplio conjunto de transcritos de genes en comparación con las células de control. Por el contrario, pocos genes fueron regulados negativamente, siendo estos en gran parte los implicados en el metabolismo lipídico y el citoesqueleto. Entre ellos destacan la proteína asociada a microtúbulos EML1, la reguladora del citoesqueleto de actina EVL y la subunidad gamma 4 de la proteína G, GNG4.

La mayoría de los transcritos regulados al alza están implicados en funciones celulares asociadas con membranas, orgánulos y receptores de señalización. Además, algunos genes clave relacionados con el metabolismo de carbohidratos, como la subunidad catalítica 1 de la glucosa-6-fosfatasa (G6PC1), la proteína que contiene un dominio de hexocinasa 1 (HKDC1), la fosfodiesterasa 4D (PDE4D), la proteína de regulación de estrés celular S100A10 y el transportador de glucosa-6-fosfato (SLC37A2) mostraron un aumento en su expresión. También se observó una sobreexpresión en genes implicados en la función mitocondrial, como la proteína desacopladora 2 (UCP2), la subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa (NDUFA6; Complejo I) y la glutatión peroxidasa 3 (GPX3).

El análisis del diagrama de Venn (**Figura 50B**) destaca que una característica común en todas las funciones celulares alteradas en los hepatocitos deficientes de IDE es la sobreexpresión de UCP2.

6.6 MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL

6.6.1 Estudio de histomorfometría mitocondrial

La relación entre la respiración y la morfología mitocondrial es clave. Esto es debido a que alteraciones en la capacidad respiratoria pueden reflejar cambios en la forma, tamaño y organización de la red mitocondrial.

Como consecuencia del aumento significativo en la respiración mitocondrial en las células carentes de IDE (**Figura 46**), se decidió estudiar la morfología de la red mitocondrial. Para llevar a cabo dicho estudio, se marcaron las mitocondrias mediante la transfección de las células con un vector plasmídico que contiene una secuencia de dirección mitocondrial y una proteína fluorescente roja. Este proceso se llevó a cabo en tres modelos celulares: la línea celular carente de IDE HepG2, en las deficientes de IDE AML12 y en hepatocitos primarios aislados de ratones WT e IDE-KO.

Los resultados obtenidos a través del Mitochondrial Analyzer muestran un aumento del número de mitocondrias individuales en cada célula (**Figura 51B**) y una reducción del área (**Figura 51C**) y del volumen (**Figura 51D**) de cada mitocondria. De igual forma, se observó aumento en el ratio de esfericidad (**Figura 51E**) que, en conjunto, indica una fragmentación mitocondrial debido a la ausencia de IDE. Asimismo, se observó una reducción significativa del número (**Figura 51F**) y longitud de las ramificaciones mitocondriales (**Figura 51G**). La disminución en el número de bifurcaciones de las ramas (**Figura 51H**) y en los puntos de posible interconexión mitocondrial (**Figura 51I**), junto con los resultados anteriormente descritos, indican un fenotipo mitocondrial individual y menos interconectado.

En resumen, los perfiles morfológicos obtenidos en los modelos IDE-KO (**Figura 51**), AML12shRNA-IDE (**Figura 52**) y HepG2-IDE-KO (**Figura 53**), muestran un fenotipo de fragmentación y menor conectividad de la red mitocondrial en ausencia de IDE. Esto refuerza que existe una relación entre la actividad respiratoria mitocondrial y su morfología, en la que IDE juega un papel fundamental en estos procesos.

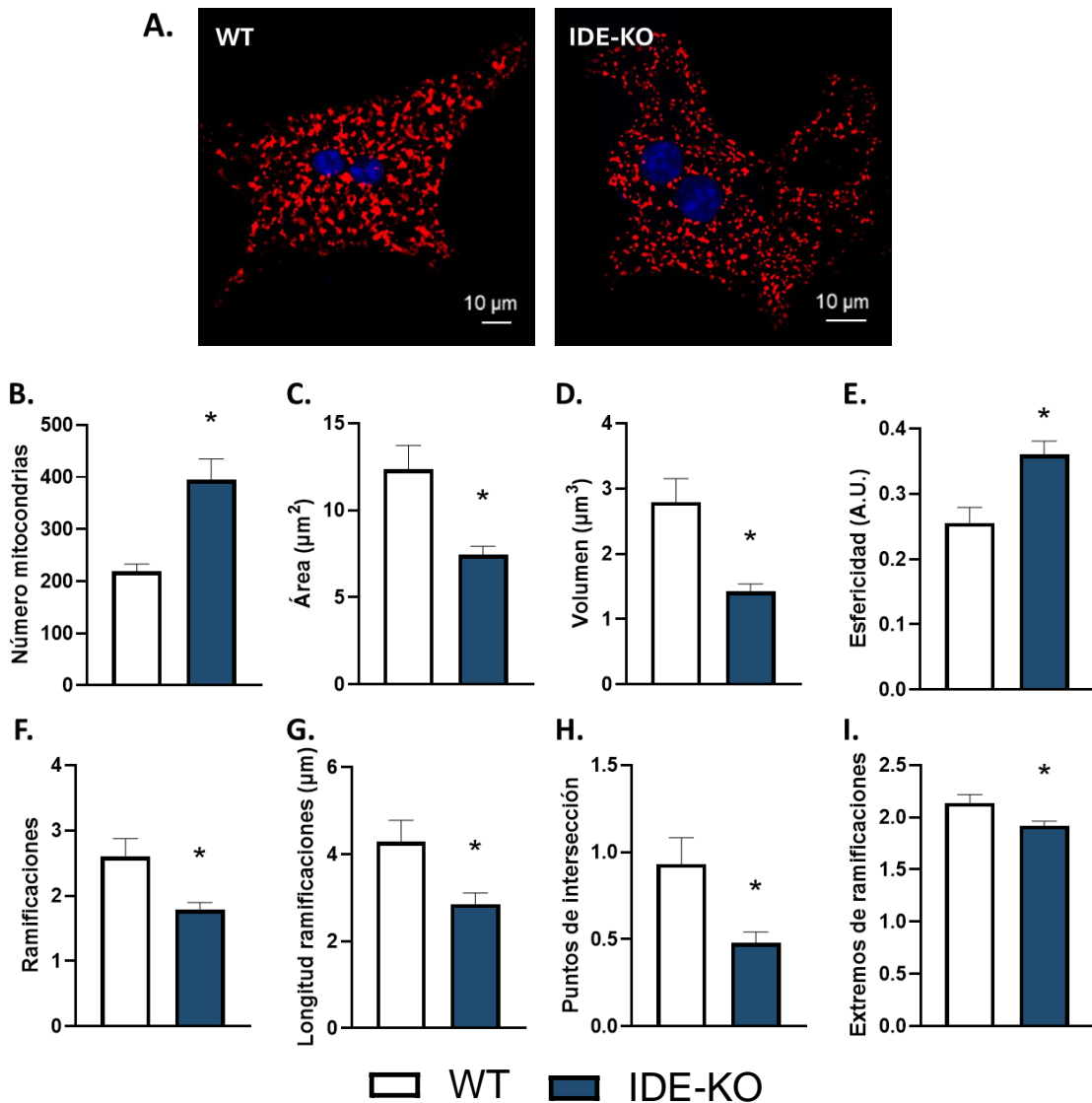


Figura 51. Análisis de la estructura mitocondrial en hepatocitos aislados de ratones WT e IDE-KO. (A) Imagen representativa de la red mitocondrial en hepatocitos de ratones WT y carentes de IDE, IDE-KO. Mitocondria (rojo), núcleo (azul). Escala: 10 μm. (B) Número de mitocondrias por célula. (C) Área por mitocondria. (D) Volumen por mitocondria. (E) Ratio de esfericidad. Valor 1 = Mitocondria esférica, Valor 0 = Mitocondria alargada e irregular. (F) Número de ramificaciones por mitocondria. (G) Longitud de cada ramificación. (H) Número de bifurcaciones por cada ramificación. (I) Número de puntos finales de cada ramificación y posible punto de conexión entre mitocondrias. Los datos son la media ± SEM. N=30. *p<0.05 vs. control. Estadística mediante T-Test.

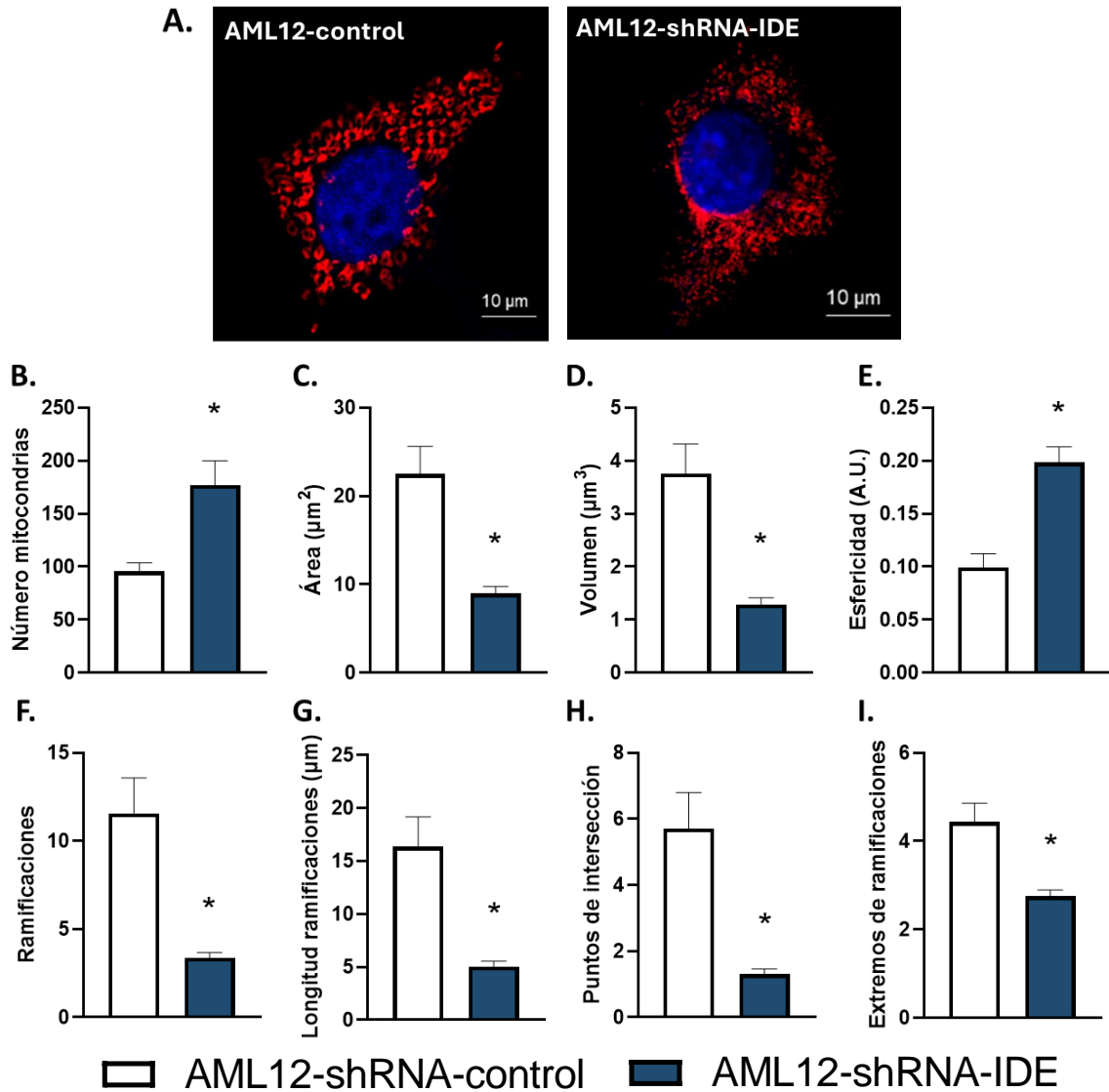


Figura 52. Análisis de la estructura mitocondrial en AML12-shRNA-IDE. (A) Imagen representativa de la red mitocondrial en AML12 control y AML12-shRNA-IDE. Mitocondria (rojo), núcleo (azul). Escala: 10 µm. (B) Número de mitocondrias por célula. (C) Área por mitocondria. (D) Volumen por mitocondria. (E) Ratio de esfericidad. Valor 1 = Mitocondria esférica, Valor 0 = Mitocondria alargada e irregular. (F) Número de ramificaciones por mitocondria. (G) Longitud de cada ramificación. (H) Número de bifurcaciones por cada ramificación. (I) Número de puntos finales de cada ramificación y posible punto de conexión entre mitocondrias. Los datos son la media ± SEM. N=30. *p<0.05 vs. control. Estadística mediante T-Test.

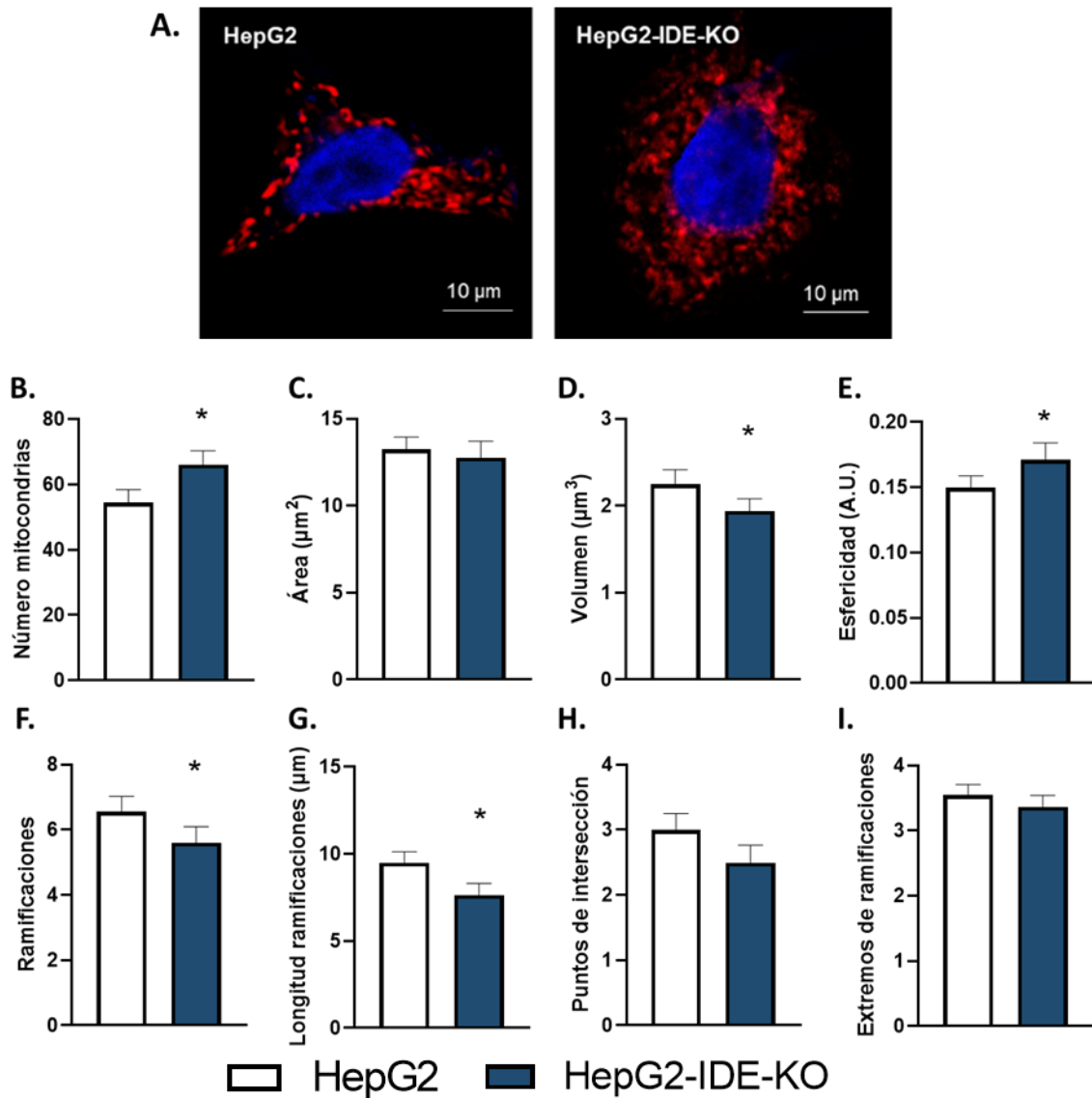


Figura 53. Análisis de la estructura mitocondrial en HepG2-IDE-KO. (A) Imagen representativa de la red mitocondrial en HepG2 WT y HepG2-IDE-KO. Mitocondria (rojo), núcleo (azul). Escala: 10 μm . (B) Número de mitocondrias por célula. (C) Área por mitocondria. (D) Volumen por mitocondria. (E) Ratio de esfericidad. Valor 1 = Mitocondria esférica, Valor 0 = Mitocondria alargada e irregular. (F) Número de ramificaciones por mitocondria. (G) Longitud de cada ramificación. (H) Número de bifurcaciones por cada ramificación. (I) Número de puntos finales de cada ramificación y posible punto de conexión entre mitocondrias. Los datos son la media \pm SEM. N=30. * $p < 0.05$ vs. control. Estadística mediante T-Test.

Con el fin de identificar cuál de las isoformas de IDE es la responsable de este fenotipo morfológico producido por la ausencia de la proteína, se analizó el perfil morfológico en células HepG2-IDE-KO en las que se reconstituyeron los niveles de IDE. Dicha reconstitución se llevó a cabo mediante la transfección de la isoforma mitocondrial (IDE-Met¹) o citoplasmática (IDE-Met⁴²) de IDE.

Aparentemente, ni la reconstitución de la isoforma mitocondrial ni de la citoplasmática producen un cambio en la morfología ni en la complejidad de la red mitocondrial en estas células en comparación con las células control carentes de IDE (**Figura 54**). A pesar de observar variaciones en los distintos experimentos realizados, la variabilidad hizo que el conjunto de resultados no mostrara diferencias significativas.

Esto indica que los resultados obtenidos presentan una precisión limitada, lo que compromete su fiabilidad y, en consecuencia, disminuye su capacidad para ofrecer conclusiones definitivas. Por ello, es necesario realizar más experimentos al respecto para obtener conclusiones más sólidas y completas.

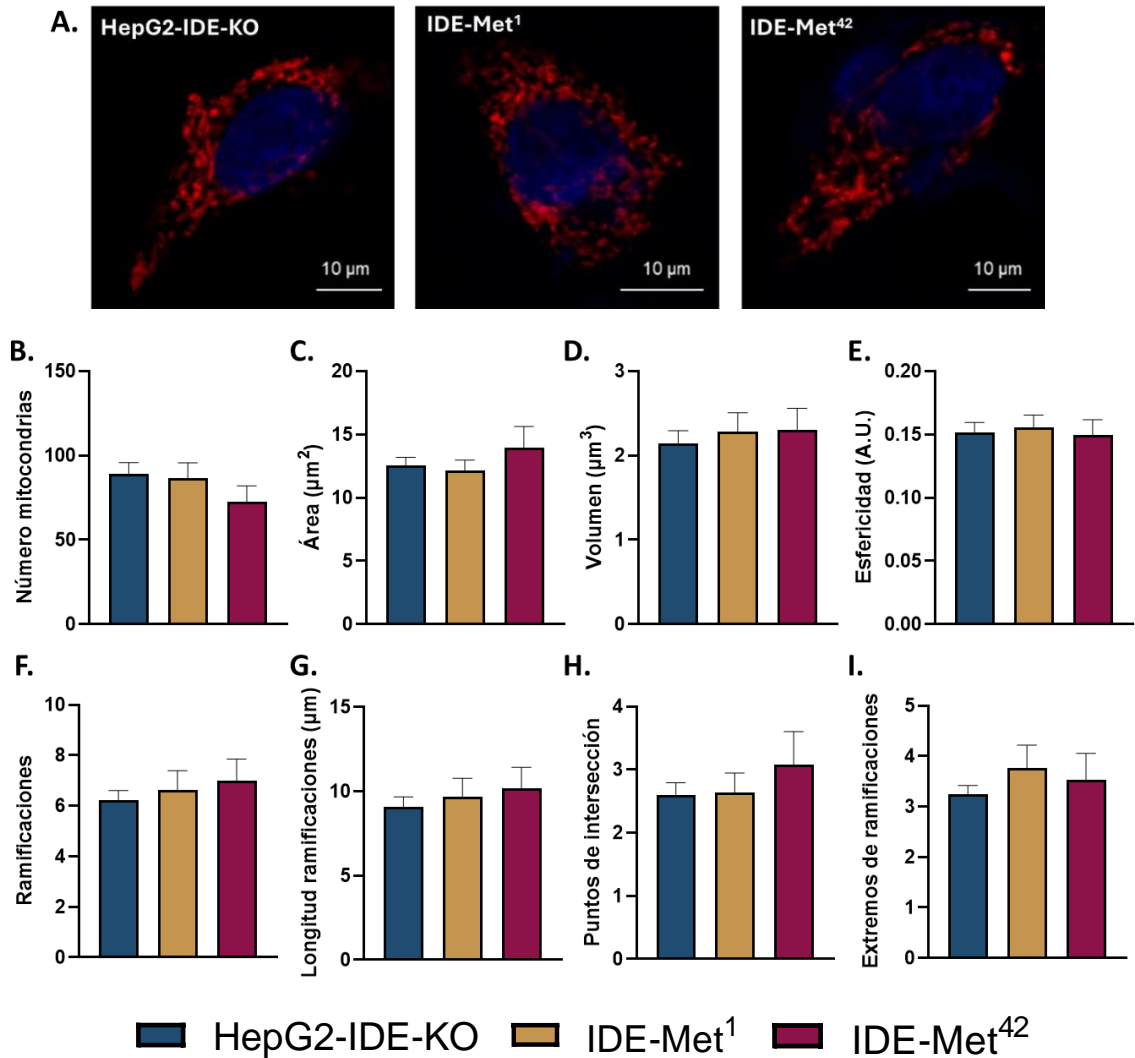


Figura 54. Análisis de la estructura mitocondrial en HepG2-IDE-KO con reconstitución de IDE mitocondrial y citoplasmática. (A) Imagen representativa de la red mitocondrial en HepG2-IDE-KO carentes de IDE y reconstituidos con IDE-Met¹ o IDE-Met⁴². Mitocondria (rojo), núcleo (azul). Escala: 10 μm. **(B)** Número de mitocondrias por célula. **(C)** Área por mitocondria. **(D)** Volumen por mitocondria. **(E)** Ratio de esfericidad. Valor 1 = Mitocondria esférica, Valor 0 = Mitocondria alargada e irregular. **(F)** Número de ramificaciones por mitocondria. **(G)** Longitud de cada ramificación. **(H)** Número de bifurcaciones por cada ramificación. **(I)** Número de puntos finales de cada ramificación y posible punto de conexión entre mitocondrias. Los datos son la media ± SEM. N=30. Estadística mediante One-Way ANOVA.

6.6.2 Estudio de la maquinaria proteica

La morfología mitocondrial está regulada a través de las proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial. La fusión está mediada principalmente por Mfn1, Mfn2 y Opa1, mientras que la fisión está regulada por Drp1 y Fis1.

En este trabajo se observó una alteración en la morfología de hepatocitos carentes de IDE. En consecuencia, se procedió a investigar en detalle el mecanismo regulador de dicho proceso en el que se analizó la expresión de la maquinaria proteica involucrada en esta regulación dinámica.

Con este fin, las células HepG2-IDE-KO fueron transfectadas con la isoforma mitocondrial de IDE. Posteriormente, tanto las células WT como las células deficientes de IDE, transfectadas y no transfectadas, fueron estimuladas con glucagón a una concentración de 50 ng/ml durante tiempos cortos, específicamente a los 0, 10 y 20 minutos.

En las células HepG2-IDE-KO, así como en las reconstituidas con la isoforma mitocondrial de IDE, no se observaron cambios en la expresión de las proteínas de fusión Mfn1, Mfn2 y Opa1 en comparación con las células control WT, tanto en condiciones basales como tras la estimulación con glucagón (**Figura 55**). Estos resultados demuestran que el efecto de la ausencia de IDE sobre la dinámica mitocondrial no se debe a una menor capacidad de fusión.

Sin embargo, se observó una reducción en la expresión de las proteínas de fisión Drp1 y Fis1 (**Figura 55**) en células HepG2-IDE-KO con reconstitución de la IDE mitocondrial, en comparación con las células carentes de IDE. Esto indica que los efectos en la dinámica mitocondrial mediados por la isoforma mitocondrial de IDE se deben a una menor capacidad de fisión.

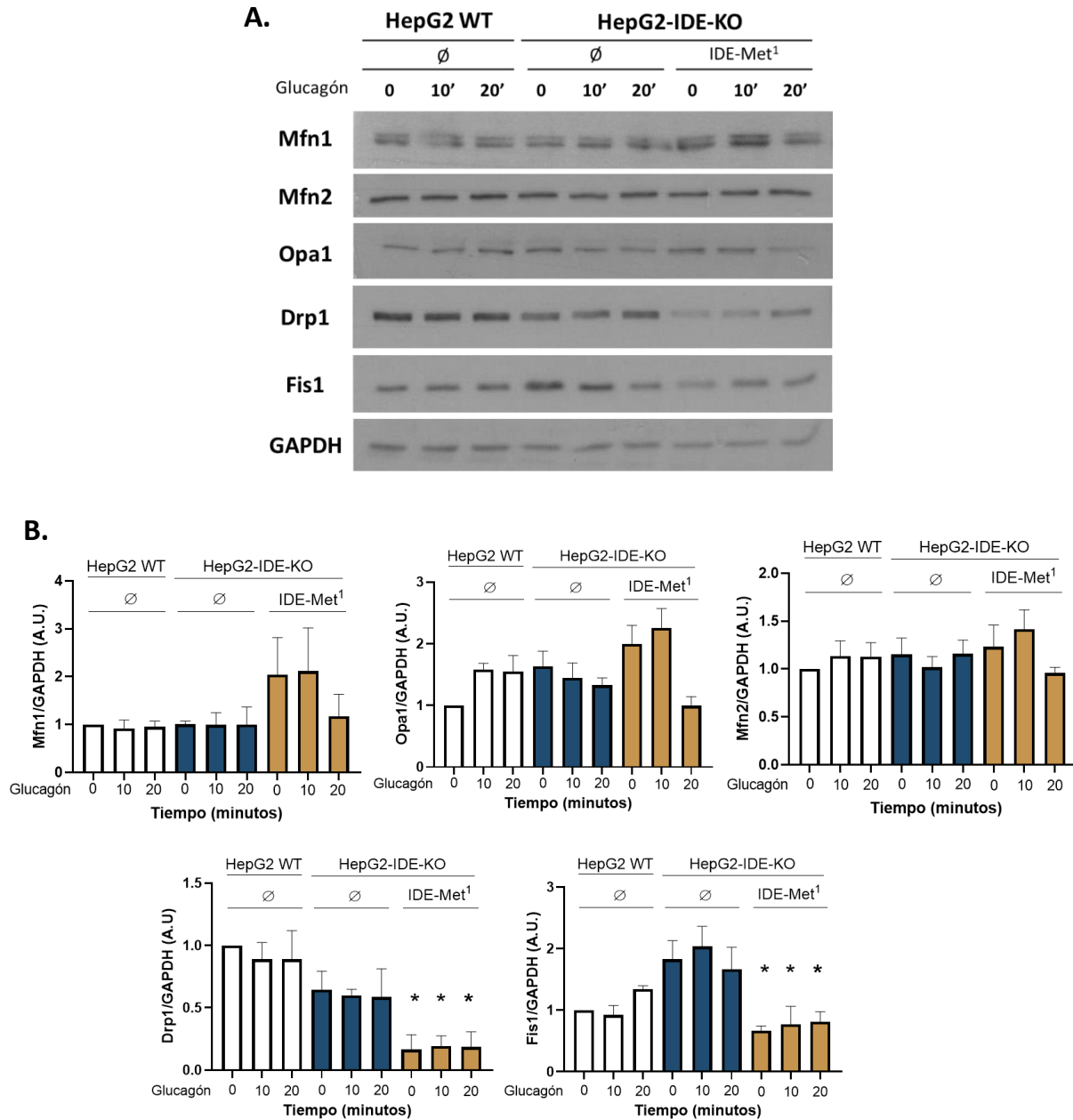


Figura 55. Expresión de proteínas de dinámica mitocondrial en HepG2. (A) Imagen WB representativa de la expresión de las proteínas de fusión (Mfn1, Mfn2, Opa1) y fisión mitocondrial (Drp1 y Fis1) con estimulación con glucagón a 10 y 20 minutos en células HepG2 WT, KO y con expresión reconstituida de la isoforma mitocondrial. **(B)** Cuantificación de los niveles de proteínas de fusión y fisión. GAPDH como control de carga. Los datos son la media \pm SEM. N=3. * p <0.05 vs. Control. Estadística mediante One-Way ANOVA.

DISCUSIÓN

IDE como diana terapéutica en el tratamiento de la DM2

La diabetes mellitus se ha convertido en una de las pandemias más relevantes del siglo XXI, con una tasa de prevalencia global en adultos que ha ascendido del 4.7% en 1980 al 10,5% en 2021. En 2021, se informó que esta enfermedad representó más del 30% de las muertes a nivel global [2]. Estas cifras enfatizan la necesidad urgente de detener la expansión de esta patología, lo que solo se logrará a través de un entendimiento más profundo de la enfermedad a nivel celular y molecular.

A pesar de los notables progresos alcanzados en las últimas décadas, los tratamientos para esta enfermedad no son totalmente satisfactorios. El tratamiento actual de la DM2 se basa en un enfoque multidimensional que incluye modificaciones en el estilo de vida, medicamentos y, en algunos casos, intervenciones quirúrgicas. Inicialmente, se recomienda la adopción de una dieta equilibrada [177, 178] y un aumento en la actividad física [179, 180], ya que estas medidas pueden mejorar la sensibilidad a la insulina y ayudar a controlar los niveles de glucosa en sangre. Cuando las modificaciones en el estilo de vida no son suficientes, se utilizan fármacos orales, como metformina, sulfonilureas e inhibidores de SGLT2, que actúan a través de diferentes mecanismos para regular la glucosa [10, 181-183]. En casos más avanzados, se puede considerar la insulina exógena o tratamientos más recientes, como los agonistas del receptor de GLP-1. Actualmente, se está desarrollando un prometedor fármaco basado en el triple agonista de GLP-1, GIP (péptido insulínico dependiente de glucosa) y glucagón. Este fármaco, retatrutida, mejora la secreción de insulina, reduce los niveles de glucosa en sangre, tiene efectos sobre el metabolismo lipídico y promueve la pérdida de peso [184]. A pesar de los progresos en los tratamientos, el cumplimiento de la terapia y la personalización del enfoque terapéutico son fundamentales para optimizar los resultados en los pacientes con DM2.

Según la Organización Mundial de la Salud, existen tres pilares fundamentales para reducir la expansión y desarrollo de la DM2: la prevención, el diagnóstico y el tratamiento. En este contexto, la enzima IDE ha despertado un gran interés como posible objetivo terapéutico en el tratamiento de pacientes

con DM2. Sin embargo, la expresión y función de IDE en la contribución fisiopatológica de esta enfermedad no parece estar clara. Un número creciente de investigaciones ha vinculado características metabólicas de la DM2 con alteraciones en los niveles de la enzima IDE [7, 8, 133-141]. No obstante, debido a que la mayoría de los estudios clínicos se han limitado a la evaluación fenotípica basada en pruebas de suero o plasma, la relación entre causa y efecto continúa siendo un tema sin aclarar. Por lo tanto, se han realizado estudios de ganancia y pérdida de función de IDE en modelos animales experimentales para evaluar si es un buen objetivo terapéutico y prevenir el desarrollo de patologías relacionadas con la diabetes tipo 2.

Por un lado, cabe destacar el uso de la metformina como uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de la DM2, con posible efecto protector para la enfermedad de Alzheimer. El tratamiento con metformina en un modelo transgénico de ratón con enfermedad de Alzheimer mostró una reducción en la acumulación de placas de A β en el cerebro de los ratones, principal causa de desarrollo de esta patología. Esto indica, al igual que se ha visto en humanos [135], una relación entre el uso del fármaco antidiabético y el aumento en la actividad de IDE [135, 185].

Por otro lado, en el modelo de rata diabética Goto-Kakizaki se ha demostrado que la doble mutación H18R y A890V en el gen de *Ide* produce una disminución en la capacidad de degradar insulina y, por ende, resistencia a la misma [133].

Dado que estos estudios muestran que la alteración de la IDE está relacionada con la fisiopatología y el tratamiento de DM2, se investigó el impacto directo de IDE en el metabolismo celular mediante su inhibición genética en modelos animales.

Los hallazgos obtenidos en ratones con eliminación total de IDE (IDE-KO) respaldaron la noción de que la inhibición de la actividad de IDE conduce a hiperinsulinemia. Sin embargo, este modelo de ratón desarrolló resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, lo cual fue explicado por los autores como un fenotipo secundario debido a la hiperinsulinemia [142-145]. Estas observaciones

motivaron a nuestro grupo al desarrollo de nuevos modelos murinos con eliminación específica de IDE, mediada por Cre-loxP, para obtener un conocimiento más detallado sobre el impacto de esta proteína.

Por un lado, la eliminación genética de *Ide* en células β pancreáticas (ratones B-IDE-KO) se asocia con niveles elevados de péptido C en plasma, probablemente debido a una secreción de insulina constitutiva. Esto conduce a la resistencia a la insulina hepática, aunque con una tolerancia a la glucosa normal [146]. Por otro lado, la eliminación dirigida de *Ide* en células α (ratones A-IDE-KO) provoca una secreción constitutiva de glucagón, lo que resulta en hiperglucagonemia [147]. Finalmente, la eliminación genética de *Ide* en hepatocitos (ratones L-IDE-KO) resulta en intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina hepática, sin alterar la secreción y degradación de esta [148]. Por el contrario, la sobreexpresión de IDE en el hígado mejora la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa, sin alterar la eliminación de dicha insulina en ratones obesos inducidos por la dieta [149].

Cada uno de estos modelos de ratón de IDE presenta características de las alteraciones metabólicas observadas en el contexto de la DM2 y la obesidad, lo que respalda la idea de que las variaciones en los niveles de expresión de IDE se asemejan a las características de un fenotipo diabético. Así se sugiere que la pérdida de IDE podría tener un papel clave en la patogénesis de la hiperglucemia en DM2. Comprender los mecanismos moleculares involucrados se vuelve esencial para desarrollar enfoques terapéuticos efectivos en la lucha contra la diabetes mellitus.

Regulación de la señalización de insulina

Los ratones L-IDE-KO, que presentan resistencia a la insulina, poseen niveles reducidos del receptor de insulina IR β y una disminución en la fosforilación de este [148], lo que indica un bloqueo en su vía de señalización en el hígado. Además, se observó una reducción en la actividad de AKT1 y AKT2,

con un aumento en la expresión de genes gluconeogénicos como *Pck1* y *G6pc*, lo que sugiere que FoxO1 se transloca al núcleo y activa la gluconeogénesis.

Tomando como referencia este modelo murino, se decidió generar una línea celular inmortalizada con delección completa de IDE a partir de la línea HepG2 mediante tecnología CRISPR/Cas9. Dicha delección se comprobó a nivel de ADN (PCR convencional), de proteína (Western Blot) y de actividad (ensayo enzimático).

Asimismo, se analizó la señalización de insulina en este nuevo modelo celular, comprobándose que, al igual que en los ratones L-IDE-KO, las proteínas clave de la vía de señalización y sus niveles de fosforilación estaban significativamente reducidos. Esta alteración en la señalización apunta a una disfunción en los mecanismos de regulación de la insulina, lo que refuerza la validez del modelo. Por tanto, este sistema *in vitro* constituye una plataforma sólida para explorar con mayor profundidad los mecanismos moleculares que regulan la vía de la insulina y su impacto en el metabolismo celular, abriendo nuevas posibilidades para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

Hace tan solo dos décadas se descubrieron dos sitios de inicio de traducción en *Ide* que codifica las proteínas Met¹-IDE y Met⁴²-IDE. Mientras que Met⁴²-IDE tiene una localización citoplasmática, Met¹-IDE contiene una secuencia que la dirige a la mitocondria [103]. Aún se desconoce el papel específico de cada isoforma, lo que plantea importantes preguntas sobre sus funciones en distintos contextos celulares y sus implicaciones en el metabolismo de la glucosa.

Por ello, en este trabajo se llevaron a cabo investigaciones con el objetivo de dilucidar cuál de las dos isoformas de IDE es responsable de la resistencia a la insulina observada en el modelo celular HepG2-IDE-KO. Los resultados revelaron que la isoforma mitocondrial restauraba los niveles normales de las proteínas implicadas en la señalización de insulina y los niveles de fosforilación, lo que sugiere que esta es la principal responsable de dicho proceso. La ausencia de IDE en las mitocondrias puede influir en la producción de ROS, lo que puede activar la quinasa N-terminal c-Jun (JNK). Cuando JNK se activa de

forma excesiva puede fosforilar IRS-1 en residuos de serina y treonina, lo que reduce la capacidad de IRS-1 de ser fosforilada en tirosina [186]. Esta fosforilación inhibe la capacidad de IRS-1 para transmitir la señal de insulina, lo que resulta en una disminución de la señalización y contribuye a la resistencia a la hormona. Además, la sobreproducción de ROS puede activar factores de transcripción que promueven la expresión de genes involucrados en la lipogénesis, e inhiben la expresión de aquellos que facilitan la oxidación de lípidos [187]. Esto podría explicar el papel regulador de IDE dentro de la mitocondria en la señalización de insulina. No obstante, es necesario profundizar en el papel de la isoforma citoplasmática para determinar si la mitocondrial actúa de forma independiente o si ambas isoformas colaboran de manera sinérgica.

Estos resultados son coherentes con los observados en el modelo murino de ganancia de función de la isoforma larga IDE con dieta alta en grasas, en el que se mejora la señalización de insulina en comparación con el grupo control [149]. Sin embargo, en esta investigación no se diferenciaron las isoformas específicas involucradas. Esto subraya la importancia de seguir investigando sobre las funciones de dichas isoformas para comprender mejor su papel en el metabolismo.

Una limitación de estos modelos es que las manipulaciones genéticas de IDE se han limitado a la eliminación o sobreexpresión de la proteína. Esto, además de alterar tanto la actividad como los niveles de la proteína, también impide discriminar entre las distintas isoformas. Para abordar dicho problema, en el presente estudio se generó una isoforma mutante de IDE que inhibe la degradación de péptidos. Esta mutación, que sustituye el ácido glutámico por una glutamina en la posición 111, resulta en la pérdida de su función enzimática [109]. Esta estrategia permite investigar la actividad proteolítica de IDE sin modificar la proteína en sí, lo que proporciona información valiosa sobre su función en la sensibilidad a la insulina hepática.

Los resultados obtenidos con esta isoforma mutante mitocondrial fueron comparables a los de la isoforma con actividad enzimática, lo que plantea que la regulación de la señalización de insulina podría no depender de la actividad catalítica de IDE. En cambio, es posible que esta regulación esté vinculada a su

función como proteína reguladora o estructural o a otros mecanismos aún por explorar [188], lo que abre nuevos caminos para investigar las diversas funciones que esta proteína puede tener en la regulación del metabolismo y en la homeostasis de la glucosa. Este descubrimiento refuerza los resultados previos de nuestro grupo en los que los niveles plasmáticos y el aclaramiento de insulina no mostraron alteraciones en los modelos animales de pérdida o ganancia de función de IDE. Esto resulta sorprendente considerando que IDE es ampliamente reconocida por su papel en la degradación de insulina y otros péptidos [148, 149]. Además, y reforzando este conocimiento, la inhibición de IDE con NTE-1 en modelos de ratones con obesidad inducida por dieta, mostró una mejora significativa en la respuesta a glucosa durante las pruebas de tolerancia oral. Sin embargo, no produjo cambios notables en la tolerancia ni en los niveles de insulina circulante [154]. Estos resultados cuestionan nuevamente el papel de IDE como el principal mediador de la degradación de insulina hepática.

Dichas observaciones conducen a la hipótesis de que IDE desempeña funciones no proteolíticas que hasta ahora han permanecido desconocidas. Nuestro grupo demostró que IDE regula, tanto en hígado como en páncreas, los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT2 y los niveles de IR hepático. Esto sugiere un papel no proteolítico de IDE en la regulación del tráfico intracelular de proteínas implicadas en la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa. Teniendo en cuenta todo esto, una teoría muy apoyada en nuestro laboratorio es que otras proteínas podrían ser más críticas para el aclaramiento de insulina, como la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM1). Dicha proteína es un sustrato de IR en el hígado, que ha sido descrito como el principal modulador del aclaramiento hepático de insulina por Poy *et al.*, ya que regula la endocitosis y la degradación de la insulina mediada por IR de forma dependiente de la fosforilación [189, 190]. Nuestro grupo corroboró este hecho al observar una fosforilación intensa de CEACAM1 tras la estimulación con insulina en ratones WT [148]. En contraposición, en ratones L-IDE-KO no se produjo dicha fosforilación, a pesar de que los niveles de proteína CEACAM1 no cambiaron. Por lo tanto, esto apunta a que IDE participa en la internalización del complejo insulina-IR-CEACAM1. Queda por esclarecer si esta función está vinculada a su actividad proteasa. Sin

embargo, y considerando los resultados obtenidos en este estudio, donde la actividad enzimática no juega un papel en el proceso de señalización intracelular de insulina, parece razonable concluir que, si este es el principal mecanismo molecular que lo regula, la actividad de la enzima no tiene un papel significativo. Esto respalda nuevamente la idea de que inhibir IDE podría ser contraproducente en tratamientos futuros para pacientes diabéticos.

La disfunción en el reciclaje de IR debido a la ausencia de IDE puede estar relacionada no solo con el impedimento en la formación del complejo funcional de CEACAM1, sino también con una disrupción del citoesqueleto. Diversos estudios han demostrado que el citoesqueleto de actina y los microtúbulos, que regulan tanto la internalización como el transporte de las vesículas endocíticas, podrían verse afectados por la falta de IDE, lo que comprometería aún más el proceso de tráfico intracelular, endocitosis y reciclaje del receptor de insulina. En primer lugar, el análisis transcriptómico llevado a cabo en esta tesis reveló una reducción significativa en la expresión del gen EML1 en el modelo celular HepG2-IDE-KO en comparación con el control. Este gen codifica una proteína que contribuye a la organización y estabilidad de los microtúbulos, lo que ayuda a mantener la integridad estructural de las células. En segundo lugar, IDE interactúa con los complejos solubles de vimentina/nestina durante la mitosis [191]. Este descubrimiento sugiere que la IDE podría estar involucrada en la regulación del recambio y localización subcelular de ciertas proteínas y péptidos citosólicos. En segundo lugar, las integrinas, que forman adhesiones focales conectando el citoesqueleto de actina con la membrana plasmática, dependen de la actividad de la quinasa de adhesión focal (FaK). La interacción de IDE con FaK [192] podría tener implicaciones importantes en el reclutamiento de proteínas del citoesqueleto y en la formación de adhesiones focales, cruciales para la migración, supervivencia y proliferación celular. Además, el análisis transcriptómico en HepG2-IDE-KO mostró una regulación del gen EVL (del inglés, *Enabled/VASP-Like Protein*). EVL, junto con su interacción con FaK, promueve la polimerización de la actina y la formación de filopodios, lo que mantiene la capacidad migratoria y adherente de las células [193, 194]. La represión de la expresión de EVL podría resultar en una disminución en la formación de protrusiones celulares, lo que afectaría negativamente la capacidad

de las células para responder a estímulos ambientales. Por último, IDE se une a los oligómeros de α -sinucleína de manera no proteolítica [126], lo que forma complejos estables que impiden la formación amiloide. La interacción entre IDE y α -sinucleína es importante para prevenir la acumulación de oligómeros y fibrillas, cuya formación se asocia con la disrupción de la red de microtúbulos y el deterioro de la secreción de insulina y glucagón [145, 147].

En resumen, la falta de IDE podría afectar tanto a la formación del complejo con CEACAM1 como, de manera indirecta, al citoesqueleto, lo que compromete el proceso de endocitosis y el reciclaje del receptor de insulina. Esto crea un doble impacto negativo en la señalización intracelular, que podría estar relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina y trastornos metabólicos asociados.

Como se ha visto hasta el momento, el modelo de rata diabética Goto-Kakizaki, el modelo de ratón L-IDE-KO y la línea celular HepG2-IDE-KO presentan resistencia a la insulina. En este último modelo, es posible que las alteraciones en la isoforma mitocondrial de la enzima IDE sean clave. Asimismo, la mutación H18R, que se localiza en los primeros 41 aminoácidos de la secuencia mitocondrial de IDE en la rata Goto-Kakizaki [133], sugiere una posible disfunción en la localización de la proteína dentro de la mitocondria. Esto podría interferir en su función en la señalización intracelular y contribuir a la resistencia a la insulina. Dichas observaciones demuestran que la isoforma mitocondrial de IDE desempeña un papel esencial en la homeostasis de la insulina, y que su alteración, ya sea por mutaciones puntuales o deleciones, tiene consecuencias críticas en el desarrollo de resistencia a la insulina en el hígado.

Los mecanismos moleculares precisos por los que la IDE mitocondrial regula el tráfico intracelular en respuesta a la insulina, y su relevancia en la sensibilidad a la hormona, aún requieren de investigación. Asimismo, estudiar el papel de IDE citoplasmática en este proceso puede ser de gran importancia para desentramar dichos mecanismos.

Regulación de la señalización de glucagón

La deficiencia de IDE ha mostrado un impacto negativo en la señalización de insulina, lo que provoca una pérdida en la capacidad de esta hormona para suprimir la expresión de los genes responsables de la gluconeogénesis. El desbalance en la regulación de dichos genes afecta a la homeostasis de la glucosa, un proceso esencial en el que interactúan hormonas opuestas como la insulina, que favorece la absorción y el almacenamiento de glucosa, y el glucagón, que impulsa su liberación en la sangre, lo que garantiza así un equilibrio vital para una función metabólica adecuada.

En el contexto de la investigación hepática, se realizó un estudio en este trabajo con el modelo de ratón L-IDE-KO que se enfocó en la acción del glucagón, lo que permitió una exploración más profunda de las vías de señalización asociadas. Investigaciones previas del grupo mostraron que los ratones L-IDE-KO presentan un incremento significativo en los niveles plasmáticos de glucagón a la edad de un mes, aunque esta diferencia se pierde con el tiempo (*Datos del grupo no publicados*).

Del mismo modo, los datos clínicos han demostrado que tanto los pacientes con DM1 como con DM2 presentan niveles elevados de glucagón circulante, lo que se correlaciona directamente con el desarrollo de hiperglucemia [195, 196]. De manera similar, el modelo de ratón A-IDE-KO presentaba hiperglucagonemia endógena acompañada de una regulación a la baja del receptor de glucagón hepático (GCGR) y de su señalización [147]. Asimismo, el modelo de ratón L-IDE-KO mostró una reducción en los niveles de GCGR (*Datos pendientes de publicación*), lo cual coincidió con un aumento en la expresión de genes gluconeogénicos y un deterioro en la tolerancia a la glucosa, tanto en condiciones de dieta estándar como de dieta alta en grasas [148, 149]. Esto subraya de nuevo la importancia de IDE en la regulación hormonal y su impacto en el metabolismo de la glucosa.

De manera previa a la realización de la presente tesis, se tomó como referencia el modelo murino L-IDE-KO y se generó una línea celular inmortalizada de hepatocitos con delección parcial de IDE (50%) a partir de la

línea AML12 utilizando la tecnología shRNA (shRNA-AML12-IDE). Este enfoque experimental permitió profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes a la deficiencia de IDE en los hepatocitos. Uno de los hallazgos más relevantes fue que, de manera análoga a lo observado con el receptor de insulina, la pérdida de IDE también provoca una reducción en los niveles de GCGR en las células hepáticas. Dicha disminución del receptor no se encuentra mediada por cambios en la expresión génica, sino que corresponde a una regulación postranscripcional, lo que introduce nuevas interrogantes sobre los mecanismos regulatorios que fundamentan esta modificación. Un descubrimiento peculiar fue que, a pesar de la reducción en la señalización del glucagón en los hepatocitos, la transcripción de los genes gluconeogénicos estaba aumentada (*Datos pendientes de publicación*). Esto ha sido demostrado en este trabajo en el modelo murino L-IDE-KO. En definitiva, tanto las observaciones en los ratones L-IDE-KO como en las células shRNA-AML12-IDE, revelan aspectos novedosos de la biología del glucagón en estos modelos experimentales únicos.

Los resultados del grupo mostraron que los niveles totales del factor de transcripción CREB estaban reducidos tanto en los hepatocitos primarios L-IDE-KO como en las células AML12-shRNA-IDE. Sin embargo, los niveles de CREB fosforilado (pCREB) aumentaban tras 1 hora de estimulación con glucagón, a pesar de la reducción de los niveles de GCGR y AMPc (*Datos pendientes de publicación*).

Los estudios transcriptómicos realizados en el modelo celular HepG2-IDE-KO han revelado una disminución en la expresión del gen GNG4, que codifica la subunidad gamma 4 de la proteína G, esencial para la formación y estabilidad del heterotrímero. Como consecuencia de su activación por un ligando, ocurre la disociación de la subunidad alfa del complejo, lo que permite que la subunidad gamma se active e interactúe con diversos efectores, como la adenilato ciclasa, que cataliza la conversión de ATP en AMPc [197]. En el contexto del GCGR, la deficiencia de IDE en esta línea celular conduce a una disfunción del receptor, lo que resulta en una disminución de la activación de su vía de señalización. Además, la alteración en dicha señalización también se puede atribuir a la regulación al alza del gen PDE4D (fosfodiesterasa 4D), el cual es responsable

de la degradación del AMPc [198]. Estos hallazgos sugieren posibles mecanismos que podrían explicar la inhibición inicial de la vía de señalización del glucagón, mediada por la regulación transcripcional y postranscripcional de las proteínas implicadas en esta vía en ausencia de IDE.

El aumento observado en la fosforilación de los sustratos dependientes de PKA junto con la activación sostenida de pCREB en shRNA-AML12-IDE demuestran el incremento de la transcripción de genes gluconeogénicos en los hepatocitos. Esto apunta a que, en condiciones de deficiencia de IDE, otros mecanismos independientes de la señalización clásica del glucagón podrían estar activando PKA y CREB. El estudio transcriptómico reveló una regulación al alza del gen S100A10 en el modelo HepG2-IDE-KO en comparación con el control. En consecuencia, un aumento de esta proteína también fue observado en pacientes diabéticos [199]. Dicho gen codifica la proteína de unión al calcio que participa en la regulación de la señalización celular y la activación de PKA [200, 201], lo que podría explicar cómo la deficiencia de IDE afecta parcialmente la señalización del glucagón mientras aumenta la gluconeogénesis.

En este y en estudios previos se ha observado mediante PCR un aumento de los genes gluconeogénicos en hepatocitos carentes de IDE tras la estimulación con glucagón, lo que ha sido corroborado en el análisis transcriptómico. En particular, se detectó un aumento en la expresión de los genes HKDC1, G6PC1 y SLC37A2 en las células HepG2 carentes de IDE. En primer término, HKDC1, una hexoquinasa que convierte la glucosa en glucosa-6-fosfato (G6P), promueve el metabolismo anabólico de la glucosa, lo que sugiere un aumento en la capacidad glucolítica. Por su parte, SLC37A2, un transportador de G6P, facilita el transporte de este sustrato hacia el retículo endoplasmático (RE) [202]. Finalmente, G6PC1, la glucosa-6-fosfatasa, que se localiza en el lumen del RE, es clave en la etapa final de la gluconeogénesis. En el lumen del RE, la G6P es desfosforilada por la enzima G6PC1, lo que genera glucosa libre que es exportada al citoplasma y liberada en el torrente sanguíneo [203, 204], completando así la última etapa de la gluconeogénesis. En conjunto, la sobreexpresión de estos tres genes sugiere una activación coordinada de la gluconeogénesis, lo que resulta en una mayor producción y liberación de glucosa

por el hígado. Este hecho contribuye a la desregulación observada en condiciones patológicas como la resistencia a la insulina y DM2.

Al igual que lo analizado en este modelo, diversos estudios clínicos han demostrado un aumento de HKDC1 en pacientes en un estadio avanzado de enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD) y de SLC37A2 en pacientes con DM2 [199, 205].

En conjunto, estas observaciones concuerdan con el fenotipo descrito en los hepatocitos carentes de IDE e indican que la regulación de estos genes y proteínas juega un papel crítico en el contexto de enfermedades hepáticas y metabólicas, lo que subraya el potencial de IDE como objetivo terapéutico para el manejo de estas alteraciones.

Las modificaciones observadas en la expresión génica sugieren una activación aumentada de la vía gluconeogénica, lo que resulta en una mayor producción endógena de glucosa. Este incremento fue validado mediante ensayos de cuantificación, que revelaron un aumento significativo en las concentraciones basales de glucosa en células deficientes en IDE shRNA-AML12-IDE. La elevación fue aún más pronunciada tras la estimulación con glucagón, lo que concuerda con la activación esperada de la vía gluconeogénica. Estos resultados no solo respaldan los hallazgos previos obtenidos en este modelo celular, sino que también sustentan la hipótesis de que, en los modelos animales IDE-KO y L-IDE-KO, el incremento de la glucosa circulante podría atribuirse a un aumento en la producción de glucosa hepática [142, 148]. Este fenotipo refuerza la relevancia de nuestros modelos, ya que refleja con precisión lo observado en pacientes diabéticos [206], y consolida la validez de los mecanismos propuestos en este estudio.

El papel específico de cada isoforma de IDE en el metabolismo de la glucosa aún es desconocido. En este contexto, el estudio detallado de cuantificación de glucosa en hepatocitos indicó que es la isoforma citoplasmática de IDE la que desempeña un papel clave en la regulación de los niveles de glucosa. Esto apunta a que los genes gluconeogénicos previamente mencionados podrían estar bajo el control directo de la IDE citoplasmática.

A partir de estos descubrimientos, se plantea la hipótesis de que IDE podría estar actuando como un factor de transcripción represor. Esta posibilidad se respalda en un estudio *in silico* que predijo la localización de IDE en el núcleo celular [104]. De igual modo, se propone la hipótesis de que la forma citoplasmática de IDE podría desempeñar un papel regulador al inhibir la translocación de factores de transcripción clave hacia el núcleo, como CREB, FOXO, HNF4 α (factor nuclear hepático) y ChREBP (proteína de unión a elementos reguladores de carbohidratos). Dicha interacción podría limitar el acceso de estos factores a los promotores de genes críticos, lo que modularía la expresión génica relacionada con el metabolismo de la glucosa. Si la IDE citoplasmática no se encuentra presente, se produciría un aumento excesivo de la translocación de estos factores al núcleo, lo que conlleva en una regulación inadecuada de la gluconeogénesis. Por un lado, está descrito que HNF4 α y FOXO requieren de interacciones con PGC-1 α para ejercer un control sobre la transcripción de los genes gluconeogénicos como G6Pasa y PEPCK [207]. Además, la falta de IDE permite que CREB se active sin control, lo que incrementa la producción de glucosa en respuesta a señales como el glucagón, especialmente durante el ayuno. Por otro lado, ChREBP, que regula el metabolismo de carbohidratos y lípidos, también se ve afectado, lo que contribuye a un desequilibrio metabólico en condiciones de alta glucosa [208]. Finalmente, la función de SIRT1, que desacetila y activa a FOXO y PGC-1 α [209], se ve comprometido debido a la incapacidad de IDE para regular estos factores, lo que disminuye su habilidad para mantener la homeostasis energética.

En conjunto, múltiples mecanismos que alteran la regulación transcripcional y postranscripcional de los factores nucleares y coactivadores pueden explicar los efectos observados sobre la gluconeogénesis en condiciones de niveles hepáticos de IDE más bajos. Esta hipótesis abre nuevas vías para investigar el papel multifacético de IDE en la regulación del metabolismo, lo que sugiere de nuevo que su función va más allá de la degradación de insulina.

Regulación del ciclo de Krebs

La carencia de IDE en el modelo celular genera un aumento significativo en la producción de glucosa, lo que, provoca, a su vez, cambios notables en los metabolitos intermedios del ciclo de Krebs (TCA). Dichos cambios pueden explicarse por el incremento en el flujo metabólico de la glucosa y la mayor actividad de las enzimas del ciclo de Krebs. Esto se debe a que este ciclo es el responsable de generar aproximadamente el 67% de los equivalentes reductores por cada molécula de glucosa metabolizada [52].

El aumento en la producción de glucosa junto con la acumulación de piruvato conlleva a una mayor concentración de intermediarios del ciclo de Krebs como: citrato, succinato y α -cetoglutarato. Estos metabolitos son fundamentales no solo para la producción de ATP, sino también para la síntesis de precursores biosintéticos necesarios en varios procesos celulares.

El citrato puede ser exportado al citosol, donde se convierte en oxalacetato y acetil-CoA, lo que promueve la síntesis de lípidos [53]. Esto puede contribuir al almacenamiento de grasa y, por lo tanto, al desarrollo de resistencia a la insulina y a la dislipidemia, ambas características comunes en DM2 y NAFLD [210].

Además, el aumento de los metabolitos del ciclo de Krebs puede afectar otras vías metabólicas clave. Algunos de estos intermediarios, como el α -cetoglutarato, pueden influir en la expresión génica a través de la cromatina y las modificaciones epigenéticas [211]. El succinato, por ejemplo, afecta la metilación de histonas y ADN, lo que altera su expresión génica. Además, su acumulación promueve la estabilización de HIF1 α (factor 1 alfa inducible por hipoxia), lo que conduce a un estado de pseudohipoxia [212]. Asimismo, el fumarato puede modificar proteínas mediante succinación, lo que genera disfunción en las células β pancreáticas [213, 214].

En cuanto al lactato, también se observó un aumento en sus niveles en comparación con el control. El lactato es un metabolito que se produce principalmente durante la glucólisis, especialmente en condiciones de hipoxia o

cuando hay un aumento en la demanda energética que supera la capacidad oxidativa de las células, como puede ser este caso. En pacientes diabéticos, los niveles elevados de lactato reflejan disfunciones en el metabolismo energético y están vinculados a complicaciones metabólicas a largo plazo, como la dislipidemia y el daño tisular [215]. Además, un estudio de González-Casimiro *et al.* sugiere que el lactato influye en la actividad de IDE, lo que evidencia un papel importante del lactato en la regulación del metabolismo [216]. Es posible que la reducción de IDE afecte la capacidad del organismo para metabolizar el lactato adecuadamente. Esto podría contribuir a la acumulación de lactato y a disfunciones en el metabolismo energético, lo que indica que ambos fenómenos pueden estar interrelacionados en el contexto de la enfermedad.

En resumen, el aumento de la actividad del ciclo de Krebs provocado por la deficiencia de IDE genera un desequilibrio en los intermediarios del ciclo y un posible aumento en la producción de ROS, lo que conduce a estrés oxidativo, acumulación de lípidos y alteraciones en la expresión génica. Diversos estudios han demostrado la relación entre la desregulación y acumulación de metabolitos con un mayor riesgo a desarrollar DM2 [217, 218]. Asimismo, un estudio indica que la inhibición de IDE incrementa la respuesta UPR (respuesta a proteínas mal plegadas) [129]. Esta activación crónica de las vías de UPR promueve resistencia a la insulina y un aumento indirecto en la producción hepática de glucosa [219, 220], lo que crea un ciclo vicioso donde la disfunción en la degradación de insulina y el estrés mitocondrial contribuyen a la alteración del metabolismo glucídico. Estos efectos contribuyen a complicaciones graves asociadas con esta patología, por lo que la regulación del metabolismo energético es crucial para mantener la homeostasis celular y energética en esta enfermedad.

Como se ha discutido anteriormente, la IDE citoplasmática desempeña un papel regulador en la producción de glucosa. Sin embargo, dado que muchos de estos procesos, como el TCA, ocurren en la mitocondria, cabría esperar que la IDE mitocondrial desempeñara un papel clave en la regulación de la homeostasis energética. Para esclarecer estos mecanismos, se requieren más investigaciones que profundicen en su funcionamiento y efectos.

Regulación de la función mitocondrial

Uno de los mecanismos clave por los cuales las células responden a la demanda energética creciente, como sucede durante la gluconeogénesis, es a través de la regulación de la respiración mitocondrial. Este proceso permite a las células ajustar la generación de ATP, esencial para sustentar procesos energéticamente demandantes. A medida que más acetil-CoA entra al ciclo de Krebs, se genera más NADH y FADH₂, lo que estimula un mayor flujo de electrones hacia la cadena de transporte de electrones (ETC). Sin embargo, durante la ETC, aproximadamente entre el 0.25% y el 11% del oxígeno consumido por las mitocondrias se convierte en superóxido e hidrógeno, compuestos conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS). El aumento de estas especies genera un estado de estrés oxidativo que daña las células y tejidos [221] y contribuyen al daño mitocondrial en diversas patologías metabólicas [222]. De este modo, investigaciones han demostrado que la falta de IDE induce un desequilibrio en el estado oxidativo hacia un estado prooxidante [223].

En relación con la activación del ciclo de Krebs, los resultados de esta tesis indican que se produce un aumento en el consumo de oxígeno y producción de ATP mitocondrial debido, probablemente, a un mayor rendimiento de los equivalentes reductores en el ciclo TCA. Este hallazgo resulta sorprendente, dado que se ha documentado que tanto el consumo de oxígeno como la producción de ATP están disminuidos en pacientes diabéticos [224].

De manera similar a lo observado en las células β pancreáticas con hiperfunción en la secreción de insulina, la hipótesis plantea que el aumento en la actividad de la ETC y OXPHOS en hepatocitos podría ser un mecanismo compensatorio frente a la disfunción mitocondrial, particularmente en los modelos celulares con deficiencia de IDE sh-AML12-IDE y HepG2-IDE-KO. En estos modelos, caracterizados por resistencia a la insulina e hiperglucemia, el incremento en el consumo de oxígeno y la producción de ATP sugiere que las células intentan adaptarse a un estado metabólico alterado, a pesar de la disminución general de la eficiencia energética que se observa en pacientes diabéticos [224, 225].

Como respaldo a dicha hipótesis, se conoce que el aumento en la acumulación de lípidos en el hígado es una característica frecuente en la prediabetes y las etapas tempranas de DM2, lo cual se explica por los niveles elevados de triglicéridos circulantes [226]. A medida que el hígado intenta adaptarse a este exceso de lípidos y a la resistencia a la insulina, también aumenta su capacidad respiratoria mitocondrial adaptativa, como ocurre en la enfermedad NAFLD. Eventualmente esta se ve superada, lo que conduce a una disfunción mitocondrial, como en la esteatosis hepática no alcohólica (NASH) [227].

En el presente trabajo se ha demostrado que la ausencia de la isoforma Met¹-IDE es un factor clave que impulsa el aumento en la función mitocondrial. La producción de ATP mitocondrial, así como la respiración basal, máxima y la capacidad respiratoria de reserva, regresan a niveles normales con la presencia de esta isoforma en modelos celulares con deficiencia de IDE. Lo más relevante es que este efecto ocurre de manera independiente de su actividad catalítica, lo que de nuevo sugiere que esta enzima posee un papel regulador más allá de su función en la degradación de insulina.

Estos hallazgos destacan la importancia de las dos isoformas de IDE en la homeostasis energética de los hepatocitos y abren la puerta a nuevas estrategias terapéuticas para tratar desequilibrios metabólicos, especialmente en enfermedades como la DM2.

En este estudio, no se ha observado una regulación significativa en la expresión de los complejos I-V de la ETC y OXPHOS en ausencia de IDE. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que existan regulaciones, tanto transcripcionales como postraduccionales, que afecten a la actividad de dichos complejos o la formación de supercomplejos que regulan la función mitocondrial [228]. Asimismo, un estudio reveló que IDE interactúa principalmente con la maquinaria de traducción de proteínas ribosómicas mitocondriales, así como con proteínas involucradas en la síntesis y ensamblaje de los complejos I y IV, y con las del ciclo de Krebs, lo que indica un papel importante de IDE en la regulación del control trascricional de las proteínas codificadas por el ADN mitocondrial [132].

El análisis transcriptómico en el modelo celular HepG2-IDE-KO reveló varios genes sobreexpresados bajo la deficiencia de IDE, lo que afecta a la respiración celular y a la producción de ATP. Entre ellos se encuentran UCP2 y NDUFA6. NDUFA6 codifica la subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa complejo I de la ETC, que es crucial para la transferencia de electrones y la generación de protones utilizados en la producción de ATP a través de la ATP sintasa. Este gen se encuentra sobreexpresado en DM2, lo que apunta a patrones de alteración complejos en el sistema OXPHOS en esta enfermedad [229]. Por otro lado, UCP2 es una proteína de la membrana interna mitocondrial que desacopla el consumo de oxígeno por la cadena respiratoria de la síntesis de ATP. Esta se expresa en diversos tejidos y desempeña un papel en la regulación negativa de la secreción de insulina por las células β , así como en el metabolismo de los ácidos grasos [45]. Su expresión aumenta en hepatocitos de modelos animales con NAFLD y en pacientes con NASH [230, 231]. Además, se han identificado varios polimorfismos genéticos de UCP2 asociados con la diabetes [232].

Una posible hipótesis que se plantea es que estos cambios en la expresión génica pueden estar regulados por factores de transcripción que modulan las rutas metabólicas en respuesta a estas condiciones fisiopatológicas. Los factores de transcripción de la familia Fox desempeñan un papel crucial en la regulación metabólica. Por un lado, se observó que Foxa2 se encuentra en el citoplasma de los hepatocitos de ratones resistentes a la insulina [233]. Por otro lado, Foxo1 integra la señalización de la insulina con la función mitocondrial. Asimismo, la inhibición de este factor puede revertir la disfunción mitocondrial y mejorar el metabolismo hepático durante la resistencia a la insulina [234].

Los factores de transcripción de la familia PGC también están implicados en la disfunción metabólica hepática en diabetes [235, 236]. Un estudio detectó la isoforma mitocondrial de IDE en el cerebro y demostró que su expresión está regulada por la vía de biogénesis mitocondrial (PGC-1/NRF-1). De igual manera, se encontró una fuerte correlación positiva entre PGC-1 o NRF-1 y los transcritos de la isoforma larga de IDE [237]. Además, se ha observado que la metilación específica de factores de transcripción importantes, como PPARGC1A

(coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas PGC-1 α) y TFAM (factor de transcripción mitocondrial A) se han asociado con niveles de insulina y niveles de ARNm de PPARGC1A en NAFLD [238].

Desde esta perspectiva, se plantea que IDE podría regular la polarización de los hepatocitos a través de su influencia sobre la función mitocondrial. Un aumento descontrolado de la actividad mitocondrial conlleva una sobreproducción de ATP y ROS, lo que genera estrés oxidativo. Este estrés puede dañar los componentes de las membranas apicales y basolaterales de los hepatocitos, lo que afectaría las uniones estrechas que son esenciales para mantener su polarización [239]. Dado que la polarización celular es un proceso dependiente de energía, fundamental para el metabolismo, excreción y detoxificación de los hepatocitos [88], la alteración en la función mitocondrial podría comprometer este equilibrio. Además, tal como se ha descrito anteriormente, el análisis transcriptómico reveló una disminución significativa en la expresión del gen EML1, el cual codifica una proteína que contribuye en la organización y estabilidad de los microtúbulos. Los microtúbulos, componentes del citoesqueleto, median en el transporte de mitocondrias dentro de la célula, ajustando su localización en función de las demandas energéticas y de señalización celular [86]. En consecuencia, un desajuste en la estabilidad de los microtúbulos podría comprometer estos procesos, lo que afectaría negativamente la homeostasis metabólica y alteraría funciones esenciales como la producción de energía y la comunicación intracelular.

Por lo que se refiere al sensor de energía celular AMPK, que detecta la relación AMP/ATP en la célula, desempeña un papel fundamental en la coordinación de múltiples procesos celulares para mantener la homeostasis energética. Esto es especialmente importante para los hepatocitos, ya que AMPK facilita la polarización celular y promueve la biogénesis mitocondrial, lo que asegura un adecuado funcionamiento energético y metabólico en el hígado [240]. Además, las mitocondrias podrían ver alterada la dinámica de fisión y fusión que mantiene la función bioenergética, lo que afectaría aún más la polarización celular [241].

Regulación de la dinámica mitocondrial

La dinámica mitocondrial es el equilibrio entre los procesos de fisión y fusión mitocondrial regula el número, el tamaño y la posición de las mitocondrias en el citoplasma. Este proceso está mediado por proteínas que remodelan las membranas. Durante la fisión, las proteínas Drp1 y Fis1 comprimen y separan los túbulos mitocondriales. Mientras que, durante la fusión, las proteínas Mfn1/2 y Opa1 integran las membranas externas e internas de las mitocondrias respectivamente.

El estudio morfológico mitocondrial realizado en esta tesis mostró que, tanto en el modelo murino IDE-KO como en los modelos celulares shRNA-AML12-IDE y HepG2-IDE-KO, las mitocondrias presentaban una mayor fragmentación en comparación con el control. Asimismo, se observó que la IDE mitocondrial desempeña un papel crucial en la regulación de la dinámica mitocondrial, particularmente en el control de la maquinaria proteica asociada a la fisión. En concreto, se observó que la IDE mitocondrial regula la expresión de las proteínas de fisión Drp1 y Fis1, cuya expresión disminuye cuando se reconstituye la IDE mitocondrial en células deficientes de esta enzima. Estos resultados indican que esta isoforma de IDE es fundamental para la homeostasis mitocondrial, tanto para mantener una regulación de la función como para el equilibrio entre los procesos de fisión y fusión, lo que evita una fragmentación excesiva y preservando la integridad funcional de la mitocondria.

La disfunción mitocondrial debida a la hiperactividad respiratoria y la desregulación de factores que controlan la biogénesis mitocondrial afecta a la polarización de los hepatocitos. Este hecho puede contribuir al desarrollo de patologías hepáticas, desequilibrios metabólicos y la exacerbación de la resistencia a la insulina, lo que agrava las complicaciones diabéticas.

Diversos estudios respaldan los resultados de esta tesis, ya que se ha demostrado que la expresión de la proteína Drp1 se encuentra aumentada en modelos animales de NAFLD, lo que indica una mayor fragmentación mitocondrial [242, 243]. Además, los análisis mediante microscopía electrónica han revelado un aumento en la fisión mitocondrial en el hígado de animales

sometidos a dieta alta en grasas, junto con un incremento en la lipólisis. Asimismo, demostraron que la inhibición transgénica de la fisión mitocondrial ejerce un efecto protector contra la esteatosis hepática, lo que reduce tanto el estrés oxidativo como el daño hepático inducido por la dieta [242, 244]. Otras investigaciones mostraron que el glucagón redujo la biogénesis mitocondrial hepática al disminuir la expresión del factor de respiración nuclear-1 NRF-1, TFAM y Mfn2 en HepG2 [245]. Además, se han detectado niveles disminuidos de Mfn2 en el hígado de individuos con NASH y en modelos murinos de NAFLD/NASH [246, 247].

Este conjunto de evidencias resalta la importancia de la dinámica mitocondrial en las patologías metabólicas hepáticas y respalda la relación entre la fragmentación mitocondrial y la ausencia de IDE.

La interacción entre el retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias es esencial para la homeostasis celular, especialmente en el contexto de enfermedades metabólicas como la DM2 y NAFLD [220, 246]. Estas interacciones se manifiestan a través de diversas estructuras y mecanismos que ponen de manifiesto la importancia de estos orgánulos en la regulación de procesos metabólicos. Uno de los componentes clave en esta interacción es la actina, que media los contactos entre el RE y las mitocondrias, denominados MAMs (membranas asociadas a mitocondrias). Estas estructuras son fundamentales para la fusión y fisión mitocondrial. A su vez, desempeñan un papel crucial en la regulación de procesos celulares como el metabolismo del calcio, la transferencia de lípidos y la señalización del estrés celular. Recientemente, se ha demostrado que el RE se asocia funcionalmente con las mitocondrias a través del anclaje mediado por Mfn-2, lo que resalta aún más la conexión entre ellos [248]. Para llevar a cabo la fisión, la interacción física de los túbulos del RE con las mitocondrias en lugares específicos facilita la constricción antes del reclutamiento de Drp1, lo que sugiere que los túbulos del RE podrían jugar un papel activo en la definición de los sitios de división mitocondrial [79].

En condiciones patológicas como DM2, la disfunción mitocondrial y el estrés del RE se ven aumentados, lo que enfatiza la relevancia de las MAMs para compensar estos desequilibrios. Existe cierta controversia en

investigaciones en las que se ha observado tanto el incremento como la disminución en el acoplamiento de estos dos orgánulos. Por un lado, algunos estudios afirman la necesidad de estas interacciones para la correcta secreción de insulina [249] y demuestran la interrupción de las MAMs en el músculo esquelético de individuos y modelos murinos con DM2 [250]. Por otro lado, se ha observado que en estados patológicos en los que las funciones mitocondriales están comprometidas, las MAMs tienden a activarse de manera más intensa [251], lo que apunta a una respuesta compensatoria entre el RE y las mitocondrias. Además, un análisis proteómico en modelos de DM2 ha indicado una sobreexpresión de proteínas asociadas a las MAMs [252]. Esto mismo ha sido observado en obesidad, lo que resulta en un incremento del flujo de calcio del RE hacia las mitocondrias en el hígado. La sobrecarga de calcio mitocondrial se acompaña de un aumento en la producción de ROS, lo que interfiere con la homeostasis metabólica [251]. Esto refuerza la hipótesis de que dichas estructuras juegan un papel determinante en la regulación de la disfunción y dinámica mitocondrial.

En conclusión, la mediación de las MAMs en la interacción del RE y las mitocondrias constituye una red compleja que regula funciones celulares esenciales. En el contexto de enfermedades metabólicas, el aumento en la interacción de las MAMs podría potenciar la activación de Drp1, lo que incrementaría el proceso de fisión mitocondrial. Este fenómeno podría explicar la fragmentación mitocondrial observada en nuestros modelos con deficiencia de IDE, lo que contribuye a la manifestación del fenotipo metabólico alterado.

Así pues, la morfología mitocondrial, que se encuentra regulada por la maquinaria proteica de fusión y fisión, también puede depender de otras proteínas o mediadores diferentes como las proteínas del citoesqueleto, necesarias para el movimiento de las mitocondrias dentro de la célula [89].

En este sentido, las modificaciones en la actividad de las proteínas de fusión mitocondrial también influyen en la distribución, forma y movimiento de este orgánulo [83, 253], lo cual podría estar relacionado con las alteraciones en las vías de señalización que ocurren en el citoplasma.

Síntesis de resultados y relevancia en el contexto científico

Para concluir, se resumen a continuación los principales logros alcanzados en este estudio, poniendo en perspectiva los resultados y su relevancia en el contexto de la evidencia científica previamente discutida.

La presente tesis establece que la isoforma citoplasmática de IDE, que podría actuar como una proteína supresora de factores de transcripción y de la traducción de genes relacionados con la homeostasis de la glucosa, desempeña un papel crucial en la modulación de la señalización del glucagón.

En contraste, la isoforma mitocondrial de IDE regula la señalización intracelular de la insulina en células hepáticas de manera independiente de su actividad catalítica. Este hallazgo sugiere que esta isoforma tiene funciones adicionales que trascienden su papel en la degradación hormonal. La ausencia de IDE podría tener efectos indirectos sobre el citoesqueleto, lo que compromete procesos esenciales como la endocitosis y el reciclaje del receptor de insulina.

Además, se observó que la falta de dicha isoforma de IDE provoca una pérdida de la integridad mitocondrial, probablemente debida a un mayor reclutamiento de las proteínas de fisión mediadas por las MAMs, así como una disfunción que resulta en un aumento compensatorio de la actividad del orgánulo, independientemente de su función enzimática. La sobreexpresión de genes relacionados con funciones mitocondriales en ausencia de IDE resalta la conexión crítica de esta proteína con el metabolismo hepático.

Estos descubrimientos amplían el conocimiento actual sobre el papel de las isoformas de IDE, lo que demuestra que ambas participan de manera complementaria en la regulación de la homeostasis celular. Esta evidencia resalta la necesidad de realizar investigaciones adicionales para profundizar en los mecanismos que regulan ambas isoformas, con el fin de comprender mejor su papel en el metabolismo hepático. Comprender estas interacciones podría proporcionar información valiosa para el desarrollo de terapias más específicas y efectivas para trastornos metabólicos como la diabetes, considerando IDE como una nueva diana terapéutica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La ausencia de IDE provoca una alteración en la regulación de genes asociados a funciones celulares, mitocondriales y a la estabilización del citoesqueleto.
2. La regulación de la señalización intracelular de la insulina en células hepáticas está mediada por la isoforma mitocondrial de IDE, de manera independiente de su actividad catalítica.
3. La isoforma citoplasmática de IDE interviene en la regulación de la producción de glucosa hepática a través de la señalización del glucagón.
4. La isoforma mitocondrial de IDE regula la función bioenergética en los hepatocitos de manera independiente de su actividad catalítica.
5. La isoforma mitocondrial de IDE mantiene la integridad de la estructura mitocondrial mediante la regulación de las proteínas de fisión.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Consultation W. *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications*. Part; (1999).
2. Diabetes IDF. *International Diabetes Federation Diabetes Atlas*. 10th ed: IDF; (2021).
3. Corrales PJP, Lozano PV, Toboso RPQ, Moya AJM, García MDCL. *Prevalence of gestational diabetes with a 2-step strategy and cut-off values from the 1979 National Diabetes Data Group. Are we applying the best strategy for our patients?* *Endocrinología, diabetes y nutrición*. (2022);69(6):450-2.
4. Bach J-F. *Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease*. *Endocrine reviews*. (1994);15(4):516-42.
5. Kahn S. *The pathophysiologic defects of type 2 diabetes. Abnormal insulin action and impaired insulin secretion*. *Postgraduate medicine*. (2000);107(6 Suppl Key):11-5.
6. Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, Hara K, Horikoshi M, Andersen G, et al. *SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations*. *Nature genetics*. (2008);40(9):1098-102.
7. Cotsapas C, Prokunina-Olsson L, Welch C, Saxena R, Weaver C, Usher N, et al. *Expression analysis of loci associated with type 2 diabetes in human tissues*. *Diabetologia*. (2010);53:2334-9.
8. Elbein SC, Hoffman MD, Teng K, Leppert MF, Hasstedt SJ. *A genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in Utah Caucasians*. *Diabetes*. (1999);48(5):1175-82.
9. Zimmet P, Alberti K, Shaw J. *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. *Nature*. (2001);414(6865):782-7.
10. Pernicova I, Korbonits M. *Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer*. *Nature Reviews Endocrinology*. (2014);10(3):143-56.
11. McIntyre H, Paterson C, Ma A, Ravenscroft P, Bird D, Cameron D. *Metformin increases insulin sensitivity and basal glucose clearance in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus*. *Australian and New Zealand journal of medicine*. (1991);21(5):714-9.
12. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo S-H, Bardeesy N, DePinho RA, et al. *The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin*. *Science*. (2005);310(5754):1642-6.
13. Czyzyk A, Tawecki J, Sadowski J, Ponikowska I, Szczepanik Z. *Effect of biguanides on intestinal absorption of glucose*. *Diabetes*. (1968);17(8):492-8.
14. Association AD. *8. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: standards of medical care in diabetes—2018*. *Diabetes care*. (2018);41(Supplement_1):S73-S85.
15. Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. *Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease*. *Nature reviews endocrinology*. (2017);13(10):572-87.
16. Najjar SM, Caprio S, Gastaldelli A. *Insulin clearance in health and disease*. *Annual Review of Physiology*. (2023);85(1):363-81.
17. Thorens B. *GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis*. *Diabetologia*. (2015);58(2):221-32.
18. Ramnanan C, Edgerton D, Kraft G, Cherrington A. *Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism*. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. (2011);13:118-25.
19. Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. *Insulin degradation: progress and potential*. *Endocrine reviews*. (1998);19(5):608-24.
20. Edgerton DS, Ramnanan CJ, Grueter CA, Johnson KM, Lautz M, Neal DW, et al. *Effects of insulin on the metabolic control of hepatic gluconeogenesis in vivo*. *Diabetes*. (2009);58(12):2766-75.
21. Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. *Pancreatic regulation of glucose homeostasis*. *Experimental & molecular medicine*. (2016);48(3):e219-e.
22. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. *Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future*. *The Lancet*. (2014);383(9922):1068-83.
23. Donath M, Halban PA. *Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications*. *Diabetologia*. (2004);47:581-9.
24. Gromada J, Chabosseau P, Rutter GA. *The α -cell in diabetes mellitus*. *Nature Reviews Endocrinology*. (2018);14(12):694-704.
25. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. *Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. (2014);6(1):a009191.
26. Lee J, Pilch PF. *The insulin receptor: structure, function, and signaling*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. (1994);266(2):C319-C34.

27. Previs SF, Withers DJ, Ren J-M, White MF, Shulman GI. *Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo*. Journal of Biological Chemistry. (2000);275(50):38990-4.
28. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. Nature reviews Molecular cell biology. (2006);7(2):85-96.
29. Mor I, Cheung E, Vousden K, editors. *Control of glycolysis through regulation of PFK1: old friends and recent additions*. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology; 2011: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
30. Unterman TG. *Regulation of hepatic glucose metabolism by FoxO proteins, an integrated approach*. Current topics in developmental biology. (2018);127:119-47.
31. Petersen MC, Shulman GI. *Mechanisms of insulin action and insulin resistance*. Physiological reviews. (2018).
32. Park EA, Mynatt R, Cook G, Kashfi K. *Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I*. Biochemical Journal. (1995);310(3):853-8.
33. Uehara K, Santoleri D, Whitlock AEG, Titchenell PM. *Insulin regulation of hepatic lipid homeostasis*. Comprehensive Physiology. (2023);13(3):4785.
34. Janah L, Kjeldsen S, Galsgaard KD, Winther-Sørensen M, Stojanovska E, Pedersen J, et al. *Glucagon receptor signaling and glucagon resistance*. International journal of molecular sciences. (2019);20(13):3314.
35. Wakelam MJ, Murphy GJ, Hruby VJ, Houslay MD. *Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon*. Nature. (1986);323(6083):68-71.
36. Rodgers RL. *Glucagon, cyclic AMP, and hepatic glucose mobilization: A half-century of uncertainty*. Physiological Reports. (2022);10(9):e15263.
37. Ozcan L, Wong CC, Li G, Xu T, Pajvani U, Park SKR, et al. *Calcium signaling through CaMKII regulates hepatic glucose production in fasting and obesity*. Cell metabolism. (2012);15(5):739-51.
38. Galsgaard KD, Pedersen J, Knop FK, Holst JJ, Wewer Albrechtsen NJ. *Glucagon receptor signaling and lipid metabolism*. Frontiers in physiology. (2019);10:431942.
39. Gilon P. *The role of α -cells in islet function and glucose homeostasis in health and type 2 diabetes*. Journal of molecular biology. (2020);432(5):1367-94.
40. Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Kolterman OG. *Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics*. Diabetes. (1987);36(3):274-83.
41. Friedman JR, Nunnari J. *Mitochondrial form and function*. Nature. (2014);505(7483):335-43.
42. Stehling O, Wilbrecht C, Lill R. *Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease*. Biochimie. (2014);100:61-77.
43. McCarron JG, Wilson C, Sandison ME, Olson ML, Girkin JM, Saunter C, et al. *From structure to function: mitochondrial morphology, motion and shaping in vascular smooth muscle*. Journal of vascular research. (2013);50(5):357-71.
44. Kabra UD, Jastroch M. *Mitochondrial dynamics and insulin secretion*. International Journal of Molecular Sciences. (2023);24(18):13782.
45. Krauss S, Zhang C-Y, Scorrano L, Dalgaard LT, St-Pierre J, Grey ST, et al. *Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic β cell dysfunction*. The Journal of clinical investigation. (2003);112(12):1831-42.
46. Carvalho C, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI. *Alzheimer's disease and type 2 diabetes-related alterations in brain mitochondria, autophagy and synaptic markers*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. (2015);1852(8):1665-75.
47. Correia SC, Santos RX, Carvalho C, Cardoso S, Candeias E, Santos MS, et al. *Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation*. Brain research. (2012);1441:64-78.
48. Cardoso S, Santos MS, Seica R, Moreira PI. *Cortical and hippocampal mitochondria bioenergetics and oxidative status during hyperglycemia and/or insulin-induced hypoglycemia*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. (2010);1802(11):942-51.
49. Lane N, Martin W. *The energetics of genome complexity*. Nature. (2010);467(7318):929-34.
50. Holland OB, Risk M, Brown H, Komes K, Dube P, Swann C. *High-performance liquid chromatography in the radioimmunoassay of urinary tetrahydroaldosterone*. Journal of Chromatography A. (1987);385:393-6.
51. Doan MT, Teitell MA. *Krebs and an alternative TCA cycle!* Cell Research. (2022);32(6):509-10.

52. Bowtell JL, Marwood S, Bruce M, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL. *Tricarboxylic acid cycle intermediate pool size: functional importance for oxidative metabolism in exercising human skeletal muscle*. Sports medicine. (2007);37:1071-88.
53. Martínez-Reyes I, Chandel NS. *Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease*. Nature communications. (2020);11(1):102.
54. Rasheed MRHA, Tarjan G. *Succinate dehydrogenase complex: an updated review*. Archives of pathology & laboratory medicine. (2018);142(12):1564-70.
55. Raimondi V, Ciccarese F, Ciminale V. *Oncogenic pathways and the electron transport chain: a dangerROS liaison*. British journal of cancer. (2020);122(2):168-81.
56. Dimroth P, von Ballmoos C, Meier T. *Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases*. EMBO reports. (2006);7(3):276-82.
57. Boveris A, Chance B. *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen*. Biochemical Journal. (1973);134(3):707-16.
58. Antunes F, Cadenas E. *Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes*. FEBS letters. (2000);475(2):121-6.
59. Darsenskaya M, Kolesnikova La, Kolesnikov S. *Oxidative stress: pathogenetic role in diabetes mellitus and its complications and therapeutic approaches to correction*. Bulletin of experimental biology and medicine. (2021);171(2):179-89.
60. Chen W, Zhao H, Li Y. *Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets*. Signal transduction and targeted therapy. (2023);8(1):333.
61. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. *Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology*. Nature cell biology. (2018);20(9):1013-22.
62. Youle RJ, Van Der Bliek AM. *Mitochondrial fission, fusion, and stress*. Science. (2012);337(6098):1062-5.
63. Roberts RF, Tang MY, Fon EA, Durcan TM. *Defending the mitochondria: the pathways of mitophagy and mitochondrial-derived vesicles*. The international journal of biochemistry & cell biology. (2016);79:427-36.
64. Illescas M, Peñas A, Arenas J, Martín MA, Ugalde C. *Regulation of mitochondrial function by the actin cytoskeleton*. Frontiers in Cell and Developmental Biology. (2021);9:795838.
65. Virbasius JV, Scarpulla RC. *Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences. (1994);91(4):1309-13.
66. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, et al. *Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1*. Cell. (1999);98(1):115-24.
67. Chaube B, Bhat M. *AMPK, a key regulator of metabolic/energy homeostasis and mitochondrial biogenesis in cancer cells*. Cell death & disease. (2016);7(1):e2044.
68. Malka F, Guillery O, Cifuentes-Diaz C, Guillou E, Belenguer P, Lombès A, et al. *Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes*. EMBO reports. (2005);6(9):853-9.
69. Mozdy AD, Shaw JM. *A fuzzy mitochondrial fusion apparatus comes into focus*. Nature reviews Molecular cell biology. (2003);4(6):468-78.
70. Koshihara T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC. *Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes*. Science. (2004);305(5685):858-62.
71. Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Brichese L, Gas N, et al. *The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space*. FEBS letters. (2002);523(1-3):171-6.
72. Cipolat S, de Brito OM, Dal Zilio B, Scorrano L. *OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion*. Proceedings of the National Academy of Sciences. (2004);101(45):15927-32.
73. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. *Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission*. Journal of Biological Chemistry. (2007);282(15):11521-9.
74. Harder Z, Zunino R, McBride H. *Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission*. Current Biology. (2004);14(4):340-5.
75. Nakamura N, Kimura Y, Tokuda M, Honda S, Hirose S. *MARCH-V is a novel mitofusin 2-and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology*. EMBO reports. (2006);7(10):1019-22.

76. Chang C-R, Blackstone C. *Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology*. Journal of Biological Chemistry. (2007);282(30):21583-7.
77. Cribbs JT, Strack S. *Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death*. EMBO reports. (2007);8(10):939-44.
78. Cereghetti G, Stangherlin A, De Brito OM, Chang C, Blackstone C, Bernardi P, et al. *Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria*. Proceedings of the National Academy of Sciences. (2008);105(41):15803-8.
79. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. *ER tubules mark sites of mitochondrial division*. Science. (2011);334(6054):358-62.
80. Losón OC, Song Z, Chen H, Chan DC. *Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission*. Molecular biology of the cell. (2013);24(5):659-67.
81. James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou J-C. *hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery*. Vol. 278 (2003) 36373–36379. Journal of Biological Chemistry. (2004);279(34):36166.
82. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. *Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it*. Mitochondrion. (2006);6(1):1-28.
83. Liesa M, Palacín M, Zorzano A. *Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease*. Physiological reviews. (2009);89(3):799-845.
84. Stanhope KT, Ross JL. *Microtubules, MAPs, and motor patterns*. Methods in cell biology. 128: Elsevier; (2015). p. 23-38.
85. Nogales E. *Structural insights into microtubule function*. Annual review of biophysics and biomolecular structure. (2001);30(1):397-420.
86. Pollard TD. *The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda*. Nature. (2003);422(6933):741-5.
87. Vale RD. *The molecular motor toolbox for intracellular transport*. Cell. (2003);112(4):467-80.
88. Gissen P, Arias IM. *Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease*. Journal of hepatology. (2015);63(4):1023-37.
89. Anesti V, Scorrano L. *The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. (2006);1757(5-6):692-9.
90. Yang M, Li C, Sun L. *Mitochondria-associated membranes (MAMs): a novel therapeutic target for treating metabolic syndrome*. Current Medicinal Chemistry. (2021);28(7):1347-62.
91. Korobova F, Ramabhadran V, Higgs HN. *An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2*. Science. (2013);339(6118):464-7.
92. Arasaki K, Shimizu H, Mogari H, Nishida N, Hirota N, Furuno A, et al. *A role for the ancient SNARE syntaxin 17 in regulating mitochondrial division*. Developmental cell. (2015);32(3):304-17.
93. Manor U, Bartholomew S, Golani G, Christenson E, Kozlov M, Higgs H, et al. *A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division*. elife. (2015);4:e08828.
94. Korobova F, Gauvin TJ, Higgs HN. *A role for myosin II in mammalian mitochondrial fission*. Current Biology. (2014);24(4):409-14.
95. Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE, et al. *Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria*. The Journal of cell biology. (2005);170(7):1021-7.
96. Van der Bliek AM, Shen Q, Kawajiri S. *Mechanisms of mitochondrial fission and fusion*. Cold Spring Harbor perspectives in biology. (2013);5(6):a011072.
97. Jongeneel CV, Bouvier J, Bairoch A. *A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases*. FEBS letters. (1989);242(2):211-4.
98. Walker J, Tait A. *Ostertagia circumcincta: Isolation of a partial cDNA encoding an unusual member of the mitochondrial processing peptidase subfamily of M16 metallopeptidases*. International journal for parasitology. (1997);27(11):1389-94.
99. Kuo W-L, Montag AG, Rosner MR. *Insulin-degrading enzyme is differentially expressed and developmentally regulated in various rat tissues*. Endocrinology. (1993);132(2):604-11.
100. Affholter JA, Fried VA, Roth RA. *Human insulin-degrading enzyme shares structural and functional homologies with E. coli protease III*. Science. (1988);242(4884):1415-8.
101. Kuo W-L, Gehm BD, Rosner MR. *Cloning and expression of the cDNA for a Drosophila insulin-degrading enzyme*. Molecular Endocrinology. (1990);4(10):1580-91.

102. Affholter JA, Hsieh C-L, Francke U, Roth RA. *Insulin-degrading enzyme: stable expression of the human complementary DNA, characterization of its protein product, and chromosomal mapping of the human and mouse genes*. *Molecular endocrinology*. (1990);4(8):1125-35.
103. Leissring MA, Farris W, Wu X, Christodoulou DC, Haigis MC, Guarente L, et al. *Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria*. *Biochemical journal*. (2004);383(3):439-46.
104. Corraliza-Gómez M, Lillo C, Cózar-Castellano I, Arranz E, Sanchez D, Ganfornina MD. *Evolutionary origin of insulin-degrading enzyme and its subcellular localization and secretion mechanism: a study in microglial cells*. *Cells*. (2022);11(2):227.
105. Song E-S, Juliano MA, Juliano L, Hersh LB. *Substrate activation of insulin-degrading enzyme (insulysin): A potential target for drug development*. *Journal of biological chemistry*. (2003);278(50):49789-94.
106. Shen Y, Joachimiak A, Rich Rosner M, Tang W-J. *Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism*. *Nature*. (2006);443(7113):870-4.
107. Li P, Kuo W-L, Yousef M, Rosner MR, Tang W-J. *The C-terminal domain of human insulin degrading enzyme is required for dimerization and substrate recognition*. *Biochemical and biophysical research communications*. (2006);343(4):1032-7.
108. Zhang Z, Liang WG, Bailey LJ, Tan YZ, Wei H, Wang A, et al. *Ensemble cryoEM elucidates the mechanism of insulin capture and degradation by human insulin degrading enzyme*. *Elife*. (2018);7:e33572.
109. Perlman R, Gehm B, Kuo W, Rosner MR. *Functional analysis of conserved residues in the active site of insulin-degrading enzyme*. *Journal of biological chemistry*. (1993);268(29):21538-44.
110. Gehm BD, Kuo W-L, Perlman RK, Rosner MR. *Mutations in a zinc-binding domain of human insulin-degrading enzyme eliminate catalytic activity but not insulin binding*. *Journal of Biological Chemistry*. (1993);268(11):7943-8.
111. Tundo GR, Grasso G, Persico M, Tkachuk O, Bellia F, Bocedi A, et al. *The Insulin-Degrading Enzyme from Structure to Allosteric Modulation: New Perspectives for Drug Design*. *Biomolecules*. (2023);13(10):1492.
112. Im H, Manolopoulou M, Malito E, Shen Y, Zhao J, Neant-Fery M, et al. *Structure of substrate-free human insulin-degrading enzyme (IDE) and biophysical analysis of ATP-induced conformational switch of IDE*. *Journal of biological chemistry*. (2007);282(35):25453-63.
113. Malito E, Hulse RE, Tang W-J. *Amyloid β -degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. (2008);65:2574-85.
114. Hamel FG, Mahoney MJ, Duckworth WC. *Degradation of intraendosomal insulin by insulin-degrading enzyme without acidification*. *Diabetes*. (1991);40(4):436-43.
115. Morita M, Kurochkin IV, Motojima K, Goto S, Takano T, Okamura S, et al. *Insulin-degrading enzyme exists inside of rat liver peroxisomes and degrades oxidized proteins*. *Cell structure and function*. (2000);25(5):309-15.
116. Song ES, Jang H, Guo H-F, Juliano MA, Juliano L, Morris AJ, et al. *Inositol phosphates and phosphoinositides activate insulin-degrading enzyme, while phosphoinositides also mediate binding to endosomes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (2017);114(14):E2826-E35.
117. Carpenter J, Jackson W, De Souza G, Haarr L, Grose C. *Insulin-degrading enzyme binds to the nonglycosylated precursor of varicella-zoster virus gE protein found in the endoplasmic reticulum*. *Journal of virology*. (2010);84(2):847-55.
118. Bulloj A, Leal MC, Xu H, Castaño EM, Morelli L. *Insulin-degrading enzyme sorting in exosomes: A secretory pathway for a key brain amyloid- β degrading protease*. *Journal of Alzheimer's Disease*. (2010);19(1):79-95.
119. Zhao J, Li L, Leissring MA. *Insulin-degrading enzyme is exported via an unconventional protein secretion pathway*. *Molecular neurodegeneration*. (2009);4:1-5.
120. Noinaj N, Song ES, Bhasin S, Alper BJ, Schmidt WK, Hersh LB, et al. *Anion activation site of insulin-degrading enzyme*. *Journal of biological chemistry*. (2012);287(1):48-57.
121. Farris W, Leissring MA, Hemming ML, Chang AY, Selkoe DJ. *Alternative splicing of human insulin-degrading enzyme yields a novel isoform with a decreased ability to degrade insulin and amyloid β -protein*. *Biochemistry*. (2005);44(17):6513-25.
122. Mirsky I, Simkin B, Broh-Kahn R. *The inactivation of insulin by tissue extracts. VI. The existence, distribution and properties of an insulinase inhibitor*. *Archives of biochemistry*. (1950);28(3):415-23.

123. Bennett RG, Duckworth WC, Hamel FG. *Degradation of amylin by insulin-degrading enzyme*. Journal of biological chemistry. (2000);275(47):36621-5.
124. MISBIN RI, ALMIRA EC, Duckworth W, MEHL TD. *Inhibition of insulin degradation by insulin-like growth factors*. Endocrinology. (1983);113(4):1525-7.
125. Kurochkin IV, Guarnera E, Berezovsky IN. *Insulin-degrading enzyme in the fight against Alzheimer's disease*. Trends in pharmacological sciences. (2018);39(1):49-58.
126. Sharma SK, Chorell E, Steneberg P, Vernersson-Lindahl E, Edlund H, Wittung-Stafshede P. *Insulin-degrading enzyme prevents α -synuclein fibril formation in a nonproteolytical manner*. Scientific reports. (2015);5(1):12531.
127. Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, et al. *Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase*. Journal of Biological Chemistry. (2007);282(46):33583-92.
128. Sbardella D, Tundo GR, Coletta A, Marcoux J, Koufogeorgou EI, Ciaccio C, et al. *The insulin-degrading enzyme is an allosteric modulator of the 20S proteasome and a potential competitor of the 19S*. Cellular and Molecular Life Sciences. (2018);75:3441-56.
129. Andres M, Hennuyer N, Zibar K, Bicharel-Leconte M, Duplan I, Enée E, et al. *Insulin-degrading enzyme inhibition increases the unfolded protein response and favours lipid accumulation in the liver*. British Journal of Pharmacology. (2024).
130. Tundo GR, Sbardella D, Ciaccio C, Bianculli A, Orlandi A, Desimio MG, et al. *Insulin-degrading enzyme (IDE): a novel heat shock-like protein*. Journal of biological chemistry. (2013);288(4):2281-9.
131. Lesire L, Leroux F, Deprez-Poulain R, Deprez B. *Insulin-Degrading Enzyme, an Under-Estimated Potential Target to Treat Cancer?* Cells. (2022);11(7):1228.
132. Yilmaz A, Guerrero C, Waeckel-Enée E, Lipecka J, Bertocci B, van Endert P. *Insulin-Degrading Enzyme Interacts with Mitochondrial Ribosomes and Respiratory Chain Proteins*. Biomolecules. (2023);13(6):890.
133. Fakhrai-Rad H, Nikoshkov A, Kamel A, Fernström M, Zierath JR, Norgren S, et al. *Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats*. Human molecular genetics. (2000);9(14):2149-58.
134. Standl E, Kolb H. *Insulin degrading enzyme activity and insulin binding of erythrocytes in normal subjects and type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients*. Diabetologia. (1984);27:17-22.
135. Inoue Y, Masuda T, Misumi Y, Ando Y, Ueda M. *Metformin attenuates vascular pathology by increasing expression of insulin-degrading enzyme in a mixed model of cerebral amyloid angiopathy and type 2 diabetes mellitus*. Neuroscience letters. (2021);762:136136.
136. Snehalatha C, Hashy T, Mohan V, Ramachandran A, Viswanathan M. *Immunoreactive insulin and insulin degrading enzymes in erythrocytes: a preliminary report*. Japi. (1990);38:558-61.
137. Valera Mora ME, Scarfone A, Calvani M, Greco AV, Mingrone G. *Insulin clearance in obesity*. Journal of the American College of Nutrition. (2003);22(6):487-93.
138. Kullenberg H, Rossen J, Johansson U-B, Hagströmer M, Nyström T, Kumlin M, et al. *Increased levels of insulin-degrading enzyme in patients with type 2 diabetes mellitus*. Endocrine. (2022);77(3):561-5.
139. Fosam A, Sikder S, Abel BS, Tella SH, Walter MF, Mari A, et al. *Reduced insulin clearance and insulin-degrading enzyme activity contribute to hyperinsulinemia in African Americans*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. (2020);105(4):e1835-e46.
140. Pivovarova O, von Loeffelholz C, Ilkavets I, Sticht C, Zhuk S, Murahovschi V, et al. *Modulation of insulin degrading enzyme activity and liver cell proliferation*. Cell Cycle. (2015);14(14):2293-300.
141. Sofer Y, Nash Y, Osher E, Fursht O, Goldsmith G, Nahary L, et al. *Insulin-degrading enzyme higher in subjects with metabolic syndrome*. Endocrine. (2021);71:357-64.
142. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, et al. *Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences. (2003);100(7):4162-7.
143. Farris W, Mansourian S, Leissring MA, Eckman EA, Bertram L, Eckman CB, et al. *Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid β -protein*. The American journal of pathology. (2004);164(4):1425-34.
144. Abdul-Hay SO, Kang D, McBride M, Li L, Zhao J, Leissring MA. *Deletion of insulin-degrading enzyme elicits antipodal, age-dependent effects on glucose and insulin tolerance*. PloS one. (2011);6(6):e20818.

145. Steneberg P, Bernardo L, Edfalk S, Lundberg L, Backlund F, Östenson C-G, et al. *The type 2 diabetes-associated gene Ide is required for insulin secretion and suppression of α -synuclein levels in β -cells*. *Diabetes*. (2013);62(6):2004-14.
146. Fernández-Díaz CM, Merino B, López-Acosta JF, Ciudad P, de la Fuente MA, Lobatón CD, et al. *Pancreatic β -cell-specific deletion of insulin-degrading enzyme leads to dysregulated insulin secretion and β -cell functional immaturity*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. (2019).
147. Merino B, Casanueva-Álvarez E, Quesada I, González-Casimiro CM, Fernández-Díaz CM, Postigo-Casado T, et al. *Insulin-degrading enzyme ablation in mouse pancreatic alpha cells triggers cell proliferation, hyperplasia and glucagon secretion dysregulation*. *Diabetologia*. (2022);65(8):1375-89.
148. Villa-Pérez P, Merino B, Fernández-Díaz CM, Ciudad P, Lobatón CD, Moreno A, et al. *Liver-specific ablation of insulin-degrading enzyme causes hepatic insulin resistance and glucose intolerance, without affecting insulin clearance in mice*. *Metabolism*. (2018);88:1-11.
149. Merino B, Fernández-Díaz CM, Parrado-Fernández C, González-Casimiro CM, Postigo-Casado T, Lobatón CD, et al. *Hepatic insulin-degrading enzyme regulates glucose and insulin homeostasis in diet-induced obese mice*. *Metabolism*. (2020);113:154352.
150. Mirsky I, Broh-Kahn R, Perisutti G, Brand J. *The inactivation of insulin by tissue extracts. 1. The distribution and properties of insulin inactivating extracts (insulinase)*. (1949).
151. Leissring MA, Malito E, Hedouin S, Reinstatler L, Sahara T, Abdul-Hay SO, et al. *Designed inhibitors of insulin-degrading enzyme regulate the catabolism and activity of insulin*. *PloS one*. (2010);5(5):e10504.
152. Maianti JP, McFedries A, Foda ZH, Kleiner RE, Du XQ, Leissring MA, et al. *Anti-diabetic activity of insulin-degrading enzyme inhibitors mediated by multiple hormones*. *Nature*. (2014);511(7507):94-8.
153. Deprez-Poulain R, Hennuyer N, Bosc D, Liang WG, Enée E, Marechal X, et al. *Catalytic site inhibition of insulin-degrading enzyme by a small molecule induces glucose intolerance in mice*. *Nature communications*. (2015);6(1):8250.
154. Durham TB, Toth JL, Klimkowski VJ, Cao JX, Siesky AM, Alexander-Chacko J, et al. *Dual exosite-binding inhibitors of insulin-degrading enzyme challenge its role as the primary mediator of insulin clearance in vivo*. *Journal of biological chemistry*. (2015);290(33):20044-59.
155. Cabrol C, Huzarska MA, Dinolfo C, Rodriguez MC, Reinstatler L, Ni J, et al. *Small-molecule activators of insulin-degrading enzyme discovered through high-throughput compound screening*. *PloS one*. (2009);4(4):e5274.
156. Charton J, Gauriot M, Totobenazara J, Hennuyer N, Dumont J, Bosc D, et al. *Structure-activity relationships of imidazole-derived 2-[N-carbamoylmethyl-alkylamino] acetic acids, dual binders of human insulin-degrading enzyme*. *European journal of medicinal chemistry*. (2015);90:547-67.
157. Charton J, Gauriot M, Guo Q, Hennuyer N, Marechal X, Dumont J, et al. *Imidazole-derived 2-[N-carbamoylmethyl-alkylamino] acetic acids, substrate-dependent modulators of insulin-degrading enzyme in amyloid- β hydrolysis*. *European journal of medicinal chemistry*. (2014);79:184-93.c
158. Krasinski CA, Ivancic VA, Zheng Q, Spratt DE, Lazo ND. *Resveratrol sustains insulin-degrading enzyme activity toward A β 42*. *ACS omega*. (2018);3(10):13275-82.
159. Distefano A, Caruso G, Oliveri V, Bellia F, Sbardella D, Zingale GA, et al. *Neuroprotective effect of carnosine is mediated by insulin-degrading enzyme*. *ACS Chemical Neuroscience*. (2022);13(10):1588-93.
160. Adessi C, Enderle, T., Grueninger, F., & Roth, D., inventor(2006).
161. Cakir B, Dağlıyan O, Dağyıldız E, Barış İ, Kavaklı IH, Kizilel S, et al. *Structure based discovery of small molecules to regulate the activity of human insulin degrading enzyme*. *PLoS One*. (2012);7(2):e31787.
162. Kraupner N, Dinh CP, Wen X, Landry V, Herledan A, Leroux F, et al. *Identification of indole-based activators of insulin degrading enzyme*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. (2022);228:113982.
163. Weiss L, Bernstein S, Jones R, Amunugama R, Krizman D, JeBailey L, et al. *Preimplantation factor (PIF) analog prevents type 1 diabetes mellitus (T1DM) development by preserving pancreatic function in NOD mice*. *Endocrine*. (2011);40:41-54.

164. Chen YC, Rivera J, Fitzgerald M, Hausding C, Ying Y-L, Wang X, et al. *Preimplantation factor prevents atherosclerosis via its immunomodulatory effects without affecting serum lipids*. *Thrombosis and haemostasis*. (2016);116(05):1010-24.
165. Sanz-González A, Cózar-Castellano I, Broca C, Sabatier J, Acosta GA, Royo M, et al. *Pharmacological activation of insulin-degrading enzyme improves insulin secretion and glucose tolerance in diet-induced obese mice*. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. (2023);25(11):3268-78.
166. Postic C, Shiota M, Niswender KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, et al. *Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic β cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase*. *Journal of Biological Chemistry*. (1999);274(1):305-15.
167. Mojica FJ, Díez-Villaseñor Cs, García-Martínez J, Soria E. *Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements*. *Journal of molecular evolution*. (2005);60:174-82.
168. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. *Science*. (2013);339(6121):819-23.
169. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. *science*. (2012);337(6096):816-21.
170. Kwon M, Firestein BL. *DNA transfection: calcium phosphate method*. *Neural development: Methods and protocols*. (2013):107-10.
171. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (1987);84(21):7413-7.
172. Shigekawa K, Dower WJ. *Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells*. *Biotechniques*. (1988);6(8):742-51.
173. Kim JA, Cho K, Shin MS, Lee WG, Jung N, Chung C, et al. *A novel electroporation method using a capillary and wire-type electrode*. *Biosensors and Bioelectronics*. (2008);23(9):1353-60.
174. Froger A, Hall JE. *Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method*. *JoVE (Journal of visualized experiments)*. (2007)(6):e253.
175. Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method*. *methods*. (2001);25(4):402-8.
176. Tong M, Ma S. *Protocols to culture and harvest hepatic tumor organoids for metabolic assays*. *STAR protocols*. (2022);3(3):101597.
177. Gardner CD, Landry MJ, Perelman D, Petlura C, Durand LR, Aronica L, et al. *Effect of a ketogenic diet versus Mediterranean diet on glycosylated hemoglobin in individuals with prediabetes and type 2 diabetes mellitus: The interventional Keto-Med randomized crossover trial*. *The American journal of clinical nutrition*. (2022);116(3):640-52.
178. Ivan CR, Messina A, Cibelli G, Messina G, Polito R, Losavio F, et al. *Italian ketogenic mediterranean diet in overweight and obese patients with prediabetes or type 2 diabetes*. *Nutrients*. (2022);14(20):4361.
179. Boulé NG, Haddad E, Kenny GP, Wells GA, Sigal RJ. *Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials*. *Jama*. (2001);286(10):1218-27.
180. Kirwan JP, Del Aguila LF, Hernandez JM, Williamson DL, O'Gorman DJ, Lewis R, et al. *Regular exercise enhances insulin activation of IRS-1-associated PI3-kinase in human skeletal muscle*. *Journal of Applied Physiology*. (2000);88(2):797-803.
181. Hanefeld M. *Pioglitazone and sulfonylureas: effectively treating type 2 diabetes*. *International Journal of Clinical Practice*. (2007);61:20-7.
182. Brunton S. *GLP-1 receptor agonists vs. DPP-4 inhibitors for type 2 diabetes: is one approach more successful or preferable than the other?* *International journal of clinical practice*. (2014);68(5):557-67.
183. Baker ML, Perazella MA. *SGLT2 inhibitor therapy in patients with type-2 diabetes mellitus: is acute kidney injury a concern?* *Journal of Nephrology*. (2020);33(5):985-94.
184. Coskun T, Urva S, Roell WC, Qu H, Loghin C, Moyers JS, et al. *LY3437943, a novel triple glucagon, GIP, and GLP-1 receptor agonist for glycemic control and weight loss: from discovery to clinical proof of concept*. *Cell metabolism*. (2022);34(9):1234-47. e9.
185. Lu X-Y, Huang S, Chen Q-B, Zhang D, Li W, Ao R, et al. *Metformin Ameliorates A β Pathology by Insulin-Degrading Enzyme in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease*. *Oxidative medicine and cellular longevity*. (2020);2020(1):2315106.

186. Solinas G, Becattini B. *JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response*. *Molecular metabolism*. (2017);6(2):174-84.
187. Tan JX, Finkel T. *Mitochondria as intracellular signaling platforms in health and disease*. *Journal of Cell Biology*. (2020);219(5).
188. Tundo GR, Sbardella D, Ciaccio C, Grasso G, Gioia M, Coletta A, et al. *Multiple functions of insulin-degrading enzyme: a metabolic crosslight?* *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. (2017);52(5):554-82.
189. Poy MN, Yang Y, Rezaei K, Fernström MA, Lee AD, Kido Y, et al. *CEACAM1 regulates insulin clearance in liver*. *Nature genetics*. (2002);30(3):270-6.
190. Najjar SM. *Regulation of insulin action by CEACAM1*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. (2002);13(6):240-5.
191. Chou Y-H, Kuo W-L, Rosner MR, Tang W-J, Goldman RD. *Structural changes in intermediate filament networks alter the activity of insulin-degrading enzyme*. *The FASEB Journal*. (2009);23(11):3734.
192. Liu Y, Loijens JC, Martin KH, Karginov AV, Parsons JT. *The association of ASAP1, an ADP ribosylation factor-GTPase activating protein, with focal adhesion kinase contributes to the process of focal adhesion assembly*. *Molecular biology of the cell*. (2002);13(6):2147-56.
193. Krause M, Dent EW, Bear JE, Loureiro JJ, Gertler FB. *Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration*. *Annual review of cell and developmental biology*. (2003);19(1):541-64.
194. Mascarenhas JB, Gaber AA, Larrinaga TM, Mayfield R, Novak S, Camp SM, et al. *EVL is a novel focal adhesion protein involved in the regulation of cytoskeletal dynamics and vascular permeability*. *Pulmonary Circulation*. (2021);11(4):20458940211049002.
195. Wewer Albrechtsen NJ, Hartmann B, Veedfald S, Windeløv JA, Plamboeck A, Bojsen-Møller KN, et al. *Hyperglucagonaemia analysed by glucagon sandwich ELISA: nonspecific interference or truly elevated levels?* *Diabetologia*. (2014);57:1919-26.
196. Müller WA, Faloona GR, Aguilar-Parada E, Unger RH. *Abnormal alpha-cell function in diabetes: response to carbohydrate and protein ingestion*. *New England Journal of Medicine*. (1970);283(3):109-15.
197. Khan SM, Sleno R, Gora S, Zylbergold P, Laverdure J-P, Labbé J-C, et al. *The expanding roles of Gβγ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action*. *Pharmacological reviews*. (2013);65(2):545-77.
198. Zahra N, Rafique S, Naveed Z, Nadeem J, Waqas M, Ali A, et al. *Regulatory pathways and therapeutic potential of PDE4 in liver pathophysiology*. *Life Sciences*. (2024):122565.
199. Nilsson E, Jansson PA, Perfilyev A, Volkov P, Pedersen M, Svensson MK, et al. *Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes*. *Diabetes*. (2014);63(9):2962-76.
200. Melville Z, Hernández-Ochoa EO, Pratt SJ, Liu Y, Pierce AD, Wilder PT, et al. *The activation of protein kinase A by the calcium-binding protein S100A1 is independent of cyclic AMP*. *Biochemistry*. (2017);56(17):2328-37.
201. Borthwick LA, Mcgaw J, Conner G, Taylor CJ, Gerke V, Mehta A, et al. *The formation of the cAMP/protein kinase A-dependent annexin 2-S100A10 complex with cystic fibrosis conductance regulator protein (CFTR) regulates CFTR channel function*. *Molecular biology of the cell*. (2007);18(9):3388-97.
202. Chou JY, Mansfield BC. *The SLC37 family of sugar-phosphate/phosphate exchangers*. *Current topics in membranes*. (2014);73:357-82.
203. Csala M, Bánhegyi G, Benedetti A. *Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment*. *FEBS letters*. (2006);580(9):2160-5.
204. Lizák B, Szarka A, Kim Y, Choi K-s, Németh CE, Marcolongo P, et al. *Glucose transport and transporters in the endomembranes*. *International Journal of Molecular Sciences*. (2019);20(23):5898.
205. Pusec CM, De Jesus A, Khan MW, Terry AR, Ludvik AE, Xu K, et al. *Hepatic HKDC1 expression contributes to liver metabolism*. *Endocrinology*. (2019);160(2):313-30.
206. Association AD. *2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2018*. *Diabetes care*. (2018);41(Supplement_1):S13-S27.
207. Jitrapakdee S. *Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis*. *The international journal of biochemistry & cell biology*. (2012);44(1):33-45.

208. Anyamaneeratch K, Rojvirat P, Sukjoi W, Jitrapakdee S. *Insights into transcriptional regulation of hepatic glucose production*. International Review of Cell and Molecular Biology. (2015);318:203-53.
209. Frescas D, Valenti L, Accili D. *Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes*. Journal of Biological Chemistry. (2005);280(21):20589-95.
210. Guasch-Ferré M, Santos JL, Martínez-González MA, Clish CB, Razquin C, Wang D, et al. *Glycolysis/gluconeogenesis-and tricarboxylic acid cycle-related metabolites, Mediterranean diet, and type 2 diabetes*. The American journal of clinical nutrition. (2020);111(4):835-44.
211. Carey BW, Finley LW, Cross JR, Allis CD, Thompson CB. *Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells*. Nature. (2015);518(7539):413-6.
212. Chandel N, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu C, Simon M, Schumacker P. *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription*. Proceedings of the National Academy of Sciences. (1998);95(20):11715-20.
213. Blatnik M, Thorpe SR, Baynes JW. *Succination of proteins by fumarate: mechanism of inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in diabetes*. Annals of the New York Academy of Sciences. (2008);1126(1):272-5.
214. Adam J, Ramracheya R, Chibalina MV, Ternette N, Hamilton A, Tarasov AI, et al. *Fumarate hydratase deletion in pancreatic β cells leads to progressive diabetes*. Cell Reports. (2017);20(13):3135-48.
215. Juraschek SP, Shantha GPS, Chu AY, Miller III ER, Guallar E, Hoogeveen RC, et al. *Lactate and risk of incident diabetes in a case-cohort of the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study*. PLoS one. (2013);8(1):e55113.
216. González-Casimiro CM, Cámara-Torres P, Merino B, Diez-Hermano S, Postigo-Casado T, Leissring MA, et al. *Effects of fasting and feeding on transcriptional and posttranscriptional regulation of insulin-degrading enzyme in mice*. Cells. (2021);10(9):2446.
217. Floegel A, Stefan N, Yu Z, Mühlenbruch K, Drogan D, Joost H-G, et al. *Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach*. Diabetes. (2013);62(2):639-48.
218. Drogan D, Dunn WB, Lin W, Buijsse B, Schulze MB, Langenberg C, et al. *Untargeted metabolic profiling identifies altered serum metabolites of type 2 diabetes mellitus in a prospective, nested case control study*. Clinical chemistry. (2015);61(3):487-97.
219. Kaufman RJ, Back SH, Song B, Han J, Hassler J. *The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in β -cells*. Diabetes, Obesity and Metabolism. (2010);12:99-107.
220. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science. (2004);306(5695):457-61.
221. Rosato RR, Fernandez R, Paz LI, Singh CR, Rosato AE. *TCA cycle-mediated generation of ROS is a key mediator for HeR-MRSA survival under β -lactam antibiotic exposure*. PLoS One. (2014);9(6):e99605.
222. Aon MA, Stanley BA, Sivakumaran V, Kembro JM, O'Rourke B, Paolocci N, et al. *Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H₂O₂ emission: an experimental-computational study*. Journal of General Physiology. (2012);139(6):479-91.
223. Meneses MJ, Borges DO, Dias TR, Martins FO, Oliveira PF, Macedo MP, et al. *Knockout of insulin-degrading enzyme leads to mice testicular morphological changes and impaired sperm quality*. Molecular and cellular endocrinology. (2019);486:11-7.
224. Schmid AI, Szendroedi J, Chmelik M, Krššák M, Moser E, Roden M. *Liver ATP synthesis is lower and relates to insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes*. Diabetes care. (2011);34(2):448-53.
225. Liesa M, Shirihai OS. *Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure*. Cell metabolism. (2013);17(4):491-506.
226. Kotronen A, Seppälä-Lindroos A, Bergholm R, Yki-Järvinen H. *Tissue specificity of insulin resistance in humans: fat in the liver rather than muscle is associated with features of the metabolic syndrome*. Diabetologia. (2008);51:130-8.
227. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, et al. *Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis*. Cell metabolism. (2015);21(5):739-46.
228. Letts JA, Fiedorczuk K, Sazanov LA. *The architecture of respiratory supercomplexes*. Nature. (2016);537(7622):644-8.

229. Chae S, Kim S-J, Do Koo Y, Lee JH, Kim H, Ahn BY, et al. *A mitochondrial proteome profile indicative of type 2 diabetes mellitus in skeletal muscles*. *Experimental & molecular medicine*. (2018);50(9):1-14.
230. Chavin KD, Yang S, Lin HZ, Chatham J, Chacko VP, Hoek JB, et al. *Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion*. *Journal of Biological Chemistry*. (1999);274(9):5692-700.
231. RibeiroPs C, PINTOH S. *Hepatocyteapoptosis, expressionofdeathreceptors, andactivationofNF κ Binthe liverofnonalcoholicandalcoholicsteatohepatitispatients*. *The AmericanJournalofGastroenterology*. (2004);99(9):1708.
232. Liu J, Li J, Li W-J, Wang C-M. *The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus*. *Journal of diabetes research*. (2013);2013(1):585897.
233. Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. *Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes*. *Nature*. (2004);432(7020):1027-32.
234. Cheng Z, Guo S, Copps K, Dong X, Kollipara R, Rodgers JT, et al. *Foxo1 integrates insulin signaling with mitochondrial function in the liver*. *Nature medicine*. (2009);15(11):1307-11.
235. Koo S-H, Satoh H, Herzig S, Lee C-H, Hedrick S, Kulkarni R, et al. *PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR- α -dependent induction of TRB-3*. *Nature medicine*. (2004);10(5):530-4.
236. Vianna CR, Huntgeburth M, Coppari R, Choi CS, Lin J, Krauss S, et al. *Hypomorphic mutation of PGC-1 β causes mitochondrial dysfunction and liver insulin resistance*. *Cell metabolism*. (2006);4(6):453-64.
237. Leal MC, Magnani N, Villordo S, Buslje CM, Evelson P, Castaño EM, et al. *Transcriptional regulation of insulin-degrading enzyme modulates mitochondrial amyloid β (A β) peptide catabolism and functionality*. *Journal of Biological Chemistry*. (2013);288(18):12920-31.
238. Sookoian S, Rosselli MS, Gemma C, Burgueño AL, Fernandez Gianotti T, Castaño GO, et al. *Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: Impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α promoter*. *Hepatology*. (2010);52(6):1992-2000.
239. Bryant DM, Mostov KE. *From cells to organs: building polarized tissue*. *Nature reviews Molecular cell biology*. (2008);9(11):887-901.
240. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. *AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis*. *Nature reviews Molecular cell biology*. (2012);13(4):251-62.
241. Fu D, Lippincott-Schwartz J, Arias IM. *Increased mitochondrial fusion and autophagy help isolated hepatocytes repolarize in collagen sandwich cultures*. *Autophagy*. (2013);9(12):2154-5.
242. Galloway CA, Lee H, Brookes PS, Yoon Y. *Decreasing mitochondrial fission alleviates hepatic steatosis in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. (2014);307(6):G632-G41.
243. Stevanović J, Beleza J, Coxito P, Ascensão A, Magalhães J. *Physical exercise and liver "fitness": Role of mitochondrial function and epigenetics-related mechanisms in non-alcoholic fatty liver disease*. *Molecular metabolism*. (2020);32:1-14.
244. Piacentini M, Baiocchini A, Del Nonno F, Melino G, Barlev NA, Rossin F, et al. *Non-alcoholic fatty liver disease severity is modulated by transglutaminase type 2*. *Cell Death & Disease*. (2018);9(3):257.
245. Yang W, Yan H, Pan Q, Shen JZ, Zhou F, Wu C, et al. *Glucagon regulates hepatic mitochondrial function and biogenesis through FOXO1*. *Journal of Endocrinology*. (2019);241(3):265-78.
246. Hernández-Alvarez MI, Sebastián D, Vives S, Ivanova S, Bartoccioni P, Kakimoto P, et al. *Deficient endoplasmic reticulum-mitochondrial phosphatidylserine transfer causes liver disease*. *Cell*. (2019);177(4):881-95. e17.
247. Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, et al. *Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism: a novel regulatory mechanism altered in obesity*. *Journal of Biological Chemistry*. (2003);278(19):17190-7.
248. De Brito OM, Scorrano L. *Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria*. *Nature*. (2008);456(7222):605-10.
249. Tubbs E, Theurey P, Vial G, Bendridi N, Bravard A, Chauvin M-A, et al. *Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance*. *Diabetes*. (2014);63(10):3279-94.

250. Tubbs E, Chanon S, Robert M, Bendridi N, Bidaux G, Chauvin M-A, et al. *Disruption of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity contributes to muscle insulin resistance in mice and humans*. *Diabetes*. (2018);67(4):636-50.
251. Arruda AP, Pers BM, Parlakgöl G, Güney E, Inouye K, Hotamisligil GS. *Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum–mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity*. *Nature medicine*. (2014);20(12):1427-35.
252. Ma JH, Shen S, Wang JJ, He Z, Poon A, Li J, et al. *Comparative proteomic analysis of the mitochondria-associated ER membrane (MAM) in a long-term type 2 diabetic rodent model*. *Scientific reports*. (2017);7(1):2062.
253. Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombès A. *Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo*. *Journal of cell science*. (2002);115(8):1663-74.

